

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

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

**"ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CEPAS DEL VIRUS DE LA
PSEUDORRABIA AISLADAS EN EL PAÍS Y DE REFERENCIA MEDIANTE
PRUEBAS FÍSICO-QUÍMICAS, ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y
PATRONES DE RESTRICCIÓN DEL ADN"**

Doctorando: Med. Vet. ECHEVERRÍA, María Gabriela

Director: Dr. NOSETTO, Edgardo Omar

**Lugar de trabajo: Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata**

Miembros del jurado: Dra. OLIVA, Graciela

Dr. BASUALDO, Juan

Dr. FONDEVILA, Norberto

1995

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

- ◆ A la Dra. María E. Etcheverrigaray quien me brindó su experiencia y calidez para mi desarrollo profesional y me permitió iniciarme en la investigación.

- ◆ A las Dras. Graciela Oliva y Cecilia Galosi por su gran predisposición, colaboración y constante estímulo.

- ◆ Al Dr. Kenji Sekikawa por las enseñanzas brindadas.

- ◆ A los expertos Dres. Yokinobu Tohya, Junzo Norimine e Ing. Shoiji Kibe por su dedicación y calidez humana y la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA) y a la Facultad de Ciencias Veterinarias por los equipos, drogas y reactivos utilizados en el presente trabajo.

- ◆ A todo el personal docente y técnico de la Cátedra de Virología, especialmente a la Srita. María del C. Mondragón y al Sr. Derlys D'Andrea por la colaboración prestada en la preparación de los materiales de laboratorio.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

- ECHEVERRÍA, M. G.; NORIMINE, J.; GALOSI, C. M.; OLIVA, G. A.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; NOSETTO, E. O.; TOHYA, Y.; MIKAMI, T. (1994)
The genotype of Aujeszky's Disease viruses isolated in Argentina. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 985-987.

INDICE DE CONTENIDOS

Título	1
Palabras clave	1
Resumen	2
Title	3
Summary	4
Introducción	5
Parte I Familia Herpesviridae	6
Características principales	7
Arquitectura de los herpesvirus	10
Parte II Suid Herpes virus I	13
Morfología	14
Replicación en cultivos celulares	17
Propiedades físico-químicas y biológicas	24
Enzimas y proteínas no estructurales	25
Proteínas estructurales	27
Parte III Pseudorrabia o Enfermedad de Aujeszky	36
Presentación	37
Animales susceptibles	39
Epizootiología	40
Signos clínicos	42
Patogenia	44
Latencia	46
Lesiones anatomopatológicas	51
Inmunidad	53
Vacunas	55

Análisis del ADN viral	63
Diagnóstico	65
Objetivos	67
Materiales y métodos	68
Cepas virales: origen e historia	69
Objetivo 1: propiedades biológicas	72
1.1 Características del efecto citopático	72
1.2 Pruebas de caracterización físico-química	74
Objetivo 2: respuesta de anticuerpos neutralizantes	76
2.1 Preparación de antígenos	76
2.2 Animales de experimentación	77
2.3 Virus neutralización cruzada	77
Objetivo 3: estudio de proteínas en SDS-PAGE	79
3.1 Estandarización de la técnica de SDS-PAGE	79
3.2 Métodos de purificación viral	81
3.3 Antígenos utilizados en SDS-PAGE	82
3.4 Marcadores de peso molecular	82
3.5 Western blotting	83
Objetivo 4: patrones de restricción del ADN	85
4.1 Clonado	85
4.2 Extracción del ADN	86
4.3 Enzimas de restricción y marcadores	87
4.4 Electroforesis en geles de agarosa	89
Resultados	90
1.1 Características del efecto citopático	91
1.2 Pruebas de caracterización físico-química	100
2.1 Virus neutralización cruzada	101

3.1 Electroforesis en SDS-PAGE	103
3.5 Western Blotting	106
4 Patrones de restricción del ADN	107
Discusión	113
Conclusiones	127
Bibliografía	129

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac	Anticuerpo/s
AcMo	Anticuerpos Monoclonales
AcN	Anticuerpos Neutralizantes
Ag	Antígeno/s
Alf	Alfort (cepa francesa de Pseudorrabia)
APS	Persulfato de amonio
BC	Buffer de carga
BHV-1	Herpes Virus Bovino 1
BHK	Línea celular de riñón de hamster (Baby hamster kidney)
BM	Baño de María
BT	Buffer de transferencia
C'	Complemento
CL-7	Chañar Ladeado 7 (cepa argentina de Pseudorrabia)
CL-15	Chañar Ladeado 15 (cepa argentina de Pseudorrabia)
CI	Cuerpo/s de inclusión
CMV	Citomegalovirus
CPK	Línea celular de riñón porcino (Continous Porcine Kidney)
CRFK	Línea celular de riñón felino (Crandell's feline kidney)
D	Dalton
E	ARN o ARNm tempranos (early)
EA	Enfermedad de Aujeszky
EBV	Virus Epstein Barr
ECP	Efecto citopático
E-L	ARNm temprano-tardío (early-late)
EHV-1 y 4	Herpes virus Equino 1 y 4

ELISA	Enzimo inmuno ensayo (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ER	Endonucleasas de restricción
gB	Glicoproteína B (antes gII)
gC	Glicoproteína C (antes gIII)
gD	Glicoproteína D (antes gp50)
gE	Glicoproteína E (antes gI)
gG	Glicoproteína G (antes gX)
gH	Glicoproteína H
gI	Glicoproteína I (antes gp63)
gK	Glicoproteína K
gL	Glicoproteína L
gM	Glicoproteína M
gp	Glicoproteína
gps	Glicoproteínas
H-E	Hematoxilina y Eosina
HeLa	Línea celular de tumor cervical uterino humano (Helen Lane)
HSV-1 Y 2	Herpes Simplex virus 1 y 2
IE	ARN o ARNm inmediatamente tempranos (immediately early)
IMAc	Inmunidad mediada por anticuerpos
IMC	Inmunidad mediada por células
Ind-S	Indiana Sullivan (cepa norteamericana de Pseudorrabia)
IR	Repetición interna (internal repeat)
ISCOM	Complejo/s inmunoestimulante (immunostimulant Complex)
Kbp	Pares de Kilobases
kD	Kilodalton
L	ARN o ARNm tardíos (late)
LT	Linfocitos T

LTR	Repetición terminal izquierda (left terminal repeat)
MDBK	Línea celular de riñón de bovino (Madin Darby Bovine Kidney)
MDI	Multiplicidad de infección
Mer	Mercedes (cepa argentina de Pseudorrabia)
MM	Medio de mantenimiento
MP	Medio de plaqueo
MSS	Medio sin suero
NC	Nitrocelulosa
NR	No reducción
PAA	Poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pi	Post-infección
PK15	Línea celular de riñón de porcino (Porcine Kidney)
PM	Peso molecular
PRV	Virus de la Pseudorrabia
R	Reducción
RC/79	Río Cuarto 79 (cepa argentina de Pseudorrabia)
RI	Respuesta inmune
RK13	Línea celular de riñón de conejo (Rabbit Kidney)
RTR	Repetición terminal derecha (right terminal repeat)
S-66	Sweden 66 (cepa sueca de Pseudorrabia)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SF	Solución fisiológica
SFB	Suero fetal bovino
SHV-1	Suid Herpes virus 1

SNC	Sistema nervioso central
TA	Temperatura ambiente
TBS	Buffer tris salino
TE	Buffer tris-EDTA
TEMED	Tetra metil etilen diamina
TK	Timidina kinasa
TL/92	Trenque Lauquen 92 (cepa argentina de Pseudorrabia)
TR	Repetición terminal (terminal repeat)
TS	Termo sensibles
TTBS	Buffer tris salino-Tween
TTBSG	Buffer tris salino-Tween-gelatina
VN	Virus neutralización
VZV	Virus Varicela Zoster
WB	Western blotting
YS-81	Yamagata Strain 81 (cepa japonesa de Pseudorrabia)

Estudio comparativo entre cepas del virus de la Pseudorrabia aisladas en el país y de referencia mediante pruebas físico-químicas, electroforesis en SDS-PAGE y patrones de restricción del ADN.

Palabras clave: Enfermedad de Aujeszky; Pseudorrabia, SHV-1.

RESUMEN

Desde que la Enfermedad de Aujeszky (EA) fue diagnosticada por primera vez en Argentina en 1978, fueron sucediéndose numerosos brotes en diferentes lugares del país. El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes cepas del virus de la Pseudorrabia porcina. Para ello utilizamos 5 cepas argentinas (3 aisladas en nuestro laboratorio) y 4 de referencia internacional. Las mismas fueron caracterizadas mediante pruebas físico-químicas; sus proteínas comparadas por electroforesis en SDS-PAGE; los ADN caracterizados mediante el uso de 6 enzimas de restricción y su antigenicidad fue comparada al evaluar los 9 antisueros producidos en ratas mediante un sistema de virus neutralización cruzada.

Las pruebas físico-químicas permitieron observar pequeñas diferencias de comportamiento de las cepas virales frente a diferentes variables tales como pH, calor, acción de la tripsina, éter y cloroformo, las que en ningún caso aportan datos concluyentes que permitan observar diferencias significativas. El estudio de la movilidad de las proteínas estructurales de los virus en geles de poliacrilamida tampoco arrojó datos de importancia y resultó insuficiente para distinguirlos. El uso de la virus neutralización cruzada para estudiar su antigenicidad, en cambio, mostró resultados que permitieron comprobar que las cepas argentinas produjeron títulos neutralizantes más elevados que las extranjeras. Los patrones de restricción del ADN de las 9 cepas permitieron diferenciar grupos genómicos y establecer relación entre ellos al utilizar la enzima *Bam*HI. Así, pudieron establecerse, de acuerdo a la clasificación de Herrmann, que 4 cepas argentinas pertenecen al tipo genómico I y solo una pertenece al tipo genómico II. Esta cepa (Mer) fue aislada de animales provenientes de los Países Bajos, donde predomina ese tipo genómico, no habiéndose encontrado nuevamente en el país. Los patrones de restricción del ADN, por lo tanto, brindaron el mejor método para caracterizar cepas de EA.

Comparative studies between Argentine and reference Pseudorabies virus strains using physicochemical methods, SDS-PAGE and DNA restriction patterns.

Key words: Aujeszky's Disease; Pseudorabies; SHV-1

SUMMARY

Since Aujeszky's Disease was first recognized in Argentina in 1978, many outbreaks occurred in different places in our country. Nine Pseudorabies virus strains, 5 Argentine -3 of them isolated in our laboratory- and 4 reference ones, were characterized by physicochemical, SDS-PAGE, DNA restriction patterns and virus neutralization methods.

Using trypsin, heat, ether, chloroform and pH in physicochemical analysis, only small differences were observed, as well as when the viral structural proteins were compared by SDS-PAGE. Cross virus neutralization test using 9 antisera produced in rats, showed that Argentine Pseudorabies virus strains elicited higher antibodies titres than those obtained with reference ones.

Although 4 Argentine isolates were classified into type I of *Bam*HI cleavage pattern, one isolate, Mer, belonged to type II, according to the classification by Herrmann. Since this type II virus was first isolated in 1981, no outbreak of Aujeszky's Disease infection by this type has so far been reported in Argentina.

Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's Disease Virus genome is chosen to differentiate isolates which could not be differentiated by other techniques.

INTRODUCCION

PARTE I

FAMILIA HERPESVIRIDAE

FAMILIA HERPESVIRIDAE

Características principales:

La familia Herpesviridae abarca más de 100 especies que han sido parcialmente caracterizadas, 7 virus de humanos, 5 de equinos, 4 de bovinos, 2 de porcinos y 3 de gallinas y de una amplia variedad de organismos eucariotes (181), que son clasificados en base a la arquitectura del virión. Presentan: a) Un "core" que contiene ADN lineal de doble cadena; b) Cápside icosaédrica de entre 100 a 110 nm de diámetro que contiene 162 capsómeros -12 pentaméricos y 150 hexaméricos-, estos últimos poseen un conducto central que corre a lo largo del eje longitudinal; c) Tegumento, material amorfo y a veces asimétrico que rodea a la cápside; d) Envoltura (envelope), membrana lipoproteica más externa en la que se proyectan diferentes proteínas (182).

Los miembros de esta familia han sido reconocidos por más de 60 años, pero recién durante la última década se ha empezado a comprender el amplio rango de manifestaciones clínicas y diversos aspectos de la biología molecular de estos virus (182). Difieren significativamente unos de otros respecto a la composición de bases y secuencia del ADN, pero comparten muchas propiedades biológicas, a saber: a) todos poseen enzimas específicas y otros factores involucrados en la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa, proteínas de unión, etc.) y enzimas involucradas en el metabolismo del ADN (timidina kinasa -TK-, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa etc.); b) la síntesis de ADN viral y la formación de cápside ocurre en el núcleo; c) la producción de la progenie viral infecciosa está acompañada invariablemente por la destrucción de la célula infectada (lisis); d) capacidad de producir latencia en los huéspedes naturales (182). Considerando el contenido genético y tipo genómico, las propiedades del ADN, rango de huéspedes,

duración del ciclo replicativo, y mecanismo de latencia (181), los herpesvirus han sido clasificados en tres subfamilias: *alfaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* y *gamaherpesvirinae* (181, 182).

Subfamilia *alfaherpesvirinae*:

Comprende aquellos virus que poseen amplio rango de huéspedes, ciclo de infección en cultivos relativamente corto con neto efecto lítico, y la capacidad de producir latencia no exclusivamente en ganglios. Comprende 2 géneros: *simplexvirus* (Herpes Simplex Virus 1 y 2 -HSV-1 y 2- y Virus de la Mamilitis Bovina -BHV-2-) y *varicelovirus* (Herpes Virus Suino 1 -SHV-1-, Herpes Virus Equino 1 y 4 -EHV-1 y 4-, Varicela Zoster Virus -VZV- y Herpes Virus Bovino 1 -BHV-1-) (34, 177, 178, 180, 181).

Subfamilia *betaherpesvirinae*:

Poseen rango de huésped restringido, crecimiento lento en cultivos celulares y ciclo replicativo largo. Una característica importante es que las células infectadas aumentan su tamaño (citomegalia). En estado latente el virus puede ser mantenido en glándulas secretorias, células linfocitocitares, riñón y otros tejidos (182). Comprende 2 géneros: *citomegalovirus* (Citomegalovirus Humano -HCMV- y Herpes Virus Equino 2 -EHV-2) y *muromegalovirus* (CMV murino) (177, 178, 180, 181).

Subfamilia *gamaherpesvirinae*:

Tienen un limitado rango de huéspedes. Replican en células linfoblásticas y causan lisis en algunas células epiteliales y fibroblásticas. La localización de la

latencia es linfática. Comprende 2 géneros: linfocriptovirus (Epstein-Barr Virus - EBV-), y rhadinovirus (Herpes Virus Saimiri) (177, 178, 180, 181). En la tabla 1 se resumen algunos datos de interés de virus herpes animales.

Tabla N° 1: Algunos virus pertenecientes a la familia Herpesviridae que causan enfermedades en los animales domésticos [Roizman y colaboradores (182), Maeda y colaboradores (114)]

VIRUS	SINONIMIA	SUBFAMILIA	G+C	Kbp	GENOMA
BHV-1	RINOTRAQUEÍTIS BOVINA	α	72	140	D
BHV-2	MAMILITIS BOVINA	α	64	133	E
BHV-4	VIRUS MOVAR	γ	50	145	B
BHV-5	ENCEFALITIS BOVINA	α	72	140	D
OHV-1	VIRUS HERPES OVINO 1			137	D
OHV-2	VIRUS HERPES OVINO 2	γ			B
CHV-1	VIRUS HERPES CANINO	α	32		
EHV-1	ABORTO EQUINO	α	57	142	D
EHV-2	CITOMEGALOVIRUS EQUINO	β	57	192	A
EHV-3	EXANTEMA COITAL	α	66	148	D
EHV-4	RINONEUMONITIS EQUINA	α	56	148	D
EHV-5		β		150	
EHV-6	HERPES VIRUS ASNAL-1	α			
EHV-7	HERPES VIRUS ASNAL-2	β			
EHV-8	HERPES VIRUS ASNAL-3	α			
FHV-1	RINOTRAQUEÍTIS FELINA	α	46	134	D
SHV-1	PSEUDORRABIA	α	74	140	D
SHV-2	CITOMEGALOVIRUS PORCINO	β			
MDV	ENFERMEDAD DE MAREK	α	47	180	E

Kbp= pares de kilobases; G + C expresado en moles %

Arquitectura de los Herpes Virus

El virión cuyo diámetro puede variar entre 120 a 300 nm es de forma casi esférica (176, 180, 181) y está formado por 4 componentes estructurales:

“Core”:

Está formado por un núcleo de ADN lineal de doble cadena enrollado alrededor de un eje de origen proteico (180, 181). El porcentaje de bases G + C de los herpesvirus varía desde 31 a 75 moles % y el peso molecular (PM), desde 80 a 150 x 10⁶ D, o lo que es lo mismo, desde 120 a 230 kbp (176). Las cadenas contienen secuencias repetidas internas y terminales y debido a estas repeticiones, los tamaños de los genomas pueden variar por más de 10 kbp. Sobre la base de estas repeticiones es que los genomas se clasifican en seis grupos, designados con letras de A a F (figura 1) de acuerdo a Roizman y colaboradores (182).

Grupo A: el ADN lineal es flanqueado por 2 secuencias terminales repetidas derecha e izquierda -LTR y RTR-, (Herpesvirus de los ictalúridos, Citomegalovirus Equino -EHV-2- y Herpes virus humano 6 -HHV-6-).

Grupo B: las secuencias repetidas se sitúan numerosas veces en la secuencia genómica, variando el número de estas reiteraciones (virus saimiri).

Grupo C: las repeticiones terminales son pequeñas, y aparecen otras secuencias repetidas R1 a R4 que dividen la secuencia lineal en varias partes (EBV).

Grupo D: una secuencia terminal se repite en una posición invertida internamente, de modo que se obtienen 2 secuencias lineales, una corta (U_s) y una larga (U_l), flanqueadas por terminaciones repetidas invertidas interna y terminal (IR y TR). Debido a esta característica, el ADN puede presentarse en dos isómeros en forma equimolar cambiando la orientación de sus dos secuencias lineales (SHV-1, EHV-1, VZV).

Grupo E: posee secuencias terminales repetidas invertidas y yuxtapuestas internamente, dividiendo al genoma en dos secuencias lineales, flanqueadas cada una por repeticiones invertidas. Ambas regiones lineales también varían de posición, invirtiéndose, dando origen a 4 isómeros (HSV-1 y 2 y Herpes Virus humano 5 - HHV-5-).

Grupo F: es la única secuencia a la que no se le han identificado repeticiones ni internas ni terminales -tupaia herpesvirus- (34, 178, 181, 182).

Cápside:

La cápside de todos los herpesvirus tiene forma de icosaedro y un diámetro de 100 a 110 nm. La sección longitudinal de los 150 capsómeros hexaméricos es de 9,5 x 12,5 nm. Un canal de 4 nm de diámetro parte de la superficie a lo largo del eje axial. No han sido bien caracterizados aún los 12 capsómeros pentaméricos de los vértices (180, 181). Los viriones purificados contienen entre 15 y 35 proteínas estructurales (177, 178).

Tegumento:

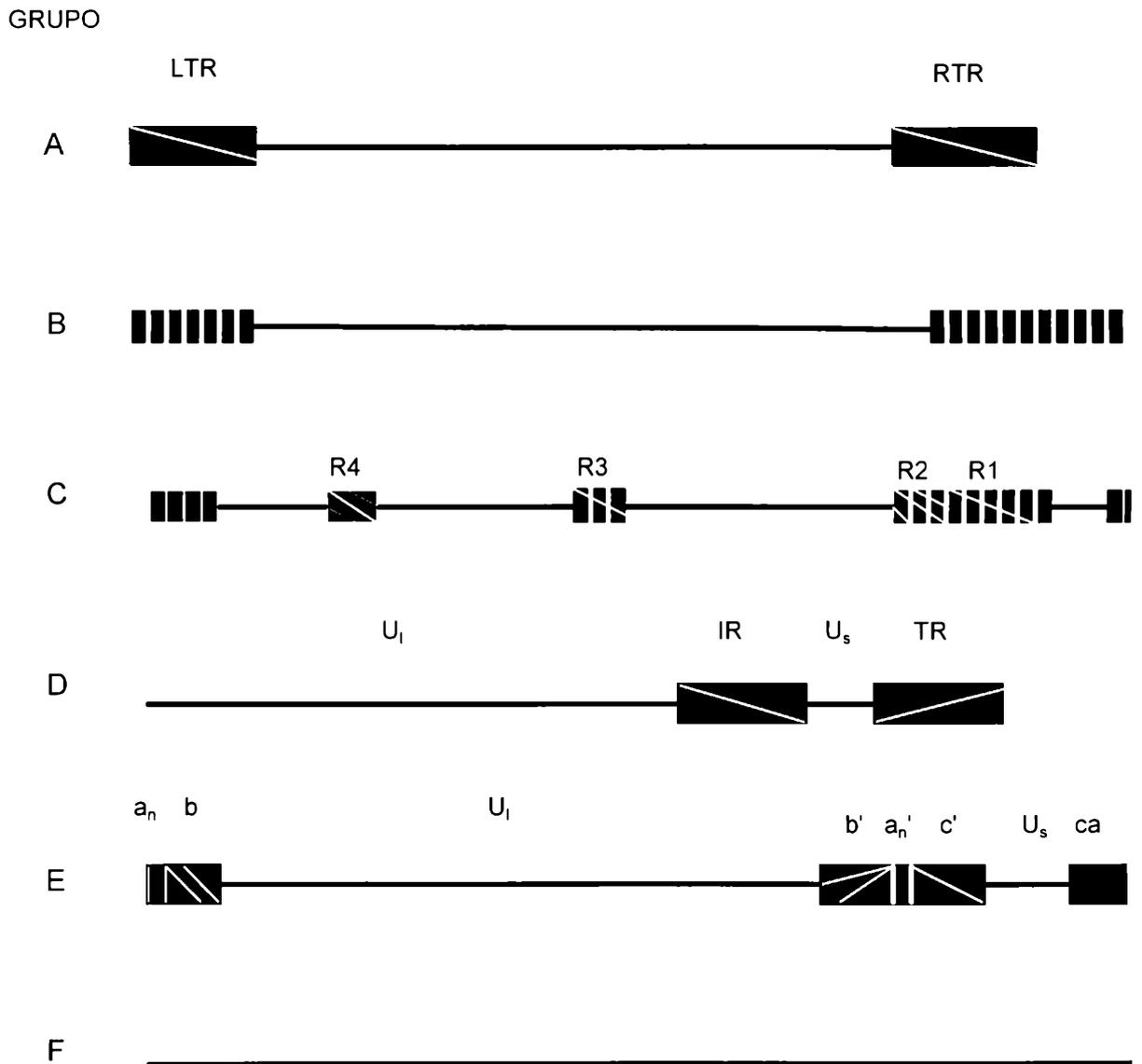
El tegumento es la estructura situada entre la cápside y la envoltura, de material globular, distribuido frecuentemente en forma asimétrica y su espesor varía según la localización del virión en la célula infectada (178, 180, 181).

Envoltura:

Es de apariencia trilaminar derivada de las membranas celulares y contiene lípidos y glicoproteínas (gps) virales específicas en pequeñas espículas muy numerosas de aproximadamente 8 nm de largo (180, 181, 218). Se han encontrado 11 gps en HSV-1 y 2: las gps gB, gC, gD y gE son sulfatadas; gE posee un receptor para el fragmento cristalizante de IgG. Se ha observado que gC tiene actividad

fijadora de la fracción C3b del complemento (C'); gB es la responsable de la unión entre la envoltura y la membrana celular (177).

Figura 1: tipos de genomas de virus pertenecientes a la familia Herpesviridae [Roizman y colaboradores (182)].



/// \\\= orientación de secuencia; LTR= repetición terminal izquierda; RTR= repetición terminal derecha; R1-R4= repeticiones; U_i= región única larga; U_s= región única corta; IR= repetición interna; TR= repetición terminal; ||||| = secuencias que se repiten; n= número de copias de secuencias.

PARTE II

SUID HERPES VIRUS TIPO 1 (SHV-1)

Morfología del Suid Herpes Virus 1 (SHV-1)

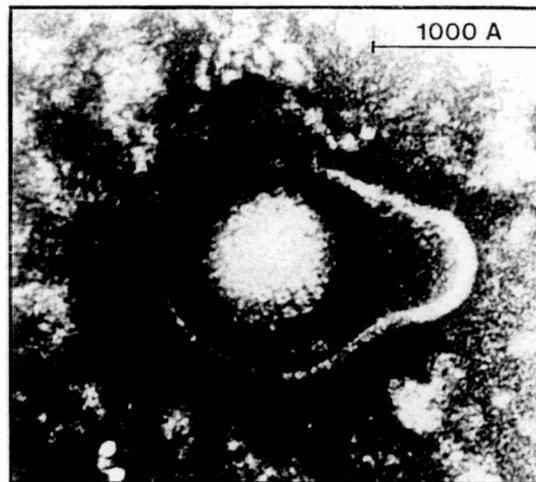
La partícula viral completa mide alrededor de 150-180 nm (17, 168), según lo observado por microscopía electrónica (figura 2), con proyecciones de la envoltura de 8-10 nm de largo.

El "core", mide aproximadamente 77,5 nm de diámetro; la cápside icosaédrica de entre 105-110 nm está compuesta por 162 capsómeros que miden 12-13 nm de largo por 9-10 nm de ancho con un conducto central de 4 nm.

El PM del virión es de 70×10^6 D ($0,12 \times 10^{-15}$ gr DNA). Su densidad de flotación es de $1,278 \text{ gr/cm}^3$ en CICs (61, 146).

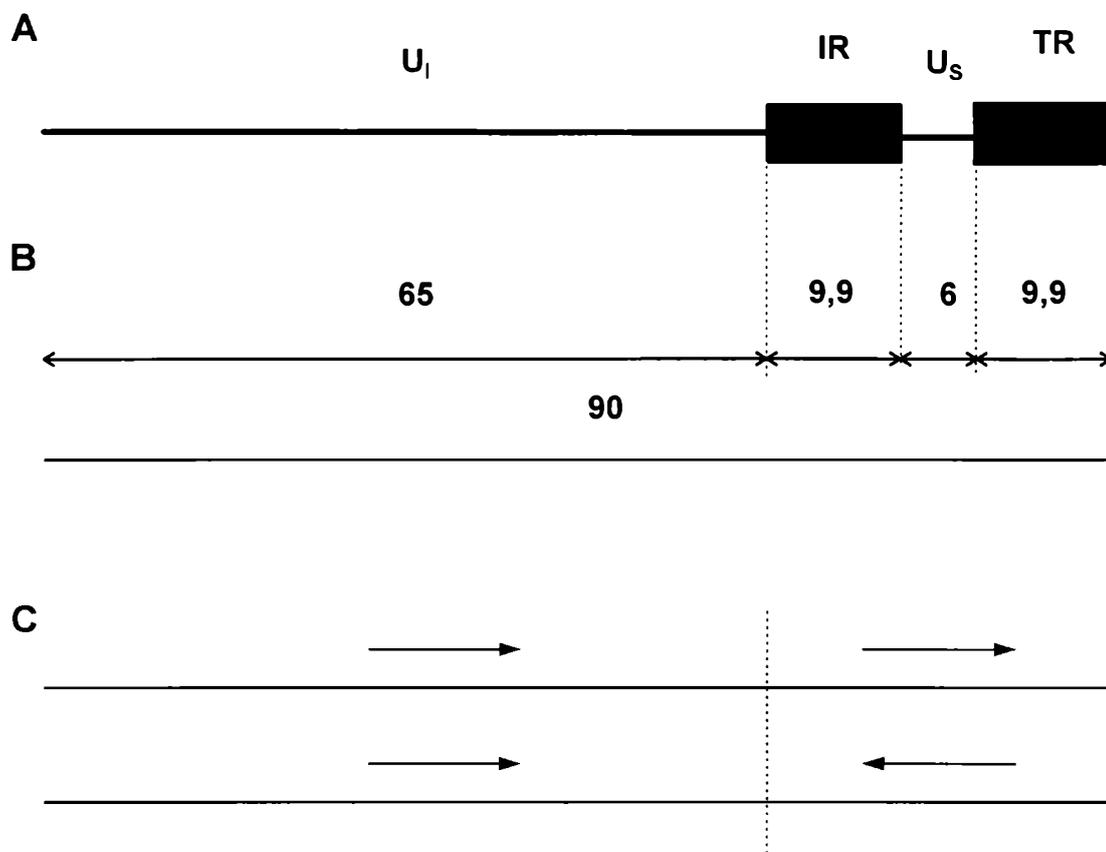
El genoma es lineal de doble cadena (figura 3) de un PM de 90×10^6 D, con 73 moles% de G + C (134) y aproximadamente 150.000 pares de bases, suficientes para codificar entre 70 y 100 proteínas virales (134). El genoma está dividido en dos regiones que se denominan U_s la región corta única y U_l la larga (134). Las secuencias repetidas interna y terminal (IR y TR) miden $9,9 \times 10^6$ D; U_s , 6×10^6 D y el resto lo forma la secuencia U_l (146).

Figura N° 2: aspecto de una partícula de SHV-1 al microscopio electrónico (cortesía del Dr. K. Sekikawa)



La cápside aparece como una formación hexagonal electrodensa de 162 capsómeros, rodeada de una membrana también electrodensa (envelope).

Figura 4: representación esquemática del genoma de SHV-1 [Yamada y colaboradores (228)]



A.- U_1 región única larga
 U_s región única corta
 IR repetición interna
 TR repetición terminal

B.- PM del ADN de SHV-1 expresado en millones de D

C.- isómeros posibles obtenidos de acuerdo a la inversión de secuencias

Replicación en cultivos celulares

Adsorción:

Se realiza mediante la interacción de un complejo de glicoproteína (gp) viral con estructuras de proteoglicanos que poseen cadenas de heparan sulfato de la superficie celular. Existen diferentes proteínas virales que permiten la adsorción y la penetración del virus a la célula -gC, gD- (34, 55, 177). Es un proceso electrostático que no requiere energía, pero sí la presencia de electrolitos. No es afectado por la temperatura (17) pero puede ser bloqueado por heparina exógena (34, 55, 133).

Penetración:

Se realiza mediante la fusión del envelope y la membrana celular, donde también intervienen diferentes proteínas de la envoltura viral. Antiguamente se suponía que la penetración se producía por un proceso de fagocitosis, pero en la actualidad se acepta la teoría según la cual existen receptores virales en la superficie celular en ausencia de expresión génica. Así lo demuestra el hallazgo de mutantes termosensibles (TS) de la gB de HSV-1, las cuales se adsorben pero no penetran a la célula (177). Es un proceso que requiere energía e inmediatamente a la penetración, el virus pierde su envelope rápidamente (17, 179).

Decapsidación:

Una vez dentro de la célula, las cápsides son transportadas al núcleo donde es liberado el ADN; este proceso está favorecido por el citoesqueleto celular, que facilita el transporte. También se ha demostrado que en este proceso intervienen diferentes proteínas virales, protegiendo y facilitando la entrada del ADN viral, así como también frenando la síntesis temprana de macromoléculas celulares e induciendo la expresión de genes α , β y γ . Estos genes codifican polipéptidos

sintetizados en las células infectadas pero que no forman parte de la partícula viral (177). La síntesis de estos polipéptidos sintetizados se produce en forma de cascada.

Polipéptidos α : se han identificado 5 polipéptidos de este grupo, cuya síntesis es mayor entre las 2 y 4 hs post infección (pi). Las proteínas α son requeridas para la síntesis del grupo polipeptídico subsecuente.

Polipéptidos β : son dos grupos de polipéptidos ($\beta 1$ y $\beta 2$) que alcanzan su pico de síntesis entre las 5-7 hs pi. Se incluyen en este grupo la TK, ADN polimerasa y la principal de proteína de unión al ADN (DNA protein binding).

Polipéptidos γ : son dos grupos de polipéptidos ($\gamma 1$ y $\gamma 2$). Los primeros son independientes de la síntesis de ADN viral, a diferencia de los segundos que sí la requieren. Intervienen en la formación de la proteína mayor de la cápside, la gB - $\gamma 1$ - y la gC - $\gamma 2$ - (179).

Transcripción:

La transcripción sigue el modelo de cascada (134) y se realiza con la intervención de la ARN polimerasa II de la célula infectada. El programa de transcripción se subdivide en por lo menos 3 etapas que se transcriben sucesivamente, formándose:

1) ARN inmediatamente temprano (IE), el cual es sintetizado en ausencia de síntesis de proteínas (134). La región correspondiente a IE en el genoma ha sido hallada entre las repeticiones invertidas, en un segmento de $4,1 \times 10^6$ D, ocupando las posiciones en el mapa de 0,95-0,99. La región transcrita tiene 6 kilobases de tamaño y es sintetizada hasta los 40-50 min pi. Este ARN-IE sintetizado es rápidamente transportado al citoplasma (17). Aún en presencia de cicloheximida, se acumulan grandes cantidades de ARN-IE en las células infectadas. La proteína IE (180 kD) es activadora de los genes tempranos (E) (30, 43, 134).

2) ARN temprano (E), sintetizado antes del inicio de la replicación del ADN, entre 1 y 2 hs pi (134). Las copias de ARN-E son complementarias a la mayoría de las secuencias del genoma, su tamaño es aproximadamente el del ARNm y una vez sintetizado se dirige rápidamente hacia el citoplasma. Pertenecen a genes tempranos los que codifican la proteína mayor de unión al ADN (136 kD), la TK, la nucleasa alcalina y una subunidad de la ribonucleótido reductasa (30, 34, 134).

3) ARN tardío, que se produce exclusivamente luego de la síntesis del ADN (17, 30, 134). Este se divide en dos grupos: a) Aparentemente precursor del ARNm, ya que tiene el tamaño aproximado al ARNm y una vez producido es rápidamente transportado al citoplasma. b) Moléculas no precursoras del ARNm. Las diferentes especies mayores de ARNm se acumulan en varios estadios de la infección, y sobre la base del nivel de abundancia en estos estadios, se pueden dividir en 4 grupos:

a. ARNm inmediatamente temprano (ARNm IE). A esta clase pertenece solo un fragmento de aproximadamente 6 kilobases de tamaño.

b. ARNm temprano (ARNm E). Esta especie son producidas en las primeras etapas de la infección, se acumulan a las 3-4 hs pi y permanecen casi constantes durante el ciclo infectivo.

c. ARNm temprano-tardío (ARNm E-L). Comienza a sintetizarse 1 hora pi y se acumula a las 3-9 hs pi.

d. ARNm tardío (ARNm L) aparece después del comienzo de la síntesis de ADN (aproximadamente 2,5 hs pi) y se acumula hasta el final del ciclo infectivo.

Replicación:

La velocidad de replicación del ADN del SHV-1 ha sido estimada en $1 \mu\text{m}$ ($2 \times 10^6 \text{ D}$) por min a 37°C , aunque parte del ADN se replica al doble de esa velocidad. El tiempo requerido para la replicación de un genoma es aproximadamente de 45 min. La forma de replicación es semiconservativa, y en ciertos estadios tempranos

de síntesis se produce replicación geométrica. En estadios tardíos, solo parte del ADN neoformado se replica nuevamente. No se conoce hasta ahora si esta disminución de la síntesis se debe a que disminuyen algunos factores fundamentales para ese fin, o si es así su modo de replicación.

La replicación ocurre siempre en forma unidireccional. La circularización del genoma puede ocurrir en ausencia de la expresión de funciones virales, la ligazón de los extremos está mediada por proteínas celulares o virales, que acompañan al genoma viral hacia el núcleo. El hecho que el ADN viral purificado es por sí solo infeccioso, indica que las proteínas celulares juegan su rol en la circularización, aunque la replicación del ADN es diferente en células transfectadas con ADN viral y en células infectadas con viriones intactos. Después que el ADN se ha circularizado la replicación comienza en un sitio de origen de la replicación -ORI- (14), conformando el modelo de replicación del "círculo rodante". Existen 2 ORI, ambos en U_L , uno en su extremo izquierdo y otro en la mitad de la secuencia aproximadamente -que pertenece al fragmento 4 del ADN obtenido con *Bam*HI y que es homólogo al del HSV-1- (34, 135). La isomerización de la región corta única (U_S) es un proceso rápido, y al finalizar la replicación se encuentran cantidades equimolares de las dos formas isoméricas del ADN del SHV-1, de manera que en algún momento se produce un proceso de recombinación (intermolecular o intramolecular). Como lo indican estudios de Ben Porat y colaboradores (15) e Ihara y colaboradores (81), la recombinación ocurre entre moléculas de ADN parental antes o durante las primeras etapas de la replicación.

Encapsidación:

En la observación de células infectadas al microscopio electrónico, se han distinguido tres tipos de partículas virales, a saber: cápsides vacías (sin ADN), nucleocápsides (con ADN) y viriones (nucleocápsides con envoltura), las cuales

corresponden a 3 etapas diferentes en el proceso de formación del virión, habiéndose establecido relaciones entre los precursores de esas estructuras. Para ello se han utilizado mutantes TS, capaces de ensamblar cápsides pero no nucleocápsides a temperaturas no permisivas: si las células infectadas con estas mutantes que producen cápsides vacías, son sometidas a temperaturas permisivas, las cápsides vacías acumuladas desaparecen y en su lugar aparecen cápsides completas, lo que indica que las cápsides vacías formadas a temperaturas no permisivas son precursoras de las nucleocápsides. La misma situación ocurre cuando las nucleocápsides desaparecen y en su lugar aparecen viriones maduros.

Las proteínas que la forman se sintetizan en el citoplasma y su ensamble se produce en el núcleo de las células infectadas. No se conoce con exactitud el proceso, pero sí se sabe que tanto la migración de las proteínas hacia el núcleo como el ensamble requieren la presencia de muchas proteínas funcionales, por ejemplo, se determinó que la privación de arginina no permite que las proteínas de la cápside migren hacia el núcleo y por lo tanto éstas no se forman.

Debido a que la replicación del ADN es continua, el fraccionamiento del mismo ocurre en sitios específicos de la molécula, para generar genomas maduros. Aunque no es mucho lo conocido hasta el momento, el fraccionamiento depende del ensamble de la cápside y de otros factores no asociados directamente con el proceso de ensamble de la cápside (102). La secuencia conocida es la siguiente: las proteínas de la cápside se ensamblan, el ADN concatamérico se fracciona en sitios específicos y es introducido en las cápsides. Las responsables de este fraccionamiento son la cápside en sí misma y otras proteínas asociadas (17).

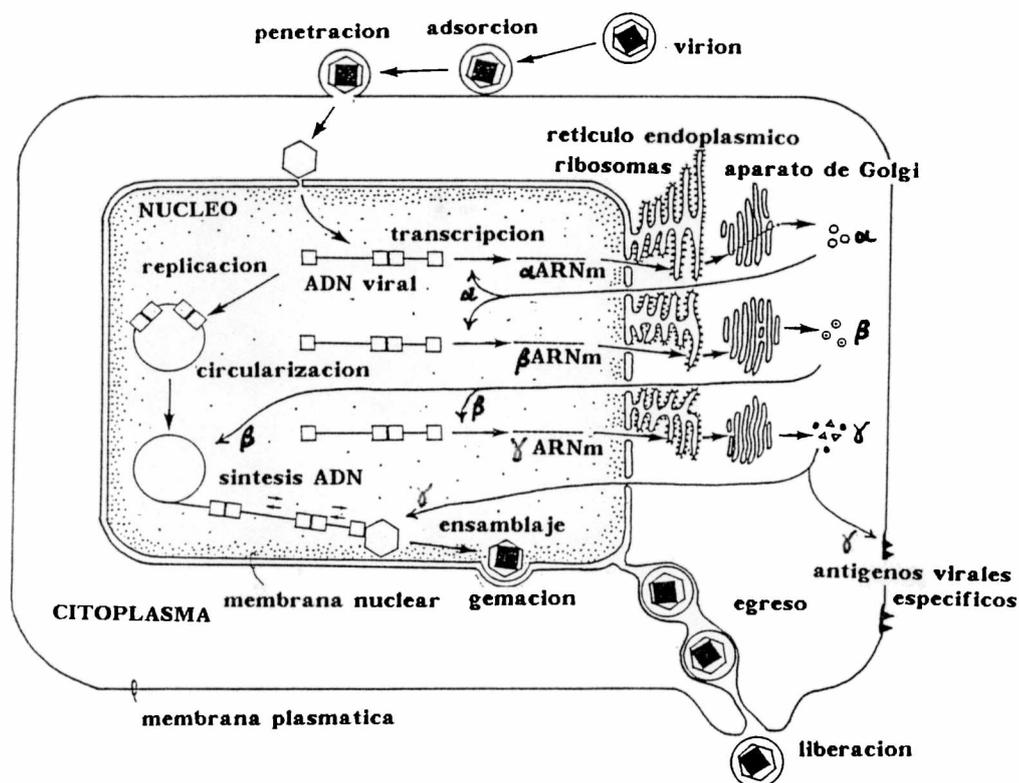
Liberación de las partículas:

Luego del ensamble, las partículas virales se asocian a la cara interna de la membrana nuclear, donde adquieren la envoltura. Los sitios de unión de la

membrana nuclear están modificados por agregaciones de proteínas de membrana viral -proteínas virales de superficie externa y algunas proteínas del tegumento- (177).

El transporte hacia la membrana plasmática celular es realizado a través del sistema citocavitario. El egreso se realiza por fusión de vesículas que contienen partículas completas con la membrana plasmática o simplemente por un mecanismo de exocitosis (177). En todas las células estudiadas, infectadas con distintas cepas de SHV-1, se ha observado que los virus adquieren su envoltura al "brotar" del núcleo, especialmente de la membrana nuclear interna. Los fosfolípidos de la envoltura preexisten en la célula antes de ser infectada, como ha sido observado en experimentos realizados sobre la estimulación del metabolismo de los fosfolípidos. Esto significa que la envoltura no deriva de áreas al azar de la membrana nuclear, sino que proviene de áreas metabólicamente más activas que otras. Sólo las nucleocápsides son capaces de reconocer los sitios específicos de esa membrana, por poseer componentes de reconocimiento en su superficie. Es poco frecuente que cápsides vacías adquieran envoltura, al carecer de esos componentes de reconocimiento (17, 116). Este ciclo replicativo se resume en la figura 4.

Figura 4: ciclo replicativo del SHV-1 en cultivos celulares [Yamada y colaboradores (228)].



Propiedades físico-químicas y biológicas

Al poseer un rango tan amplio de huéspedes, SHV-1 puede replicar en muchos sustratos celulares, ya sea cultivos primarios o de línea: MDBK (Madin Darby bovine kidney), PK15 (porcine kidney), CPK (continuous porcine kidney), HeLa (Helen Lane), RK13 (rabbit kidney), CEF (chicken embryo fibroblasts), BHK (baby hamster kidney), riñón y testículo de cerdo como células más susceptibles y, ED (equine dermal) y BT (bovine turbinate) como menos susceptibles (7, 22, 152, 205). Estas células susceptibles infectadas pueden presentar 2 tipos distintos de efecto citopatogénico (ECP) característico: formación de sincicios y/o redondeamiento celular, muchas veces dependiente de la cepa viral actuante. La mayoría de los aislamientos obtenidos de epizootias en cerdos, producen redondeamiento celular como ECP (22). De acuerdo al comportamiento y la habilidad de formar sincicios se pueden dividir las cepas en virulentas y de reducida virulencia. Golais y Sabó resumen en su trabajo que las cepas virulentas forman sincicios, causan prurito en el punto de inoculación en el conejo con posterior muerte y los antígenos (Ag) virales se detectan principalmente en el núcleo de las células infectadas, mientras que las atenuadas o de reducida virulencia redondean las células infectadas, no producen prurito en el conejo y los Ag virales se detectan principalmente en el citoplasma (64).

Los miembros de la familia Herpesviridae son sensibles a los solventes orgánicos y al calor y la tripsina, siendo las cepas virulentas más sensibles al calor que las de virulencia reducida (7).

Con respecto a la termoresistencia, Golais y Sabó encuentran que la literatura es contradictoria y concluyen que, de acuerdo a los experimentos realizados, la temperatura no es un marcador que se relaciona con la virulencia (64).

Enzimas y proteínas no estructurales

Durante el ciclo normal de infección el SHV-1 inhibe gradualmente la síntesis de proteínas celulares. Los análisis mediante electroforesis en SDS-PAGE unidimensional, permiten identificar 40 bandas proteicas virales a las 5 hs pi. Dependiendo del estadio de infección, durante el cual son sintetizadas abundantemente, las proteínas virales pueden subdividirse en 5 clases:

1. Clase I (proteínas inmediatamente tempranas o IE): es una única proteína de 180 kD, requerida constantemente en la secuencia de la transcripción y su expresión dirige la pérdida simultánea del reconocimiento de su propio promotor (81, 83). Esta proteína se sintetiza hasta 2,5 hs pi y actúa por sí sola en la regulación de la transcripción, ya que su presencia es indispensable para la producción de las otras proteínas, regulando la estabilidad del mensaje transcripcional.

2. Clase II (proteína temprana o E): esta proteína se sintetiza abundantemente entre 1 y 4 hs pi, antes y durante las primeras etapas de la síntesis del ADN. Esta proteína de 136 kD, al ser una de las proteínas de unión al ADN, es requerida para el inicio de las rondas de replicación y luego también para la estabilización del ADN de la progenie viral, debido a que ejerce una acción protectora del ataque nucleolítico (17).

3. Clase III (proteínas tempranas-tardías o E-L): su síntesis comienza a los 90 min pi, pero su máxima concentración se encuentra entre las 4 y 9 hs pi. En este grupo se encuentra la proteína mayor de la cápside.

4. Clase IV (proteínas tardías o L): no se produce su síntesis si se encuentra inhibida la síntesis de ADN viral. Son detectadas a partir de las 3 hs pi. Pertenecen a esta clase una de 10 kD (no estructural) y otra de 15 kD (estructural), que protegen al ADN al unirse a los concatámeros (17, 34).

5. Clase V (proteínas constantes): son sintetizadas en cantidad a través del ciclo de replicación. Apparentemente no son proteínas celulares, ya que no se producen en células no infectadas.

Enzimas virales:

***TK:** su actividad en SHV-1 difiere en muchos aspectos de la de HSV: la TK producida por el SHV-1 no puede fosforilar deoxiuridina y sólo fosforila la timidina, mientras que la TK producida por HSV puede fosforilar deoxiuridina, timidina y deoxicitidina. Es indispensable al igual que la ribonucleótido reductasa para la replicación del SHV-1 en cultivos celulares y en animales infectados experimentalmente (34).

*** ADN polimerasa:** es antigénicamente distinta a la celular y a la producida por HSV.

***ADNasa:** es otra de las enzimas inducidas por el PRV en las células infectadas. Es una exonucleasa que cataliza la liberación de 5' deoxirribonucleósidos monofosfato del terminal 3' del ADN (17).

***Nucleasa alcalina:** está asociada a la proteína mayor de unión al ADN y está involucrada en el proceso de maduración de las cápsides (34).

***Ribonucleótido reductasa:** es un complejo indispensable involucrado al igual que la TK en la virulencia de SHV-1 (34).

Proteínas estructurales

Las proteínas del SHV-1 que juegan el rol más importante en la respuesta inmune (RI) son las más superficiales, localizadas en la envoltura y son de naturaleza glicoproteica (18, 71). Hasta el año 1975 se conocían 24 especies de proteínas de la envoltura, con PM de entre 25 a 275 kD (195). Hampl y colaboradores (71) en 1984, describieron y realizaron una clasificación tentativa de las proteínas del SHV-1: gI, gII, gIII, gIV y gV (gp63) y Ben-Porat y colaboradores, en 1986, describieron además la gVI -gp50- (18).

Las siete gps encontradas hasta el año 1992 en SHV-1 fueron designadas como gI, gII, gIII, gp 63, gp 50, gX y gH, estando los genes que codifican a tres de ellas localizados en la región única larga -U_L- (gII, gIII y gH) y siendo gI, gIII, gp63 y gX no esenciales para la replicación del virus en cultivos celulares (57, 71, 82, 97, 130, 157, 200, 212, 216). Todas, con la excepción de la gX, están localizadas en la envoltura, así como en la membrana plasmática de las células infectadas (157, 171). A diferencia de HSV-1, VZV y EHV-1, el genoma del SHV-1 no ha podido ser hasta hoy totalmente secuenciado, debido a la dificultad que ofrece su alto contenido de bases C + G (82).

En el 18° Congreso Internacional de Herpesvirus llevado a cabo en Pittsburg, Pennsylvania, EEUU en 1993, los investigadores coincidieron en unificar la nomenclatura de las gps de los alfa herpesvirinae, tomando como patrón la denominación de las del HSV-1 (136). Es así que hoy Jabobs (82) describe 8 y Mettenleiter (135) 10 gps del SHV-1.

Codificadas en U_L: gB (gII), gC (gIII), gH y gL.

Codificadas en U_S: gD (gp50), gE (gI), gG (gX) y gI (gp63).

Mettenleiter (135) describe además la gK y gM codificadas en U_L. En la envoltura se localizan: gB, gC, gD, gE, gI, y gH (98), mientras que gG ha sido

hallada en grandes cantidades en el medio de cultivo de células infectadas, pero no ha podido ser encontrada en el virión (17, 167). Las gps esenciales para la infectividad viral son gB, gD y gH (73, 82, 132, 157, 231) y gL de acuerdo con Klupp y colaboradores (98) aunque gL aparece solo en presencia de gH.

Cuatro de ellas parecen ser las más conservadas entre los herpesvirus: gB, gH, gL y gM (98), aunque Mettenleiter (135) considera que la gK está más conservada que la gL. gH forma un complejo con gL en HSV-1 tal es así que la localización de gL en el virión es dependiente de la presencia de gH y parecería que ocurre lo mismo en SHV-1 según las últimas investigaciones (98). No ha podido correlacionarse aún la gJ de HSV-1 (98, 134). Estos datos se resumen en la tabla 2:

Tabla 2: nomenclatura y localización de las diferentes gps de SHV-1.

<i>Denominación</i>	<i>Localiz. genómica</i>	<i>Esencial</i>	<i>Localiz. envoltura</i>
gB (gII)	U _l	si	si
gC (gIII)	U _l	no	si
gD (gp50)	U _s	si	si
gE (gI)	U _s	no	si
gG (gX)	U _s	no	no
gH (gH)	U _l	si	si
gI (gp63)	U _s	no	si
gK	U _l	?	?
gL	U _l	si	?
gM	U _l	?	?

La antigua denominación figura entre paréntesis; U_l región única larga y U_s región única corta; (?) no hay datos disponibles.

Funciones de las glicoproteínas de SHV-1:

gB: es la proteína más prominente encontrada en viriones purificados, es un complejo de 155 kD formado por tres gps, gBa de 110-125 kD, gBb de 68-74 kD y gBc de 55 a 58 kDa, unidas covalentemente por puentes disulfuro (157), todas derivadas a su vez del fraccionamiento proteico de un precursor - gBa- (52, 134, 157, 226, 229). gB es la proteína más conservada entre los herpesvirus excluyendo los de los peces (100, 171). Los viriones que carecen de la gB no son infecciosos, debido a un defecto en la penetración viral, lo mismo ocurre con los HSV gB(-). Se probó que realmente las proteínas homólogas gB juegan el mismo rol funcional, cuando SHV-1 gB(-) pudo complementarse con líneas celulares que expresan la gB del BHV-1. Cumple el rol de favorecer la penetración y la transmisión de célula a célula (97, 98, 99, 100, 135, 136) e induce la producción de anticuerpos neutralizantes (AcN) dependientes e independientes del C' (135).

gC: es una gp de aproximadamente 92 kD (34, 170, 229) y junto con el complejo gE/gI interactúa en algún aspecto de la maduración viral y la liberación de partículas infecciosas maduras (132, 231). Este efecto es también altamente específico del tipo celular infectado, ya que dependiendo del tipo celular donde el virus interactúa, gC adquiere diferentes configuraciones (231) y por lo tanto es dependiente de las funciones virales y celulares (134). La principal función de esta proteína es la de intervenir en la primera etapa de adsorción virus-célula (99, 132, 217), ya sea por interacción con el receptor específico celular o modificando la configuración de otras proteínas esenciales para el proceso de adsorción (232). En la segunda etapa está involucrada la gD (135); esto se demostró utilizando AcN anti-gC antes del proceso de adsorción (71). Es un poderoso inmunógeno, produce inmunidad mediada por anticuerpos (IMAc) y es la única que produce inmunidad mediada por células -IMC- (135, 169).

gD: con un tamaño de 50-60 KDa (52). Los primeros análisis funcionales de gD indicaron que esta proteína estaba involucrada en la penetración y adsorción viral, mientras que la gD del HSV, no sólo participa en la penetración sino también en la fusión intercelular. Esto es discutido por Peeters y colaboradores (157) que afirman que sólo gB, y no gD, está involucrada en la fusión celular. Además, células que expresan gD son parcialmente resistentes a la superinfección con SHV-1 o HSV (134). gD purificada protege a los animales contra el desafío posterior, indicando que es uno de los mayores inmunógenos (135). Induce la producción de AcN en presencia y ausencia del C' (134, 135).

gE: por inmunoprecipitación ha sido demostrado que forma un complejo unido no covalentemente con gI. La ausencia de esta gp altera las características de maduración del virus influenciando en la liberación de los viriones y es específico del tipo celular (19, 82, 131, 135). Induce la producción de gran cantidad de AcN dependientes del C' (57, 82), participa en la difusión viral célula a célula y actúa además como determinante de la neurovirulencia en cerdos dependiente de la cepa (82, 132, 135). Su PM aproximado es de 130 kD.

gG: esta proteína es secretada en grandes cantidades en las células infectadas, pero aún no ha sido elucidada su función (97, 134, 167, 200). Su PM es de aproximadamente 90 kD (13, 34).

gH: el genoma que la codifica ha sido recientemente secuenciado, y está muy próximo al gen de TK con un PM de 72 KDa (97) o 95 kD de acuerdo con Christensen (34). Luego de la gB es la proteína que más se conserva en las secuencias de los demás herpesvirus. En HSV, gH representa una de las gps que han sido identificadas y caracterizadas en detalle más recientemente. Estos estudios demostraron que gH está involucrada en procesos de penetración y diseminación viral de célula a célula (97, 98, 135) y que los anticuerpos (Ac)

dirigidos contra gH tienen alta capacidad de neutralizar independientemente del C' (98). Forma un complejo covalentemente unido con gL (135).

gI: su PM es de 63 kD y se ha demostrado que forma un complejo unido no covalentemente con gE (34, 73,135).

gK: solo se sabe que el gen que la codifica se ubica en U₁₅₃, pero no se conoce aún su función (135).

gL: solo se encuentra en presencia de gH, con la cual interactúa como fue demostrado por Klupp y colaboradores (98), y esta interacción parecería ser esencial para la localización de gH en el virión. Su gen se localiza en U₁ (135).

gM: solo se conoce la localización de su gen en U₁₀ del SHV-1 (135).

Han sido desarrolladas cepas mutantes que carecen de las gps gE, gI, gC y gG; el hecho de que estas mutantes sean viables, al menos en cultivos celulares, prueba que las funciones de estas gps solas o en combinación, no son esenciales para el crecimiento viral o bien estas funciones son provistas por otros virus o por productos celulares (134).

La otra proteína hallada en HSV (gJ -no esencial-) no ha podido ser correlacionada aún con alguna de SHV-1 (98, 134).

En la tabla 3 se resumen las funciones conocidas hasta el momento de las distintas gp del SHV-1. En las figuras 5 y 6 se esquematizan la ubicación en el genoma y las funciones de las gps del SHV-1 respectivamente.

Tabla 3: funciones conocidas de algunas gps del SHV-1

	gB	gC	gD	gE	gG	gH	gI	gL
Adsorción	-	+	+	-	-	-	-	-
Penetración	+	-	+	-	-	+	-	+
Diseminación célula a célula	+	-	-	+	-	+	?	+
Liberación	-	+	-	+	-	-	+	?
AcN (C'-)	+	+	+	-	-	+	-	?
AcN(C'+)	+	+	+	+	-	+	?	?
IMC	-	+	-	-	-	-	-	?

(+) indica participación; (-) indica no participación; (?) no hay datos disponibles; AcN (C'-) y AcN (C'+) indica producción de Ac neutralizantes en ausencia y presencia del C' respectivamente; IMC inmunidad mediada por células

gC y gD constituyen los mayores inmunógenos del SHV-1 (50, 134), y junto con gB y gE juegan un rol muy importante en inducir AcN en animales infectados (18, 50, 52, 71, 229). Los Ac dirigidos contra gC son capaces de neutralizar la infectividad de SHV-1 en ausencia de C', inhibiendo la adsorción viral (71). Estudios realizados por Ben-Porat y colaboradores (18), mostraron que los Ac anti-gC representan la mayor porción de AcN en cerdos convalescientes. Además gC es el único blanco para linfocitos citotóxicos específicos de virus en cerdos (135) y la exposición al virus puede protegerse por transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-gC (50, 233).

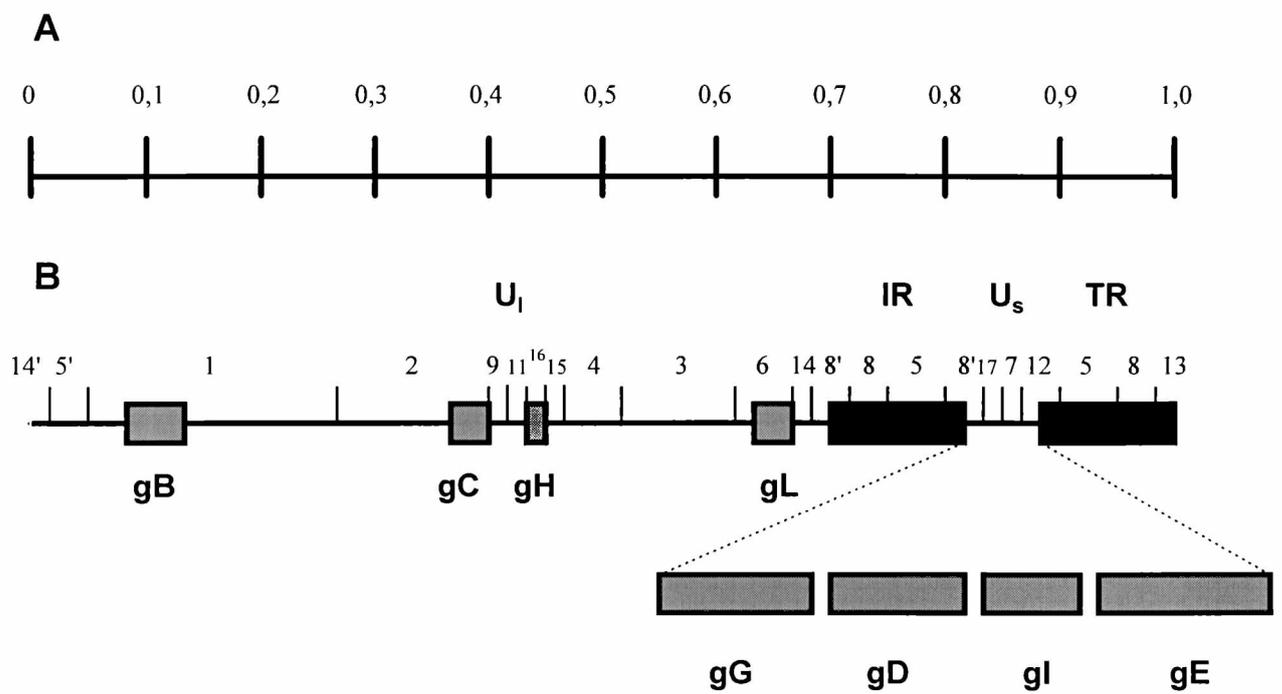
gD es el blanco mayor para Ac protectores; los Ac dirigidos contra ella son más potentes en neutralizar al virus de la pseudorrabia porcina sin la ayuda del C' (50, 215), y pueden proteger a los cerdos contra el desafío posterior del SHV-1

(134), respuesta que también puede obtenerse utilizando vacunas recombinantes que expresen gD (117).

gB induce la producción de AcN en presencia o ausencia del C' (135). Los resultados obtenidos por Ben-Porat y colaboradores (18) indican un rol inferior de gE en la inducción de AcN, mientras que Wardley y Post, consideran a la gE como el blanco más importante en la RI protectora (57, 213).

gG, al no ser un constituyente de la envoltura viral, no produce actividad neutralizante (134). gH junto con gL inducen AcN independientes del C' (98).

Figura 5: organización de los genes que codifican gps del SHV-1 de acuerdo con Mettenleiter (135) y Jacobs (82).



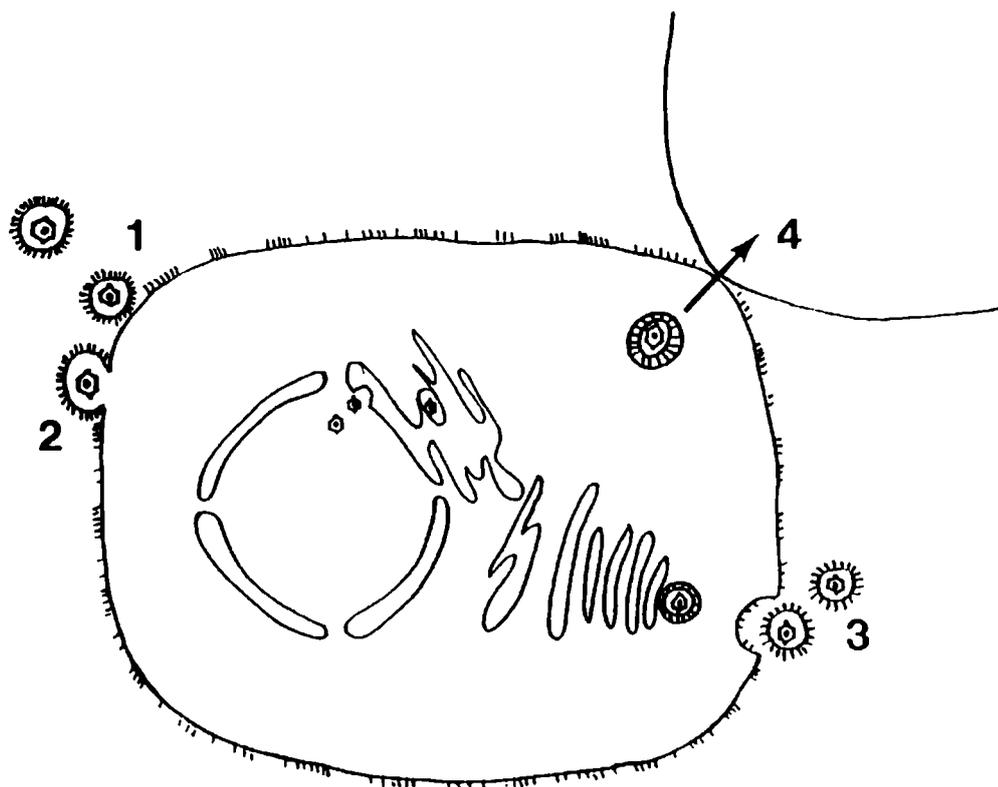
A- Mapa físico del genoma del SHV-1

B- Ubicación de las gps en el mapa obtenido con *Bam*HI de acuerdo con Mettenleiter, 1994.

U_1 y U_s regiones únicas larga y corta respectivamente

IR y TR repeticiones interna y terminal respectivamente

Figura 6: esquema que ilustra las funciones de las diferentes gps durante el ciclo replicativo del SHV-1 [Mettenleiter (135)].



- 1.- Adsorción (gC, gD)
- 2.- Penetración (gB, gD, gH/gL)
- 3.- Liberación (gE/gI, gC)
- 4.- Diseminación intercelular (gB, gH/gL, gE)

PARTE III

PSEUDORRABIA O ENFERMEDAD DE AUJESZKY

Presentación

La Enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorrabia es una enfermedad viral, contagiosa y aguda de muchas especies animales, causada por un herpesvirus (104). El virus herpes suino o de la Pseudorrabia (PRV), llamado de acuerdo a la nomenclatura internacional "Suid Herpesvirus 1" (SHV-1), pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia alfa herpesvirinae (176).

El huésped natural del PRV es el cerdo, especie en la cual la infección por este virus se manifiesta de diferentes maneras, según se trate de individuos adultos o jóvenes. Mientras que en los primeros causa abortos e infecciones latentes, para los segundos resulta letal (56, 111). Otras especies -salvajes y domésticas- también pueden ser infectadas por este virus (38, 146). En estos casos, la enfermedad tiene siempre un curso agudo y termina generalmente con la muerte de los individuos afectados (96, 159).

El primer informe acerca de esta virosis en la literatura científica fue realizado por Aladar Aujeszky en Hungría en 1902 (5), quien aisló el agente causal de bovinos, perros y gatos (5, 104). La enfermedad se detectó en Estados Unidos en 1813, descrita por Hanson, hecho que no fue publicado (96, 104, 146). En 1904, Marek describió la enfermedad en conejos de laboratorio, denominándola, Parálisis Bulbar Contagiosa; recién en 1910 fue demostrado que el agente infeccioso pasaba a través de filtros que retenían bacterias (146).

En 1931, Shope identificó el "Mad Itch", denominación que se daba a esta enfermedad en los Estados Unidos, como la EA o Pseudorrabia, nombre que deriva de la semejanza en la signología clínica con la rabia (96, 104).

La enfermedad fue cobrando cada vez más importancia en todo el mundo, ya que la intensificación de la producción porcina ha favorecido su difusión, provocando considerables pérdidas económicas (38, 224). Ha sido descrita en: Europa (87, 90, 113, 123), Rusia, América Central y del Sur (75), Estados Unidos (77), Nueva

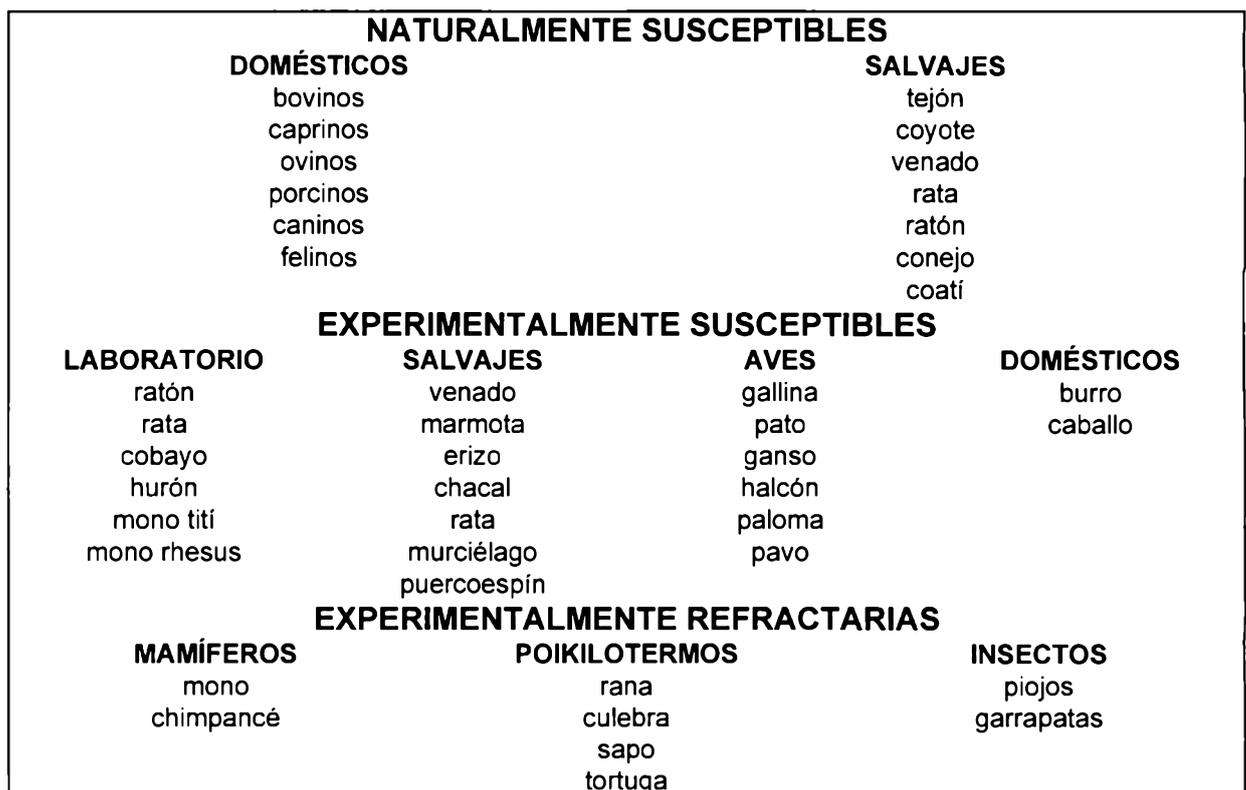
Zelandia (27, 46), China (105), Taiwán, Sudeste de Asia, Irán, India, Norte de Africa y Japón (96, 224), mientras que Australia, Canadá y Noruega están libres de EA (212).

En 1978, Ambrogi y colaboradores, diagnosticaron por primera vez la EA en Argentina y lograron el aislamiento del agente causal (4). A partir de ese año, los brotes de EA fueron ocurriendo, primero en las zonas de mayor producción porcina del país, para luego extenderse a otras regiones de menor intensidad de producción (40, 47, 48, 186, 140).

Animales susceptibles

Las infecciones naturales ocurren en cerdo, bovino, ovejas, perros y gatos, en animales salvajes como rata, ratón y zorro y experimentalmente en muchas especies incluídas las aves (146). Los cerdos y posiblemente los roedores son los huéspedes primarios del virus (24). La especies animales susceptibles, ya sea natural o experimentalmente, así como las especies refractarias experimentalmente son descritas en la figura 7, de acuerdo con Nara (146) quien destaca, la susceptibilidad natural del caballo y el burro y el hecho de que el hombre sería potencialmente susceptible de ser infectado, ya sea natural o experimentalmente. Si bien se han comunicado infecciones en humanos, no hay información suficiente como para considerarla de importancia en salud pública (38).

Figura 7: animales susceptibles al PRV [Nara (146)].



Epizootiología

La epizootiología del PRV no se conoce completamente, aunque el cerdo es considerado huésped natural y el principal reservorio del virus (146). Un hecho importante a tener en cuenta es la mayor resistencia que ofrece el cerdo a la infección en comparación con otros animales domésticos, observación que intenta explicar de que manera se perpetúa la enfermedad (96), ya que el cerdo adulto difícilmente sucumbe a ella (159).

Algunos investigadores sugieren que el cerdo que actúa como portador es la mayor fuente de infección, siendo la introducción de estos animales la causa más frecuente de infección en piaras. Sin embargo, se han observado epizootias en piaras cerradas y en estos casos, probablemente la fuente de contaminación hayan sido otros animales mamíferos -domésticos o salvajes- o aves (146). Inclusive, la enfermedad puede producirse conjuntamente en cerdos y otros animales domésticos de la misma granja (24). Otras fuentes de infección posibles serían: atmósfera, estiércol, aguas servidas, suelo y fomites (24), así como carnes, ganglios linfáticos, médula ósea, vísceras y carcasas contaminadas, (96, 146, 224) y a través de secreciones nasales, orofaríngeas, vaginales, prepuciales, leche y orina (159, 224). La sensibilidad a la infección depende de factores tales como: virulencia de la cepa, concentración viral, vías de penetración, especie, edad y estado del animal (224).

El hecho que los animales adultos puedan o no manifestar sintomatología, puede estar condicionado por el estado sanitario de la piara y/o por el estado fisiológico de cada cerdo (159). Asimismo, la susceptibilidad del cerdo se ve aumentada debido a fatigas provocadas por el transporte, cambios climáticos y otras situaciones de estrés (77), tales como escasez de alimentos y deficiencias inmunitarias, que pueden favorecer la manifestación clínica de la enfermedad en

piaras infectadas inaparentemente, por la reactivación del virus que se encuentra en estado latente (96, 159).

La latencia, propiedad de los herpesvirus, también constituye fuente de transmisión del virus (224). El virus que permanece en estado latente, lo hace en un tejido específico sin producir manifestación clínica, replicación viral o destrucción celular. Debido a un estímulo, el virus en estado latente, localizado en una célula - generalmente nerviosa- comienza a replicarse y la progenie se dirige por el axón hacia el sitio de infección inicial donde sigue replicándose y transmitiéndose a los demás animales a través de secreciones. Este modo de transmisión demuestra que la latencia viral juega un rol importante para la perpetuación de los herpesvirus en la naturaleza (179).

Signos clínicos

El conjunto de las manifestaciones clínicas provocadas por infecciones virales es muy amplio. Además, de acuerdo a la cepa viral, la edad del animal y la vía de infección, el mismo virus puede producir diferentes signos clínicos. El SHV-1, al igual que el BHV-1, constituyen ejemplos ilustrativos en ese sentido: la infección del cerdo por SHV-1 provoca abortos en las cerdas preñadas, septicemias en los recién nacidos, encefalitis en los lechones y enfermedad respiratoria en los cerdos jóvenes y adultos (199).

El período de incubación del PRV en cerdos, oscila entre 1 y 11 días, siendo por lo general de 3 a 6 días en infecciones naturales (224); luego de la inoculación experimental este período suele ser más corto -2 días- (24).

El cuadro clínico varía considerablemente según la edad del animal: cuanto más jóvenes más serios son los síntomas y más elevada la mortalidad (24, 38, 224). El índice de mortalidad llega al 100% en cerdos de menos de 2 semanas de edad, aproximadamente al 50% en cerdos de 3 semanas y disminuye a menos del 5% entre los 4 y 6 meses de vida (24, 38, 104, 224).

Los principales signos que se observan son respiratorios, nerviosos y reproductivos; sin embargo existen variaciones considerables en las manifestaciones clínicas según la virulencia y tropismo de la cepa infectante (24).

El síndrome fatal se describe aquí según las edades y categorías de los cerdos:

Lechones: los cerdos infectados inmediatamente después del nacimiento muestran signos clínicos en los primeros 2 días presentando respiración dificultosa, fiebre que puede llegar hasta 41,5°C, sialorrea, anorexia, vómitos, diarrea, temblores, depresión, ataxia, nistagmo, convulsiones, coma, y en general mueren antes de los 5 días de edad (224).

Cachorros: los primeros signos son tos, fiebre (40°C) y constipación en las primeras 48 hs. Junto con el progresivo aumento de temperatura aparecen anorexia y vómitos y alrededor del quinto día comienzan a aparecer signos nerviosos como temblores, incoordinación, espasmos, convulsiones, movimientos de pedaleo, sialorrea, ceguera, coma y muerte (96).

Adultos: la tasa de mortalidad no es elevada (2%), y predominan los signos respiratorios por sobre los nerviosos. Luego de un período de incubación de 2 o 3 días, comienzan con fiebre, tos y anorexia, seguidos de constipación, depresión, sialorrea y vómitos. Finalmente, aparecen los signos nerviosos precediendo al coma y muerte en los casos fatales (96). Dependiendo de condiciones predisponentes, en los adultos la infección puede causar sólo anorexia, agalactia, estreñimiento, disnea y estornudos (24). Algunos autores sostienen que es más frecuente la signología respiratoria en adultos, siempre acompañada por fiebre, y a menudo descargas nasales y tos (224). A diferencia de otros mamíferos como el bovino y el canino, no se observa prurito en los cerdos (224) pero sí ceguera (104).

Cerdas preñadas: la signología es semejante a la de los adultos, pero el virus atraviesa la barrera transplacentaria e infecta a los fetos. Si la infección ocurre en el embrión de entre 30 y 40 días de gestación, éstos se reabsorben. Si la gestación es más avanzada, entre 60 y 80 días, puede ocurrir expulsión prematura de los fetos macerados (96). La secuela más importante de infección durante la gestación es la infertilidad temporaria (96) o crónica, especialmente si los fetos son retenidos en el útero (197). Los signos de fallas reproductivas se caracterizan por abortos, maceración, momificación fetal y resorción embrionaria (197).

Patogenia

El SHV-1 es pantrópico y afecta a tejidos derivados de todas las capas embrionarias (24). La puerta natural de entrada del virus es el aparato respiratorio (56, 96), aunque experimentalmente puede reproducirse la enfermedad por todas las rutas de inoculación (104).

La replicación primaria del virus ocurre en las células de la mucosa nasofaríngea (56, 96, 104), para luego acceder a las células del bulbo olfatorio donde sucede la segunda replicación. A las 18 hs después de la exposición, el virus puede ser aislado del epitelio olfatorio y de las tonsilas y a las 24 hs del bulbo olfatorio (96).

La diseminación se realiza luego por los nervios trigémino y glossofaríngeo a través del axoplasma hacia la médula y protuberancia, de donde puede ser aislado a las 24 hs pi. En este período no existe viremia. Al mismo tiempo, las terminaciones nerviosas del trigémino en la cavidad oral y nasal lo transportan al ganglio de Gasser, situado en la protuberancia, provocando una intensa ganglioneuritis. En forma similar y paralela, el virus migra a través de las terminaciones nerviosas de las papilas linguales hacia el núcleo solitario de la médula (38).

Una vez alcanzado el sistema nervioso central (SNC), el virus se disemina rápidamente por todo el sistema nervioso, pudiendo encontrarse al séptimo día pi, hasta en los segmentos lumbares y sacrales de la médula espinal (56). Al octavo día el virus desaparece del cerebro, coincidiendo con la aparición de AcN en la sangre (24).

Conjuntamente, ocurre una infección de importancia secundaria en la mucosa naso-orofaríngea, el tracto respiratorio superior y los alvéolos pulmonares (96). Durante las primeras hs pi el virus puede ser aislado de faringe, tráquea y

posteriormente de pulmón (56). En este punto, la viremia es difícil de demostrar por su bajo título, y algunas evidencias experimentales indican que es intermitente; de cualquier manera, esta es la forma en que se disemina por todo el organismo.

No se observan grandes cambios en la fórmula leucocitaria, pero es frecuente la invasión de células parenquimatosas de diferentes órganos y del sistema linfático, por medio de los vasos linfáticos locales (38, 96, 104). La viremia en este punto es variable y puede relacionarse con cada cepa (38). Para otros autores, los leucocitos sanguíneos podrían ser otra vía de diseminación, ya que ha sido observado la presencia de virus en estas células (38, 104).

Latencia

Se define a la latencia como la persistencia silenciosa del virus en el organismo, el cual no es detectable mediante los procedimientos virológicos clásicos. Durante la latencia, el virus no puede ser detectado, pero sí su genoma. Esta es una propiedad compartida por todos los herpesvirus, lo que les permite persistir indefinidamente en el huésped después de una infección primaria o secundaria (199).

Para el establecimiento de la latencia, la replicación de los herpesvirus no es absolutamente necesaria, como lo demostraron Lofgren y colaboradores (108); sin embargo, aumenta considerablemente el número de los mismos en el organismo y por ende, la posibilidad de producir latencia (199). Para este fenómeno, se requiere además la expresión de algunos genes virales. El gen de TK, fue el primer gen de latencia reconocido, aunque no es absolutamente necesaria su presencia para la replicación como lo indican datos aportados por Field y Wildy y Kit y colaboradores, quienes hallaron fenómenos de latencia en mutantes TK negativas -TK(-)- (54, 94, 199).

Se describen tres localizaciones de latencia para los herpesvirus: nerviosa, epitelial y linfoide. En los miembros de la subfamilia alfa herpesvirinae la localización de la latencia ocurre en el sistema nervioso, principalmente en los ganglios nerviosos y especialmente el ganglio trigémino, como así también en los tejidos epiteliales (199).

Clásicamente, se describen dos estados latentes:

a- Un estado dinámico en donde la replicación viral se produce siempre en las células ganglionares infectadas en forma latente, de modo tal que en todo momento las células contienen una cantidad reducida de virus infeccioso (199).

b- Un estado estático: ninguna infección productiva ocurre en las células infectadas en forma latente en las que, sin embargo, se conserva la información genética viral, ya que el virus infeccioso puede obtenerse a través del cultivo in vitro de estas células (25, 199, 219).

Este último modelo parece ser el más probable, debido a que para el establecimiento del virus en estado latente no es absolutamente necesaria la replicación viral, ya que mutantes TS, incapaces de multiplicar en ratones, pueden existir en forma latente (108).

El hecho de que los herpesvirus son mantenidos en estado latente dentro de células específicas, demuestra que el establecimiento de la latencia requiere también funciones expresadas por esas células específicas (179). En el caso de los alfaherpesvirinae, una teoría considera que en el ganglio existen "células permisivas" para la replicación viral y que los Ac regulan la expresión de los virus, convirtiendo el potencial lítico de infección en no lítico o latente. Una segunda teoría sostiene que existen "células permisivas y no permisivas", en las primeras ocurre una infección productiva que sería eliminada por la RI y en las segundas se establece la infección latente. La tercera posibilidad es que las células normalmente son "no permisivas", pero trastornos en el metabolismo celular pueden alterarlas y con la infección viral se tornan "permisivas"; en este caso es la RI la que controlaría la extensión de la infección (166).

El genoma viral latente puede encontrarse integrado al ADN celular (-CMV-) o bajo la forma episómica, aunque en algunos casos (EBV) pueden coexistir ambas formas (34, 199). El PRV se encuentra integrado al genoma celular en forma lineal (34).

Durante la latencia, la transcripción del genoma viral es limitada, dando origen a regiones transcriptas que recorren en sentido opuesto a la orientación del transcripto de uno de los genes de PRV, el gen IE (29, 79). No se sabe aún si estas

zonas transcriptas juegan el rol de regular la latencia por interacción con el ARNm IE, o si están involucradas en la transición de latencia a reactivación, como ocurre en el caso del HSV (34). En estos virus esas regiones se denominan transcriptos asociados a latencia -LAT- (134). En SHV-1 las regiones LAT se originan de fragmentos 6, 14, 8', 8 y parte del 5 cuando el genoma viral es sometido a la acción de la enzima *Bam*HI (34). En muchos sistemas se ha demostrado que algunas partes del genoma se transcriben durante el período de latencia y en otros casos se define a la latencia como un bloqueo parcial de la transcripción (199). Es posible que las regiones del genoma que son transcripcionalmente activas durante la latencia actúen como soporte de los genes que intervienen en el mantenimiento de la misma. El nivel de expresión en el genoma viral varía según la localización de la latencia: cuando se produce en localización neuronal (alfaherpesvirinae) la transcripción es muy reducida. Por el contrario si la localización es en el linfocito, el genoma viral se expresa en mayor medida, y los Ag virales específicos están presentes en la superficie de la célula infectada en forma permanente (199).

El virus o su genoma en estado latente puede ser detectado en muchos órganos (16, 20, 34, 69, 185) y puede obtenerse por cocultivo de las células infectadas con células susceptibles (17).

El control de la latencia y los mecanismos que conducen a la reactivación viral, están estrechamente relacionados, ya que estos mecanismos proporcionan una orden contraria a la orden de mantenimiento del estado latente. El control por la RI supone al menos la expresión de Ag virales en la membrana de células infectadas en forma latente y por lo tanto esa RI tendría importancia en el control, pero al parecer, los miembros de la subfamilia alfaherpesvirinae no expresan Ag en las células infectadas en forma latente (199).

La reactivación -aparición de virus infecciosos en la localización de la latencia- está estimulada por muchos mecanismos: estrés, parto, transporte,

sobreinfección por otro virus, cambio de hábitat, por la inyección de drogas inmunodepresoras (17, 38, 41, 77), exposición a radiaciones UV y fiebre (134). Además de la inmunodepresión, la reactivación puede ser inducida por efecto directo de estímulos en las células latentemente infectadas, o por la combinación de ambos (199).

Sabo y Rajcani (185) demostraron el SHV-1 en tonsilas, nódulo linfático cervical, mucosa nasal y ganglio de Gasser, en explantos de tejidos de animales inmunodeprimidos con hidrocortisona (38). Wittmann y colaboradores (221) obtuvieron virus de animales tratados con prednisolona nueve meses y medio después de la infección inicial (38).

Beran y colaboradores (20) detectaron virus en cerdos infectados experimentalmente entre 6 semanas y 13 meses pi, combinando explantos de tejidos y técnicas de cocultivo (38).

La latencia ha sido observada en animales vacunados con vacunas a virus activo [Mock y colaboradores (138), Van Oirschot (208)], con vacuna inactivada [Wittmann y colaboradores (222, 223)], y en animales nacidos de madres vacunadas [Van Oirschot y Gielkens (209)].

Animales ya inmunizados pueden ser reinfectados, pero la superinfección no provoca invasión de los ganglios si los cerdos fueron infectados con una cepa virulenta (16, 38), por lo tanto el mecanismo inmune juega un rol muy importante en la inhibición de la colonización por la nueva cepa (38).

Además, cerdos con altas concentraciones de Ac maternos inmunizados con vacunas avirulentas, pueden desarrollar infección latente después de la exposición a virus virulentos (38, 209, 222).

El estado de portador o carrier es considerado la mayor fuente de virus en las piaras. Se ha demostrado que cerdos vacunados con vacuna activa modificada de

SHV-1 y expuestos a virus virulentos a las 3 semanas, eliminaban virus 3 meses después del tratamiento con dexametasona (146).

La reexcreción -presencia de virus infecciosos- en tejidos y órganos periféricos-, sólo se produce cuando los virus reactivados atraviesan diferentes barreras. Es un fenómeno controlado por la inmunidad específica (199).

Lesiones anatomopatológicas

Como ya se ha indicado, el virus de la pseudorrabia es pantrópico y provoca lesiones en diferentes tejidos y sistemas. De acuerdo a ello, las lesiones halladas en la necropsia varían según los síntomas dominantes. Cuando predominan los signos nerviosos, se observa un marcado aumento del líquido cefalorraquídeo, como así también congestión de las meninges, petequias en corteza y papilas renales, edema pulmonar, congestión nasal y faríngea, tonsilitis (a veces necrótica), faringitis y traqueítis (96, 146).

Los principales cambios histológicos se presentan a nivel del SNC, involucrándose tanto la sustancia blanca como la gris. Básicamente, esos cambios consisten en una meningoencefalitis no supurativa difusa y ganglioneuritis, caracterizada por necrosis neuronal, neuronofagia, gliosis perineuronal y manguitos perivasculares con predominio de células mononucleares -linfocitos-. Los cuerpos de inclusión (CI) intranucleares característicos: grandes, irregulares, eosinofílicos y separados de la membrana nuclear por un halo blanco, aparecen en neuronas y células gliales, como así también en las células linfáticas (96, 104, 146).

Los nódulos linfáticos también son afectados, presentando hiperplasia, hemorragias e infiltración neutrofílica (146).

En los neonatos, se presentan pequeños focos de necrosis a nivel de hígado y bazo además de las lesiones características del SNC (92, 197).

Las lesiones a nivel del aparato respiratorio se caracterizan por una marcada congestión y edema pulmonar, proliferación de células del sistema mononuclear fagocítico y en raras ocasiones, necrosis de los septos alveolares. En las vías aéreas superiores, se observa necrosis superficial o profunda, con la formación de sincicios con CI (96, 146). La presencia de estos CI es específica de la pseudorrabia

y por lo tanto es fácil distinguir las alteraciones de los pulmones de otras formas de neumonía de los cerdos (24).

Las lesiones placentarias en cerdas preñadas que han abortado por infección natural, consisten en placentitis necrosante y la existencia de CI intranucleares (24).

Inmunidad

Durante la infección primaria se desarrollan las primeras líneas de defensa de los mecanismos inespecíficos de reacción orgánica, representados por las células naturalmente asesinas (NK cells) e interferón. Las primeras producen citotoxicidad inespecífica en células infectadas con PRV y el segundo aumenta esa actividad, alcanzando su máxima producción entre los 3 a 4 días pi. Luego, ante una segunda exposición al virus, la RI específica es activada más rápidamente y actúa con mayor eficiencia en la defensa contra PRV (32).

La IMAc se demuestra por la presencia de IgM e IgG en el suero e IgA en las mucosas nasal e intestinal. Por medio de la prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se ha demostrado la presencia de IgM e IgG entre 5 y 6 días pi; la primera alcanza su máximo nivel entre los días 9 y 10 y luego disminuye, y la segunda entre los días 10 y 15 para luego permanecer constante (118, 175). Los AcN aparecen a los 7 días pi y alcanzan su pico máximo en aproximadamente 2 a 3 semanas, permaneciendo luego por varios meses. La IgA presente en mucosas aunque con débil actividad neutralizante, tiene una vida media corta y en la reinfección se estimula la replicación de los clones de plasmocitos específicos para IgA (9, 32).

La IMC es sumamente importante, luego de la infección, los virus interactúan rápidamente con macrófagos y linfocitos T (LT). Los primeros producen factor activante de los linfocitos, acrecentando de ese modo la sensibilización de LT para responder al Ag. Algunos macrófagos fagocitan un porcentaje de virus, y otros virus se unen a la membrana de macrófagos, convirtiéndolos en más inmunogénicos que si estuvieran aislados. Ante una reinfección, los LT ya están sensibilizados y se diferencian en células inmunes específicas, efectoras o LT citotóxicos que son los que actúan en la respuesta in vivo. En ese proceso, algunos de los LT se

transforman en LT de memoria, que circulan constantemente pudiéndose ubicar en nódulos linfáticos durante muchos años. Estas células sólo responderán ante la presencia del PRV. Luego de una reinfección, los LT cumplen sus funciones de diferentes maneras. Por un lado, producen sustancias solubles denominadas linfoquinas (factor de inhibición de la migración del macrófago=MIF, factor mitogénico=MF, factor de activación del macrófago=MAF, factor quimiotáctico de leucocitos=LCF), linfoquinas e interferón, o bien producen lisis de las células que contienen en su superficie PRV -citotoxicidad específica- (9).

En presencia de Ac, también los linfocitos no sensibilizados, los macrófagos y los polimorfonucleares, pueden producir lisis en células con virus en su superficie. Este tipo de citólisis se conoce con el nombre de citotoxicidad mediada por células dependiente de Ac -ADCC- (9).

Además, por su efecto inmunosupresor, PRV aumenta la severidad de las infecciones bacterianas (especialmente pulmonares) por *Pasteurella multocida* o *Streptococcus suis*, disminuyendo la actividad mitogénica y la síntesis de Interleuquina 2 *-in vivo-* y suprimiendo la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad 1 en líneas de células murinas y porcinas *-in vitro-* (32).

Vacunas

Vacunas clásicas-convencionales

Vacunas a virus activo modificado:

Son usadas numerosas variantes de vacunas del PRV con virulencia reducida, ya sea aislamientos de campo naturalmente atenuados (K 61 Bartha, NIA-4), cepas atenuadas a través de numerosos pasajes en huéspedes no naturales como huevos embrionados o cultivos celulares (BUK, A-26) o virus modificados por sustancias químicas -MK-25, MK-35- (134). La cepa BUK (europea) fue obtenida por más de 100 pasajes en huevos embrionados, lo cual disminuye la virulencia en cerdos, pero esta cepa es altamente patogénica para otros animales (139). La cepa K o Bartha fue obtenida a través de numerosos pasajes en cultivos celulares, donde se redujo su virulencia para el cerdo, siendo a la vez, menos patogénica para otros animales (139). La base molecular de atenuación de BUK y Bartha, fue localizada posteriormente en la región U_s del genoma de PRV (3,2 kbp) que codifica para gE y gI (18, 34, 139). Este tipo de vacunas ofrece la ventaja de inducir una RI semejante a la producida en la infección natural (139) ya que todas estas cepas vacunales multiplican en el sitio de inoculación (parenteral) y en los nódulos linfáticos regionales y usualmente en otros tejidos del animal. Los virus vacunales pueden luego aislarse de secreciones nasales. Los AcN aparecen entre las 2 semanas post vacunación y son de título bajo, y el efecto "booster" puede lograrse con una segunda vacunación a pesar que los títulos neutralizantes obtenidos son menores a aquellos inducidos por vacunas inactivadas (225). Si la vacuna es administrada en el sitio de la infección natural (intranasal), sobre todo con la cepa Bartha, la producción de Ac es mayor y de más duración (139), y además induce más protección al desafío viral, comparando con la administración parenteral de otras cepas a virus

modificado y a virus inactivado (139). La vacunación no previene la infección posterior con virus de campo, ni la excreción ni la latencia viral (225), pero protege de la sintomatología clínica (139) y en general, las propiedades inmunogénicas disminuyen con el grado de atenuación viral. Para lograr una mayor protección se recomiendan 2 dosis de este tipo de vacunas (225). Sin embargo son menos efectivas en comparación con el efecto producido con vacunas a virus inactivado, cuando se las administra a animales que ya fueron previamente inmunizados (139).

Estas vacunas presentan algunas desventajas:

- 1°- Podría producirse un aumento de la virulencia de la cepa durante su replicación en el animal huésped.
- 2°- Las células de cultivo utilizadas para la propagación viral pueden presentar agentes contaminantes como Leucosis Bovina, Simian Vacuolante Virus -SV-40-, Virus de la Diarrea Bovina, Parvovirus porcino y Citomegalovirus.
- 3°- El riesgo mayor lo constituye la administración de este tipo de vacunas a cerdas gestantes donde puede producir abortos.
- 4°- No son vacunas seguras para otros huéspedes.
- 5°- Poseen vida media limitada (139).

Este tipo de vacunas se utiliza durante las epizootias, ya que reducen la aparición de sintomatología clínica (139).

Vacunas a virus inactivado:

Los virus obtenidos a partir de cultivos celulares son inactivados con: etilenimina, glutaraldehído, formalina o beta propio lactona (139). Las vacunas con adyuvantes como hidróxido de aluminio producen menor protección que las que contienen adyuvantes oleosos (134). Existen en el mundo al menos 3 vacunas de este tipo, utilizando como sustrato células PK15 (139). Los títulos de Ac inducidos por vacunas a virus inactivado en primovacunación, son en general menores en

magnitud y duración que los inducidos por vacunas a virus vivo modificado. Una ventaja que poseen es que producen una buena respuesta secundaria (booster) en animales previamente vacunados con vacunas a virus activo modificado o infectados naturalmente con cepas de campo (139). Se recomienda la administración de 2 dosis separadas por un período de 3 a 6 semanas y revacunación cada 6 meses (225), aunque otros autores recomiendan no administrar más de 2 dosis ni utilizarlas en el caso de epizootias (139). La duración de la inmunidad depende de la calidad de la vacuna utilizada y de la reactividad individual del animal, obteniéndose entre 53 y 100% de protección en la primera vacunación. No se recomienda la vacunación de lechones de madres previamente vacunadas para que los Ac del calostro no interfieran con la inmunidad activa hasta la edad de 14 semanas. Aunque la replicación y excreción de virus es menor en los animales vacunados con este tipo de vacuna, la cantidad de virus excretado es suficiente como para infectar animales vacunados y no-vacunados por contacto (225) y no producen inmunidad en el sitio primario de replicación del virus (139).

Ambos tipos de vacunas convencionales han sido usadas por muchos años, para prevenir y controlar las formas clínicas de la enfermedad y sus complicaciones tanto en Estados Unidos como en Europa. Los cerdos inmunizados quedan protegidos contra los síntomas clínicos pero no contra la infección en sí misma, de tal modo que un animal que ha sido vacunado con esta vacuna puede ser infectado cuando es expuesto a virus de campo. Esto significa que, sin presentar síntomas clínicos el cerdo puede continuar excretando virus que replica en sus mucosas y puede quedar además infectado con virus de campo en forma latente que, a posteriori, puede reactivar y re-excretar (153). Otra desventaja que presentan es que no permiten diferenciar Ac inducidos por la vacunación de aquellos inducidos por la infección natural con virus de campo (139).

Vacunas de nueva generación

Para definir una vacuna de nueva generación se deben realizar estudios preliminares para definir cuáles son los componentes antigénicos del virión que producen la RI en el animal infectado. Determinar cuáles de esas proteínas juegan un rol principal en el desarrollo de la inmunidad, es esencial para el desarrollo de vacunas efectivas contra la EA (50).

Con el avance de la biotecnología y el conocimiento más profundo de la base molecular del virus, se están desarrollando un número importante de vacunas de nueva generación (153).

Vacunas a subunidades:

Son vacunas que sólo contienen componentes virales estructurales (subunidades) para provocar la RI. Para ello, en el caso del PRV, se utilizan como Ag las proteínas de la envoltura que son las que producen mayor RI (98). La forma más simple de remover las proteínas es extrayéndolas con detergentes no-iónicos (Nonidet P-40, Tritón X 100, etc) y separando las de la nucleocápside de las de la envoltura (125, 139, 191). Estas resultaron exitosas en la inmunización de ratones con posterior desafío (172), en la estimulación de Ac en cerdo (115, 162, 163) y en la protección del cerdo contra la enfermedad, aunque no contra la infección y latencia viral (115, 125, 162), cuando se exponen animales vacunados con vacunas de este tipo, aún a bajas dosis del virus (124).

Otro método para la obtención de subunidades proteicas virales incluye la síntesis de esos Ag específicos mediante el uso de ADN recombinante, ya sea en bacterias, levaduras, virus u otros vectores de mamíferos, que, cultivados in vitro, producen grandes cantidades del inmunógeno. De tal modo, la proteína así producida puede ser utilizada, combinada con adyuvantes, directamente como una vacuna a subunidades (139, 153). Otra alternativa es la síntesis química de regiones

inmunogénicas de la proteína, para producir las llamadas vacunas sintéticas (153). Las ventajas más notables de estas vacunas es que permiten diferenciar animales vacunados de infectados naturalmente, (los animales vacunados responden sólo a los Ag incluídos en las vacunas, mientras que los naturalmente infectados lo hacen a todos los Ag del virus) y que no producen latencia en los animales vacunados. Las desventajas radican en los altos costos de materiales y equipamiento, como así también la dificultad de preparación (139).

Las vacunas sintéticas han sido efectivas (163): inducen Ac apenas en menor magnitud que los producidos por vacunas convencionales, y reducen la morbilidad, mortalidad y eliminación de virus (139).

ISCOMS (Immunostimulant Complex):

Es un complejo inmunoestimulante en el cual las proteínas de membrana virales son presentadas en su forma multimérica. La matriz del ISCOM es un glucósido (Quil A) que en su forma micelar posee regiones accesibles para la interacción hidrofóbica con las proteínas de membrana, de manera de formar complejos física y bioquímicamente definidos, que son altamente inmunogénicos. Las proteínas que son incorporadas en los ISCOMS son generalmente glicosiladas (129). Se han obtenido vacunas de este tipo contra Influenza (143) Parainfluenza 3, Sarampión, Rabia (141) y BHV-1 (129), y demostraron en la experimentación mejor RI que la observada con las membranas proteicas sin Quil A (141). Según los resultados obtenidos inmunizando ratones, los ISCOMS producidos con proteínas del BHV-1, inducen Ac hemoaglutinantes y AcN (129).

La eficacia del uso de ISCOMS con proteínas de membrana del PRV fue evaluada en experiencias con ovinos, donde se compararon número de dosis y ruta de inoculación. Los resultados obtenidos concluyeron que se puede administrar

tanto por vía intradérmica como subcutánea y sólo con una dosis puede prevenirse la enfermedad. Con la incorporación selectiva de proteínas de la envoltura, permite discriminar entre animales vacunados con ISCOMS y naturalmente infectados (142).

Vacunas construídas por ingeniería genética:

Estas pueden ser mutantes de huésped, mutantes TS, mutantes por delección o recombinantes genéticos (139).

Una de las ventajas que ofrecen las vacunas con deleciones o mutaciones, es que permiten diferenciar entre animales infectados con cepas de campo y vacunados con este tipo de vacuna, ya que los animales así vacunados no producen Ac contra el producto del gen eliminado (134).

Los principales componentes inmunogénicos del virión se encuentran localizados en su envoltura (gB, gC, gD, gE). Varias de estas proteínas, si bien son importantes para una correcta replicación y virulencia, no son esenciales para la replicación y generación de progenie viral en la célula infectada; por lo tanto, los genes correspondientes a estas proteínas "no esenciales", pueden ser suprimidos del genoma viral sin perjudicar el ciclo infeccioso del virus (153).

La cepa Bucarest, cepa madre para este tipo de vacunas utilizadas en los Estados Unidos, tiene eliminado de su genoma el gen que codifica para la gE y la cepa Bartha, cepa madre de las vacunas de nueva generación europeas, presenta una eliminación completa del gen para gE, una eliminación parcial del gen gI y una expresión bastante limitada del producto del gen gC (139, 153). La cepa avirulenta Norden, tampoco codifica para gE (164).

Otra proteína funcional importante es la TK, esta enzima es esencial para la producción de latencia y neurovirulencia que caracteriza a este virus (93, 109, 139), y algunas subcepas mutantes por delección se han obtenido a partir de la cepa

Bucarest (95). Esta cepa BUK no tiene el gen de TK y aunque con virulencia reducida, (126, 134) induce la producción de AcN y no establece latencia (139), aunque algunos autores difieren en este concepto (128). La desventaja que posee es que no es posible diferenciar la inmunidad provocada por esta vacuna y la producida en forma natural ante la exposición al virus. Sin embargo, si además se deleta un gen que codifica para una proteína no esencial la diferenciación es posible [cepa BUK con gC(-) y TK(-)] (95). La mayor desventaja que posee este tipo de vacuna es la posibilidad de que el virus se recombine con otras cepas virales que presenten deleciones complementarias. Esta eventual recombinación puede llevar a la reaparición de cepas virulentas por complementación entre dos cepas atenuadas o la obtención de resultados erróneos con las pruebas diferenciales (139, 153).

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DIFERENCIALES:

La diferenciación se basa en la ausencia de Ac en animales vacunados a una gp específica del virus de campo, que no se encuentra en la vacuna. Algunas cepas del virus de la EA, ya sea por selección natural o por ingeniería genética, han perdido la habilidad de sintetizar determinadas gps en su estructura, y se han desarrollado por ello, pruebas inmunoenzimáticas que son selectivas para la detección de Ac específicos contra dichos Ag faltantes.

En 1984, Platt (163) desarrolló una vacuna a subunidades del PRV (derivada de lectinas), y usó como prueba diagnóstica el ELISA para detectar la subunidad antigénica (gG). Tanto la gC, gE y gG pueden ser usadas para el diagnóstico (53). En el caso de vacunas a subunidades, una de estas tres proteínas no se encuentra en la misma, y el producto del gen eliminado es el que se usa luego para las pruebas inmunoenzimáticas (139).

Van Oirschot y colaboradores en 1986 (210) describen por primera vez un test de ELISA para detectar Ac dirigidos específicamente contra gE: cerdos vacunados con cepa Bartha o Bucarest permanecían negativos para dicha prueba, mientras cerdos infectados por cepas de campo eran positivos. Utilizando AcMo dirigidos específicamente contra las proteínas en cuestión se han realizado varias pruebas inmunoenzimáticas (51, 211).

Análisis del ADN viral

El análisis mediante endonucleasas de restricción (ER) del genoma del PRV, ha sido utilizado para diferenciar aislamientos en casos en los que la aplicación de otras técnicas resultaron insuficientes: propiedades biológicas -resistencia al calor y a la tripsina-, habilidad de formar sincicios y virulencia en animales de laboratorio (7, 72, 80, 112, 160, 190). Las ER han sido usadas con éxito para comparar, además, los diversos aislamientos de HSV (36), EHV-1, BHV-1 (155) VZV y PRV (42).

El análisis mediante ER del ADN viral es una herramienta para la identificación de cepas del PRV aisladas durante epizootias. Su uso permite determinar si existe variabilidad genética del PRV, después de varios pasajes en cerdos (214) y qué cepas prevalecen en la población porcina (155).

La identificación específica de diferentes aislamientos del PRV por medio del análisis del patrón de fragmentos de restricción permite realizar estudios epizootiológicos (33, 84, 110, 120, 201), para el control de la enfermedad (63) y para diferenciar los distintos grupos virales actuantes (230). Así por ejemplo, puede utilizarse para diferenciar cepas virulentas de cepas vacunales (62). De hecho, esto fue realizado, comparando los genomas de 6 vacunas virulentas y 3 atenuadas de PRV, mediante cortes del ADN con 5 ER. De esta manera, pudieron ser detectadas diferencias, tanto en el tamaño como en la cantidad de los fragmentos de ADN de esas nueve cepas (155).

Los cambios entre los distintos genomas se deben a la pérdida o el cambio de lugar de un sitio específico de corte de la ER utilizada (148). La localización genética de los mayores fragmentos generados por ER, tales como *Bam*HI y *Kpn*I han sido descritos por Ben-Porat y Kaplan (17).

Herrmann y colaboradores (74) describen la existencia de 4 tipos de genomas de PRV distribuidos según las distintas áreas geográficas:

tipo I: Estados Unidos y Europa Central

tipo II: Europa Central

tipo III: Norte de Europa

tipo IV: Tailandia

Los genomas virales pueden analizarse de 2 maneras: a partir de un virus purificado, o mediante el ADN total extraído de células infectadas. Este último es un método rápido, generalmente no existe interferencia a causa del ADN celular, por lo que producir ADN viral a partir de células infectadas, resulta una alternativa para identificar genomas en un lapso más breve (148).

Diagnóstico

Las pruebas diagnósticas se basan en la detección directa del virus (por microscopía electrónica, por aislamiento e identificación del agente) (144), por la detección de Ag virales empleando técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia -IF- (137) y por detección del ADN viral por amplificación (PCR) o hibridización. Indirectamente, se puede analizar la infección viral por detección de Ac circulantes empleando técnicas como: inmunolectroforesis (154), radioinmunoensayo (91), prueba de ELISA (2, 66, 193, 202, 207, 227), inhibición de la migración leucocitaria, fijación del C' (21), hemaglutinación pasiva (101) y virus neutralización -VN- (66, 107, 207, 227).

En los últimos años y debido al incremento de la incidencia de la EA en el mundo, las pruebas serológicas y los métodos de detección viral en cortes de tejidos han incrementado su sensibilidad y especificidad. Los primeros métodos utilizados para la detección de Ac contra la Pseudorrabia fueron los de IF e inmunodifusión en gel de agar utilizando como Ag, viriones precipitados con sulfato de amonio (6, 68, 86, 107, 158, 220), extraídos enzimáticamente -tripsina-EDTA- (158) o mediante soluciones detergentes (127, 158).

Otras pruebas utilizadas son: contrainmunolectroforesis (6, 220), ensayo enzimático de inmunodifusión radial (66, 88), las variantes de ELISA - muestras de sangre en papel de filtro- (145, 189), ELISA de bloqueo (194), ELISA para detectar Ag viral en tejidos (165), dot-ELISA (1, 149, 196), y pruebas de látex (196).

Las técnicas que permiten evaluar la presencia de Ag virales en cortes de tejidos, son las de Inmunoperoxidasa, utilizando un complejo peroxidasa anti-peroxidasa -PAP- (44), la enzima peroxidasa conjugada a un antisuero (3, 8, 28, 151, 183), el complejo ABC (avidina- biotina) (119, 147), y técnicas de oro inmune -Inmunogold- (45).

Otras técnicas más sensibles y aún más sofisticadas, son las denominadas técnicas de hibridización, que permiten identificar secuencias del ADN viral en cortes de tejidos, mediante sondas o probes conjugados con enzimas como la biotina (10, 35) o con sustancias radioactivas (10, 11, 12, 69, 70, 106, 122, 173, 184) y PCR (31, 59, 67,85, 188, 198).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta investigación fue comparar las gps del SHV-1 y al mismo tiempo conocer las diferencias en los patrones de restricción del ADN de las cepas virales aisladas en nuestro país y las de referencia procedentes de otros países.

OBJETIVOS PARCIALES

1.- Analizar las propiedades biológicas de cepas virales de diferentes zonas geográficas y aisladas en distintos períodos.

2.- Determinar si existen diferencias en la respuesta de AcN contra las distintas cepas.

3.- Determinar el grado de homología que existe entre las proteínas de las diferentes cepas de acuerdo a su PM.

4.- Determinar si se presentan variaciones en los patrones de restricción del ADN que indiquen diferencias de comportamiento de las distintas cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas virales: origen e historia

En este trabajo se utilizaron 9 cepas virales: 5 aisladas en nuestro país y 4 de referencia internacional. A continuación de la denominación de cada una de ellas se hace una pequeña descripción de su origen.

Río Cuarto 79 (RC/79): el brote comenzó en la zona de Río Cuarto (Córdoba) en marzo de 1979, en un establecimiento con explotación mixta, donde la cría de cerdos era de tipo extensiva, ocasionando la muerte de lechones de entre 1 y 8 semanas de vida, 4 caninos y 1 ovino (4). Esta cepa viral fue cedida por el Dr. A. Ambroggi de la UNRC y fue la primera aislada en nuestro país.

Mercedes (Mer): en noviembre de 1981 fue diagnosticado un brote de EA en un establecimiento de cría intensiva de la zona de Villa Mercedes (San Luis). Esta epizootia ocasionó la muerte del 100% de lechones de hasta 45 días de vida y abortos en cerdas durante su último tercio de gestación (186). Estos cerdos habían sido importados poco tiempo antes de los Países Bajos y luego que la EA fuera diagnosticada se aplicó el rifle sanitario (Fondevila, comunicación personal). Esta cepa viral fue cedida por el Dr. N. Fondevila, INTA Castelar.

Chañar Ladeado 7 y 15 (CL-7 y CL-15): ambas cepas fueron aisladas en nuestro laboratorio, a partir del cerebro de 2 lechones provenientes de un mismo establecimiento, durante la epizootia que ocurrió en el invierno de 1988 en la zona de Chañar Ladeado (Santa Fé) (47).

Trenque Lauquen 92 (TL/92): esta cepa fue aislada en nuestro laboratorio, del cerebro de un lechón perteneciente a un establecimiento situado en ese partido de la provincia de Buenos Aires, en septiembre de 1992.

Sweden 66 (S-66): cepa aislada durante la segunda epizootia de EA ocurrida en Suecia en 1966, a partir de tonsilas de un lechón muerto con sintomatología nerviosa clásica (174). Esta cepa fue cedida por el Dr. J. Moreno Lopez, Uppsala, Suecia.

Indiana Sullivan (Ind-S): cepa aislada en Estados Unidos en 1962 (155).

Alfort (Alf): cepa francesa aislada en el distrito del mismo nombre (74), cedida por el Dr. C. Pianovi, Gelab (SENASA).

Yamagata 81 (YS-81): primer cepa aislada en Japón en 1981 (58). Esta cepa viral, así también como Ind-S fueron obtenidas en el National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japón.

En la tabla 4 se resumen datos de interés de estas 9 cepas virales.

Tabla 4: denominación, origen y número de pasajes en cultivos celulares de las cepas de PRV analizadas

NOMBRE	N° DE PASAJES (*)	LUGAR Y AÑO DE AISLAMIENTO	REFERENCIAS
RC/79	bajo	Río IV/Córdoba/Arg./1979	(4)
Mer	@	Mercedes/San Luis/Arg./1981	(186)
CL-7	bajo	C.Ladeado/Santa Fe/Arg./1988	(47)
CL-15	bajo	C.Ladeado/Santa Fe/Arg./1988	(47)
TL/92	bajo	T.Lauquen/Bs.As./Arg./1992	-
S-66	@	Sweden/1966	(174)
Ind-S	@	Indiana/EEUU/1962	(155)
Alf	@	Alfort/Francia	(74)
YS-81	@	Yamagata/Japón/1981	(58)

(*) bajo indica < 12 pasajes en cultivos celulares previos al plaqueo. Alto indica > 12 pasajes. (@) indica dato no disponible. Se desconoce en numero de pasajes sufridos antes de llegar a nuestro laboratorio).

OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE CEPAS VIRALES DE DIFERENTES ZONAS GEOGRÁFICAS Y AISLADAS EN DISTINTOS PERÍODOS.

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL ECP EN DISTINTOS CULTIVOS CELULARES DE LÍNEA

1.1-1 Medios y soluciones de cultivo: como medio de crecimiento celular (MC) se utilizó Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco (DMEM, Laboratorios Nissui, Japón) con el agregado de 0,3 mg/ml de glutamina, 200 UI/ml de penicilina, 0,5 mg/ml de estreptomicina, 20 UI/ml de nistatina y 10% de suero fetal bovino (SFB). El pH final del medio fue de 7,2 logrado con la adición de bicarbonato de sodio al 7,5%. El medio de mantenimiento celular (MM) fue el mismo que el anterior pero con un porcentaje reducido de SFB (2%). Para determinadas experiencias se utilizó medio de cultivo sin suero (MSS).

Para la disgregación de las monocapas celulares se utilizó una solución de tripsina (Laboratorios Difco, USA) al 0,25% y sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,2% en solución tamponada de fosfatos (PBS).

1.1-2 Cultivos celulares: fueron utilizadas las siguientes líneas celulares: Porcine Kidney - riñón de cerdo - (PK15); Continuous Porcine Kidney - riñón de cerdo- (CPK); Rabbit Kidney - riñón de conejo - (RK13); Madin Darby Bovine Kidney - riñón de bovino - (MDBK); Crandell's Feline Kidney - riñón de gato- [CRFK] (37) y Helen Lane - tumor humano - (HeLa), cedidas por la Universidad de Tokio y el Instituto Nacional de Salud Animal del Japón. Otra línea celular utilizada fue Baby Hamster Kidney - riñón de hamster- (BHK) cedida por el Laboratorio Med Vet, La Plata.

1.1-3 Replicación viral: todas las cepas fueron replicadas entre dos y tres veces sobre las células de origen porcino (CPK), desarrolladas en frascos de vidrio de diferentes capacidades. Los sobrenadantes correspondientes fueron luego centrifugados, divididos en tubos Eppendorf (0,5 ml) y congelados a -70°C hasta su uso.

1.1-4 Titulación viral en microplacas: se realizó la siembra de células (CPK) y la inoculación del material viral en forma simultánea. Las diluciones virales se efectuaron en base logarítmica 10 en MSS (desde 10^{-1} a 10^{-10}). Se cargaron los pocillos con 0,05 ml de la dilución viral correspondiente, utilizando 5 pocillos por cada una y se adicionaron 0,1 ml de células CPK ($1,5 \times 10^5$ células/ml). Como controles de células, se cargaron pocillos, reemplazando el inóculo por MSS. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 , se controlaron diariamente y la lectura final se realizó a los 6 días, calculándose el título viral mediante el método de Reed y Muench.

1.1-5 ECP en células teñidas con hematoxilina y eosina (H-E): Todas las líneas celulares fueron sembradas utilizando MC, en una concentración de 2×10^5 a 5×10^5 células/ml, en cajas de Petri de 60 mm de diámetro (19 cm^2) que contenían 1 cubreobjetos de $18 \times 18 \text{ mm}$ cada una. Se utilizaron 10 cajas de Petri por cada una de las células utilizadas: 9 fueron empleadas para cada una de las cepas virales, y una para las células control sin inocular. Una vez que las monocapas fueron confluentes sobre los cubreobjetos, el MC fue aspirado y cada una de las cajas fue inoculada con 0,5 ml de cada una de las cepas virales (títulos entre $10^{6,5}$ y $10^{7,5}$ $\text{DICT}_{50}/0,05 \text{ ml}$), dejándose en adsorción a 37°C durante 60 min en atmósfera con 5% de CO_2 . Posteriormente, se retiraron los inóculos, se lavaron las monocapas con PBS y finalmente se colocaron 6 ml de MM en cada placa. Fueron incubadas en

las condiciones antedichas durante 14 hs, a excepción de las que contenían RK13 que solo fueron incubadas durante 9 hs. Luego de este período fueron lavadas 3 veces con PBS y los cubreobjetos fueron fijados con solución de Carnoy durante 15 min. Por último, cada monocapa fue teñida con el método convencional de H y E.

1.2 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Para este trabajo se utilizaron células CPK, solución fisiológica -ClNa 0,15 M- (SF), SFB, bicarbonato de sodio, medio 199, MM, MC, tripsina, éter y cloroformo de alta calidad. Todas las pruebas fueron realizadas en microplacas de fondo plano de 96 pocillos, las cuales fueron incubadas a 37°C en atmósfera reducida de CO₂ durante 6 días (60).

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1.2-1 Acción del calor: se efectuaron las diluciones virales en SF en tubos por duplicado los que fueron incubados a Baño de María (BM) a 56°C durante 15 min y a 56°C durante 30 min respectivamente.

1.2-2 Acción de la tripsina: se efectuaron diluciones en partes iguales de tripsina al 1% (0,5 ml) e inóculo puro (0,5 ml), logrando una concentración final de tripsina de 0,5%. El mismo procedimiento se realizó con tripsina al 0,2% (concentración final 0,1%). Se mantuvo el pH en 7,2 con bicarbonato de sodio y se incubaron los tubos a 37°C durante 60 min a BM. Posteriormente la tripsina fue inactivada con el agregado de 0,1 ml de SFB.

1.2-3 Acción del pH: se realizaron las diluciones virales en Medio 199 (pH 3) y se incubaron a 4°C durante 18 hs.

1.2-4 Acción del éter: se mezclaron 0,1 ml de éter y 0,5 ml de virus (concentración final 20%), se agitaron los tubos durante 10 min y la mezcla se incubó a 4°C durante 18 hs. Luego, los tubos se centrifugaron a 1200 x g en rotor 3N (centrífuga Tomy Seiko) durante 10 min, el éter fue aspirado y el inóculo diluido e inoculado.

1.2-5 Acción del cloroformo: se mezclaron 2 ml de virus con 0,1 ml de cloroformo (concentración final 5%), y se procedió de la misma forma que con el éter.

Las diluciones virales fueron realizadas en base logarítmica 10 (10^{-1} a 10^{-8}) y cada una de ellas inoculada en 5 pocillos (0,05 ml) con 0,1 ml de células CPK. Se dejaron como controles negativos células sin inocular, y como controles positivos, una titulación paralela de cada virus sin tratamiento en cada microplaca.

OBJETIVO 2: DETERMINAR SI EXISTEN DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA DE AcN CONTRA LAS DISTINTAS CEPAS.

2.1 PREPARACIÓN DE LOS Ag

2.1.1- Obtención de Ag de membrana: (membrana citoplásmica celular modificada por las gps virales). Se infectaron células MDBK crecidas en dos botellas de 740 cm² en sistema "roller", con 15 ml de inóculo cada una (1/10 en MSS) con un título entre 10⁶ y 10⁷ DICT₅₀/0,05 ml de cada una de las cepas virales. Luego de la adsorción a 37°C durante 60 min, se completó a 100 ml con MSS y se dejó en incubación en las mismas condiciones, hasta la aparición de ECP generalizado. Las células fueron recogidas junto con los medios y se centrifugaron a 3.200 x g en rotor 5N (centrífuga Tomy Seiko) durante 15 min. El sobrenadante se conservó congelado y el pellet celular fue lavado con buffer TEN (20 mM Tris-ClH pH 7,4; 0,1mM EDTA; 10mM ClNa) y centrifugado nuevamente como en el paso anterior. El pellet obtenido fue resuspendido en una concentración entre 50 y 100 veces menor al volumen del medio de cultivo sobrenadante original, en buffer TEN-1% detergente Nonidet P-40. Esta solución se incorporó lentamente, con la precaución de no producir espuma y se dejó a 4°C durante 60 min. Por último, se centrifugó a 7.500 x g durante 20 min en el mismo rotor y centrífuga, se descartó el pellet y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 90.000 x g en rotor 80 Ti (Beckman L8-80) durante 60 min. El Ag resultante fue dividido en alícuotas y conservado a -70°C hasta su uso (149).

2.1.2- Obtención de virus concentrado: el sobrenadante clarificado de cada uno de los cultivos inoculados con cada cepa viral, obtenido de acuerdo al punto anteriormente citado, fue concentrado mediante ultracentrifugación en un rotor Beckman 50 Ti a 100.000 x g durante 3 hs. El pellet obtenido fue resuspendido en

un volumen de PBS 200 veces menor al volumen de medio original y titulado en microplacas. Los títulos obtenidos oscilaron entre $10^{5,5}$ y $10^{6,75}$ DICT₅₀/0,05 ml. Posteriormente cada uno de ellos fue inactivado con luz UV durante 15 min (en placa de Petri de 60 mm situada a 30 cm de la lámpara germicida) y titulado para comprobar su inactivación.

2.2- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. ESQUEMA DE INOCULACIÓN

Se utilizaron ratas convencionales Long Evans machos de 2 meses de edad. Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo para controlar que no fuesen tóxicos y fueran carentes de Ac anti-SHV-1. Estos sueros se utilizaron como controles negativos de cada uno de los animales utilizados. Las inoculaciones fueron realizadas por vía intraperitoneal con intervalos de 15 a 20 días entre cada una. La primera se realizó con 0,25 ml de virus inactivado y 0,25 ml de adyuvante completo de Freund; la segunda, con iguales volúmenes pero utilizando adyuvante incompleto; la tercera con 0,5 ml de virus sin adyuvante y la cuarta, con 0,5 ml de Ag de membrana. Previamente a cada inoculación, se sangraron los animales y se titularon los sueros.

Los sueros anti-PRV fueron obtenidos mediante punción cardíaca y sangrado a blanco de las ratas. Fueron centrifugados para eliminar los elementos formes, divididos en alícuotas y congelados hasta su uso. Parte de ellos fueron inactivados a 56°C durante 30 min.

2.3- VN CRUZADA

Se usaron 100 partículas infectivas/0,025 ml de cada una de las cepas virales. Fue utilizado C' heterólogo liofilizado, diluido 1:20 en MSS, dividido en

alícuotas y congelado a -80°C hasta su uso. Se enfrentó cada una de las cepas virales con los 9 antisueros producidos; 2 con sueros descomplementados y 2 con sueros descomplementados y el agregado de C' heterólogo (total 36 placas). El método utilizado fue el convencional suero variable - virus constante de acuerdo a Martin y colaboradores (118).

Se colocó 0,025 ml de MSS a todos los pocillos de las placas mas 0,025 ml adicionales a los pocillos de titulación y control de células. Luego fueron agregados 0,025 ml de cada uno de los sueros anti-PRV en los pocillos correspondientes, por duplicado, y 0,025 ml de suero normal de la rata de la cepa viral ensayada. Se realizaron las diluciones en base logarítmica 2 con pipeta multicanal, tomando 0,025 ml desde la hilera H hasta la A. Luego se adicionó 0,025 ml de la dilución viral correspondiente a 100 partículas virales a cada una de los pocillos menos en el de control celular. En la placa de titulación se agregó 0,05 ml de cada dilución desde 10^{-2} a 10^{-10} . Posteriormente se adicionaron 0,025 ml de C' o el mismo volumen de MSS según las placas y se mantuvo en incubación durante 60 min a 37°C en 5% de CO_2 , agitando suavemente cada 15 min para favorecer la neutralización del virus por los Ac. Finalmente, se les agregó a todos los pocillos 0,1 ml de la suspensión de células y se dejaron en incubación hasta el 6° día en que se determinó el título neutralizante de los sueros.

OBJETIVO 3: DETERMINAR EL GRADO DE HOMOLOGÍA QUE EXISTE ENTRE LAS PROTEÍNAS DE LAS DIFERENTES CEPAS DE ACUERDO A SU PM

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.

Se trabajó con una solución stock de 30-0,8% de acrilamida-bisacrilamida y se utilizaron distintas concentraciones de la misma entre 7,5 y 15% para la preparación de los geles. Se empleó un sistema de buffer discontinuo, que desencadena un gradiente de voltaje, para lo que se usaron buffers Tris-ClH pH 8,8 y 6,8 y buffer de reservorio pH 8,8, básicamente de acuerdo al método descrito por Laemmli (103). Las cantidades de persulfato de amonio (APS), tetra metil etilen diamina (TEMED) y dodecil sulfato de sodio (SDS) fue ajustada para el tiempo óptimo de polimerización según las concentraciones de acril-bisacrilamida utilizadas como se observa en la tabla 5.

Tabla 5: cantidades de reactivos utilizados en las corridas de poli(acrilamida) (PAA) de acuerdo al tamaño de poro requerido

Gel de corrida	7,5%	10%	12,5%	15%
Acril-bisacrilamida (30-0,8%)	7,5 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml
Tris ClH (0,5M) ph 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Agua destilada	14,5 ml	12 ml	9,5 ml	7 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
SDS (10%)	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
APS (1%)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

El gel concentrador o stacking, donde se encuentran los pocillos de siembra se utilizó al 4% y se preparó como sigue:

Acril-bisacrilamida (30-0,8%)	1,33 ml
Tris-ClH (0,5 M ph 6,8	2,5 ml
Agua destilada	6 ml
TEMED	0,01 ml
SDS (10%)	0,1 ml
APS (1%)	0,1 ml

Las muestras fueron procesadas para trabajar en condiciones reducidas (R) y no reducidas (NR), por lo tanto el buffer de muestra fue preparado con y sin 2 mercaptoetanol:

Buffer de muestra	R	NR
<i>Tris-ClH (0,5M) ph 6.8</i>	0,250 ml	0,250 ml
<i>SDS (10%)</i>	0,400 ml	0,400 ml
<i>2 Mercaptoetanol</i>	0,100 ml	-----
<i>Glicerol</i>	0,400 ml	0,400 ml
<i>Agua destilada</i>	0,850 ml	0,950 ml
<i>Azul de bromofenol</i>	0,020 ml	0,020 ml

Fueron sembrados hasta 0,050 ml de muestra (Ag de membrana) y 0,010 de marcador de PM en las placas grandes (170 x 190 x 1 mm) y hasta 0,030 ml de muestra (Ag de membrana y virus purificados) y 0,005 ml de marcador en las pequeñas (90 x 100 x 1 mm).

Las condiciones de corrida se estandarizaron a 36 mA para los geles grandes durante 3,5 hs y 100 V para los pequeños durante 1-3 hs por placa aproximadamente pero se ensayaron voltaje y amperaje continuo y discontinuo y el buffer de corrida utilizado fue el siguiente:

Buffer de corrida	10 X
<i>Tris</i>	30,2 g
<i>Glicina</i>	144 g
<i>Agua destilada</i>	csp 1000 ml
<i>SDS (10%)</i>	0,01 ml / 1000 ml 1X

La tinción de los geles fue realizada con azul brillante de Coomassie que detecta de 0,2 a 1 μ g de proteína (187).

Azul de Coomassie	0,5 g
Metanol	208,3 ml
Agua destilada	208,3 ml
Acido acético glacial	83,3 ml

Esta solución colorante se dejó actuar al menos 4 hs a temperatura ambiente (TA) y posteriormente los geles se decoloraron en agitación durante 12 hs como mínimo en una solución de metanol ácido (30% metanol, 10% ácido acético glacial).

3.2 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN VIRAL

3.2.1- Virus concentrado: fue utilizado el descrito en el punto 2.1.2- sin inactivar.

3.2.2- Virus purificado en gradientes de sucrosa: sobrenadantes de cultivos de células CPK (en sistema roller de 740 cm²) infectados con las diferentes cepas (títulos entre 10⁶ y 10⁷ DICT₅₀/0,05 ml) fueron clarificados por centrifugación a 10.000 x g en rotor 5N (centrífuga Tomy Seiko) durante 20 min y luego concentrados por ultracentrifugación a 100.000 x g durante 120 min (rotor 50 Ti Beckman). Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml de buffer TE (1mM EDTA, 10 mM Tris-ClH pH 7,4) y posteriormente colocados sobre un gradiente discontinuo de sucrosa 20-60%. Se centrifugó a 120.000 x g durante 120 min (rotor SW 28 Beckman) y la banda de partículas virales obtenida fue resuspendida nuevamente en buffer TE y centrifugada a 55.000 x g durante 120 min (rotor 80 Ti Beckman). El pellet final obtenido fue resuspendido en 0,1 ml de buffer TE.

3.2.3- Virus purificado en gradientes de tartrato de potasio: se procedió del mismo modo que en el punto 3.2.2- pero se reemplazó la sucrosa por un

gradiente continuo de tartrato de potasio 10-40% en buffer TE (206). El pellet final fue resuspendido en 0,1 ml de buffer TE.

3.3 ANTÍGENOS UTILIZADOS EN SDS-PAGE

Fueron utilizados los citados en los puntos 2.1.1-, según la concentración de proteínas analizadas por espectrofotometría, y puntos 3.2.1-, 3.2.2- y 3.2.3- en condiciones de R y NR, utilizando partes iguales de Ag y buffer e hirviendo las muestras a 100°C durante 3 min para desnaturalizar las proteínas.

3.4 MARCADORES DE PM

3.4.1- De alto PM: (330.000 a 18.500 D) fue resuspendido en buffer de muestra en condiciones reducidas. Las bandas obtenidas según la indicación comercial son las siguientes: 330 kD (tiroglobulina), 220 kD (ferritina), 67 kD (albúmina), 60 kD (catalasa), 36 kD (lactato dehidrogenasa) y 18,5 kD (ferritina). Las concentraciones de los componentes del buffer fueron utilizados según indicaciones del laboratorio (Pharmacia).

3.4.2- De bajo PM: (94.000 a 14.400 D), resuspendido en el mismo buffer se obtienen según la indicación comercial (Pharmacia), 6 bandas de: 94 kD (fosforilasa B), 67 kD (albúmina), 43 kD (ovoalbúmina), 30 kD (anhidrasa carbónica), 20,1 kD (inhibidor de tripsina) y 14,4 kD (alfa lactoalbúmina).

3.5 TRANSFERENCIA E INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN PAPEL DE NITROCELULOSA (WESTERN BLOTTING -WB-)

Los Ag utilizados en esta técnica fueron los explicados en el punto 2.2.1-. Se utilizó el sistema de transferencia húmeda. El gel de PAA (pequeño) fue colocado directamente contactando con una membrana de nitrocelulosa (NC) (0,45 m BioRad) previamente humedecida en buffer de transferencia (BT) (25mM tris, 192mM glicina, metanol 200 ml, agua destilada csp 800 ml). Posteriormente, la membrana y el gel fueron colocados entre dos hojas de papel de filtro, también humedecido en BT. Por pasaje de corriente eléctrica, las proteínas se transfirieron desde el gel a la membrana (desde el cátodo - hacia el ánodo +). El tiempo óptimo de transferencia fue directamente proporcional al voltaje utilizado; se ensayaron tiempos variando V y mA. Una vez finalizada la transferencia, el papel de NC fue sumergido en tris buffer salino -TBS- (20mM tris-ClH pH 7,4, 0,5M ClNa) durante 15 min. Para corroborar la transferencia, el gel fue teñido con azul de Coomassie. Las zonas correspondientes a marcadores de PM de la membrana transferida fueron teñidas con una solución al 0,1% de amido black, 50% de metanol y 10% de ácido acético durante 15 min y enjuagados abundantemente con agua de canilla.

Luego se procedió al bloqueo de sitios de pegamiento no específico sobre la membrana utilizando 1% de seroalbúmina bovina en TBS durante 60 min y en agitación a TA. A partir de aquí se realizan varias etapas de lavado (3 de 5 min cada una) con 0,05% de Tween 20 en TBS (TTBS). Luego se incubó con el primer anticuerpo (conejo anti-PRV) diluído 1:750 en 1% de gelatina en TTBS (TTBSG) durante 120 min en agitación muy suave a 37°C. Se lavó con TTBS 3 veces y se incubó con el segundo Ac (cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa) diluído 1:750 en TTBSG durante 60 min en agitación suave a 37°C. Se efectuaron 3 lavados con TTBS y uno con TBS, para luego sumergir el papel en la solución de

sustrato (0,03% de Diaminobencidina, 0,03% de H₂O₂ en TBS) hasta la aparición de bandas visibles. La reacción fue frenada con el lavado y abundante enjuague con agua de canilla.

OBJETIVO 4: DETERMINAR SI SE PRESENTAN VARIACIONES EN LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN DEL ADN QUE INDIQUEN DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO DE LAS DISTINTAS CEPAS

4.1 CLONADO POR EL METODO DE FORMACIÓN DE PLACAS LÍTICAS BAJO CAPA DE AGAR Y OBTENCIÓN DE "STOCK" VIRAL

El clonado se utiliza para obtener poblaciones víricas puras y uniformes. Se obtienen placas de lisis bajo capa de agar, de este modo es sencillo levantarlas y propagar esa colonia para la obtención de un "stock" viral.

Se trabajó en placas descartables de 6 pocillos (Corning, USA) de 9,5 cm² de superficie cada una. Se utilizaron monocapas confluentes de células CPK. Se efectuaron diluciones en base logarítmica 10 de cada una de las cepas virales utilizando MM, se aspiró el MC de los pocillos y se colocaron 0,1 ml de cada dilución (de 10⁻² a 10⁻⁷ DICT₅₀/0,05 ml). Se dejó adsorber el inóculo a 37°C durante 60 min en atmósfera de 5% CO₂, se aspiraron los inóculos y luego se cubrieron con 3 ml/pocillo de medio de plaqueo (MP) constituido por partes iguales de solución A y solución B:

Solución A: medio de cultivo 2 X al 4% SFB (MEM 2 X, 0,6 mg/ml de glutamina; 400 UI/ml de penicilina; 1 mg/ml de estreptomina y 4% de SFB). El pH se elevó a 7,2 mediante el agregado de bicarbonato de sodio al 7,5 %. Este medio se mantuvo a 37°C.

Solución B: agar noble (Laboratorio Difco) al 1,8% en agua tridestilada, autoclavado y mantenido a 48°C hasta su uso.

Las placas se mantuvieron a TA hasta la solidificación del agar y luego se incubaron a 37°C en 5% CO₂ durante 2 a 3 días. Posteriormente se agregó un segundo MP conteniendo rojo neutro 0,2%, colorante que difunde y tiñe las células

vivas, y previa solidificación se dejaron en incubación durante 2 a 3 hs. Las placas incoloras fueron numeradas, se eligieron 5 o 6 y las mismas fueron recogidas del pocillo que permitió contarlas lo suficientemente separadas, mediante tips estériles y resuspendidas y congeladas en tubos individuales a -70°C en 2 ml de MM. Los tubos fueron congelados y descongelados 3 veces cada uno y se inocularon 0,05 ml de cada una en microplacas con células CPK, para verificar si todas ellas contenían virus. Se repitió la purificación por el método de placas líticas haciendo sólo 2 diluciones base logarítmica 10 cada una (puro, 10^{-1} y 10^{-2}) y obteniendo el mayor número posible de placas aisladas, que de igual manera fueron recogidas mediante tips y congeladas en 2 ml de MM. Se obtuvieron en total 60 placas líticas positivas de las 9 cepas virales.

4.1-1 "Stock" viral: los tubos conteniendo las colonias de la segunda purificación fueron congelados y descongelados 3 veces y se infectaron con ellos monocapas completas de células CPK crecidas en frascos de 5 ml con MC. Luego de la aparición de ECP completo (aproximadamente 48 hs) se infectó otra monocapa similar pero utilizando 0,1 ml de inóculo en 0,9 de MM. Luego de 48 hs de incubación y cuando la monocapa fue levantada, se recogió el sobrenadante, se centrifugó para separar los detritos celulares ($3.500 \times g$ rotor 5N centrifuga Tomy Seiko durante 15 min) y se congeló fraccionado (1 ml) a -70°C en tubos apropiados hasta su uso en pruebas futuras.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CELULAS INFECTADAS

Monocapas de células CPK crecidas en placas de Petri de 100 mm de diámetro (75 cm^2) fueron infectadas con 1 ml de cada "stock" viral. Luego de la adsorción a 37°C en atmósfera de CO_2 durante 1 hora se completó con MSS. El

método utilizado para la extracción del ADN es el descrito por Nishimori y colaboradores (148) con algunas modificaciones. Luego de la aparición de ECP completo, todo el material fue recogido (sobrenadante y células), centrifugado a $2.000 \times g$ durante 10 min en rotor 3N (centrífuga Tomy Seiko) y el pellet resuspendido y lavado con PBS. Este pellet fue posteriormente resuspendido en 10 ml de buffer-proteínasa K (100 mM Tris-ClH pH 7,5; 12,5 mM EDTA pH 8; 150 mM ClNa; 1% SDS) y 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteínasa K, mezclado suavemente para evitar la formación de espuma e incubado a 50°C durante 4 hs. Posteriormente se agregó un volumen igual de fenol saturado en buffer TE (partes iguales de TE, fenol y el agregado de una pequeña cantidad de hidroxiquinolina) y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo durante 20 min. Se centrifugó a bajas revoluciones, de modo de separar las dos fases: la acuosa superior que contiene el ADN disuelto y la fenólica inferior que contiene restos celulares y proteínas disueltas. La fase superior fue transferida a otro tubo (aproximadamente 8 ml) y se le adicionó la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico -25:24:1-. Se mezcló de la misma manera, se centrifugó y la fase acuosa superior fue dividida en alícuotas (0,2 ml) y se precipitó el ADN adicionando 2,5 volúmenes de etanol puro frío. Cuidadosamente, se lavaron los pellet obtenidos 2 veces con etanol 70%; se desecaron mediante bomba de vacío y se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.3 ER Y MARCADOR DE PM

La denominación y otras características de las ER utilizadas se observan en la tabla 6.

Tabla 6: nombre, sitio específico de reconocimiento, condiciones salinas, laboratorio y unidades de cada una de las ER utilizadas en el presente trabajo.

<i>ER</i>	<i>Sitio de corte</i>	<i>Buffer</i>	<i>Laboratorio</i>	<i>Unidades/μl</i>
<i>BamHI</i>	5'G*GATC C 3' 3'C CTAG*G 5'	muy salino	Wako	20
<i>KpnI</i>	5'G GTAC*C 3' 3'C*CATG G 5'	no salino	Wako	20
<i>HindIII</i>	5'A*AGCT T 3' 3'T TCGA*A 5'	poco salino	Wako	10
<i>XbaI</i>	5'T*CTAG A 3' 3'A GATC*T 5'	muy salino	Wako	20
<i>PstI</i>	5'C TGCA*G 3' 3'G*ACGT C 5'	poco o muy salino	Boehringer	12
<i>SacI</i>	5'G AGCT*C 3' 3'C*TCGA G 5'	no salino	Boehringer	10

El nombre de cada ER se forma tomando la inicial del género y abreviatura de la especie de bacteria de la que provienen. El sitio de corte específico se indica con (*) sobre las dos cadenas de ADN con su secuencia de reconocimiento.

4.3-1 Marcador de PM: el marcador utilizado fue ADN del fago Lambda cortado con la ER *HindIII* (marker I), que fue utilizado diluido 1:10 o 1:15 en buffer de carga (BC: 60% de sucrosa; 0,01M tris-ClH, pH 7,4; 0,01M EDTA; 0,1% azul de bromofenol) según concentración original del Laboratorio. Previo a la adición del azul de bromofenol, el marcador fue sometido a 65°C durante 2 min para separar la banda 4 de la banda 1, proceso que requiere al menos 5mM de EDTA para ser efectivo. Las bandas que pueden obtenerse son las siguientes (expresadas en kbp): 1.- 23,1; 2.- 9,4; 3.- 6,6; 4.- 4,4; 5.- 2,3; 6.- 2,0; 7.- 0,56; 8.- 0,12

Se utilizaron 0,005 y 0,01 ml de ADN de fago Lambda según el tamaño de los geles respectivamente.

4.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Cada ADN desecado fue disuelto en 0,04 ml de agua tridestilada estéril durante toda la noche a 4°C. Luego se le agregó 0,005 ml de la ER e igual volumen de buffer correspondiente. Se mezcló cuidadosamente y se incubaron todas las muestras a 37°C durante 4 hs. Posteriormente se sometieron a electroforesis en minigel de agarosa (25 ml agarosa al 0,8% en buffer TAE - 40 mM tris-ClH pH 7,8, 5mM acetato de sodio, 1 mM EDTA -) 0,01 ml de muestra y 0,001 ml de BC durante 60 min a 100 V, para comprobar la presencia de ADN y la efectividad de las ER. Posteriormente, todos los ADN digeridos con las 6 ER (0,02 ml y 0,002 ml BC), fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (140 x 150 x 5mm) al 0,7% en TAE, a 30 V durante 14 hs. Por último, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 10 min, observados en un transiluminador de luz UV y fotografiados con film Polaroid tipo 667.

RESULTADOS

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL ECP EN DISTINTOS CULTIVOS CELULARES

Todas las cepas virales empleadas fueron replicadas en diferentes sustratos celulares: PK15, CPK, RK13, MDBK, CRFK, HeLa y BHK . Todas las nombradas son células de tipo epitelial, excepto BHK que es de tipo fibroblástica. El tiempo de incubación de las cepas virales en las células fue de 14 hs, excepto en el caso de la línea RK13 que solo resistió 9 hs de incubación antes de que el ECP fuera total. Tanto las células RK13 como las CRFK forman sincicios espontáneos en los controles sin inocular, de aproximadamente 4 células promedio cada uno.

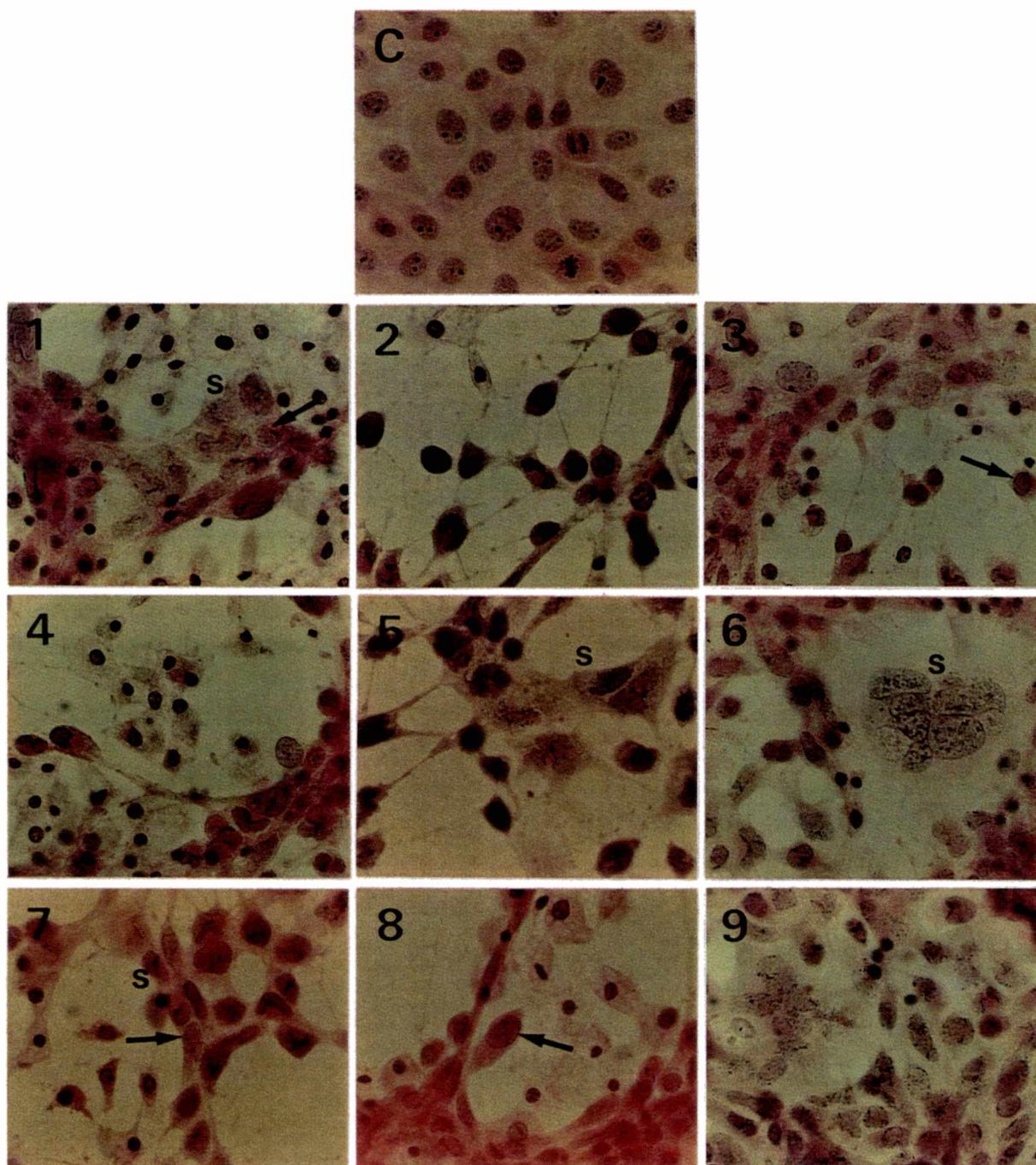
En la tabla 7 se resumen las características de ECP presentado por las distintas cepas virales en los diferentes sustratos celulares. Las figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 ilustran dichas características.

Tabla 7: características de ECP de las cepas virales en los diferentes sustratos celulares

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66	Ind-S	Aif	YS-81
PK15*	A, CR, P, CI, S								
CPK*	A, CR, P, CI	A, CR, CI	A, CR, P, CI	A, CR, P, CI	A, CR, P, CI	A, CR, CI	A, CR, P, CI, S	A, CI	A, CR, P, CI
RK13**	A, P, S								
MDBK**	A, CR, P, CI, S								
CRFK***	CR, CI, S								
HeLa*	CR, CI, S								
BHK****	CR, CI, S								

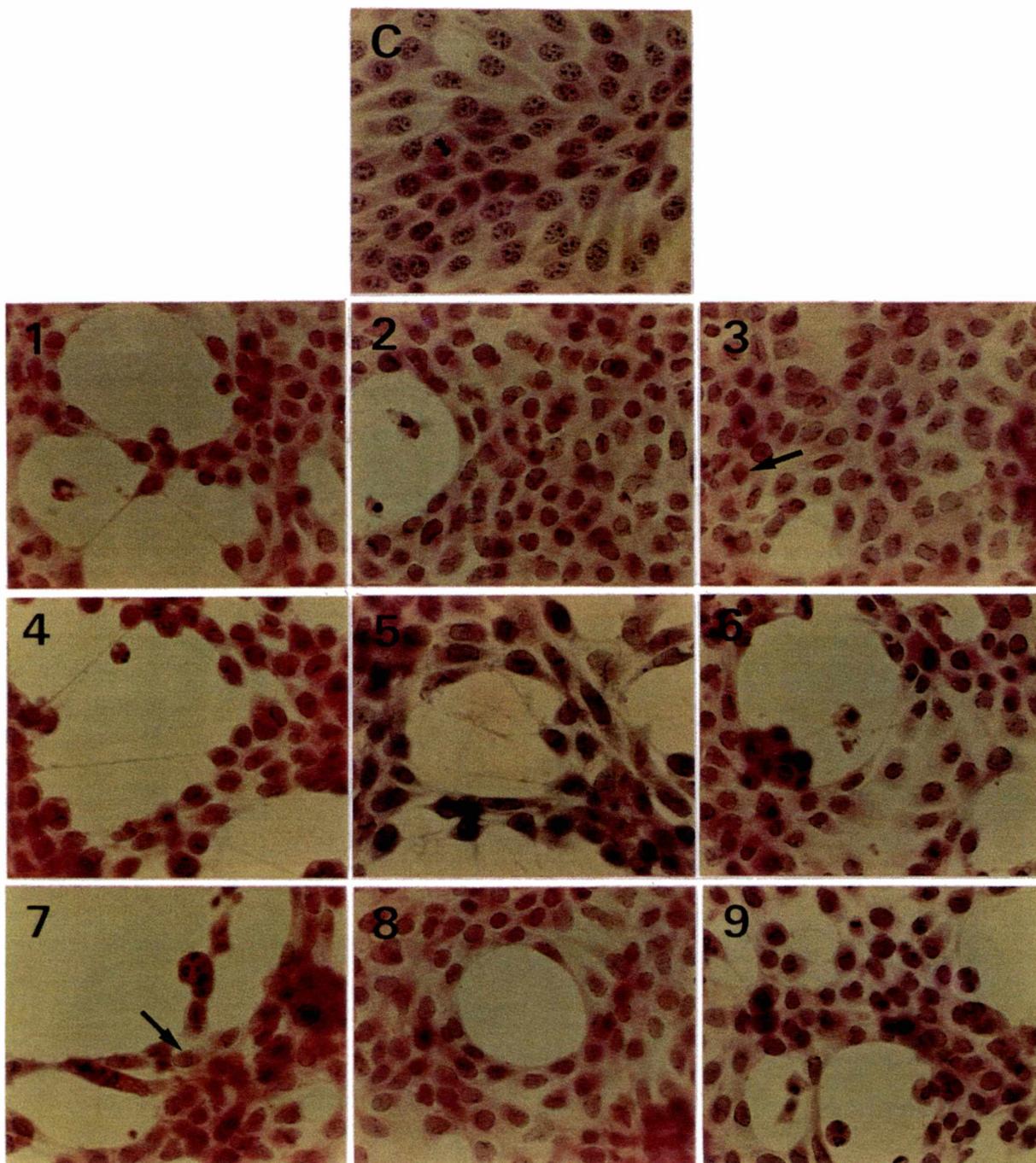
Referencias: A=agujeros; CR=células redondas; P=puentes; CI=cuerpos de inclusión intranucleares; S=sincicios. * sincicios pequeños de 5 células promedio ** sincicios gigantes, apariencia de ser toda la monocapa un gran sincicio *** sincicios grandes (20 células promedio) y pequeños (6 células promedio) juntos **** sincicios de 10 células promedio.

Figura 8: células PK15 infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



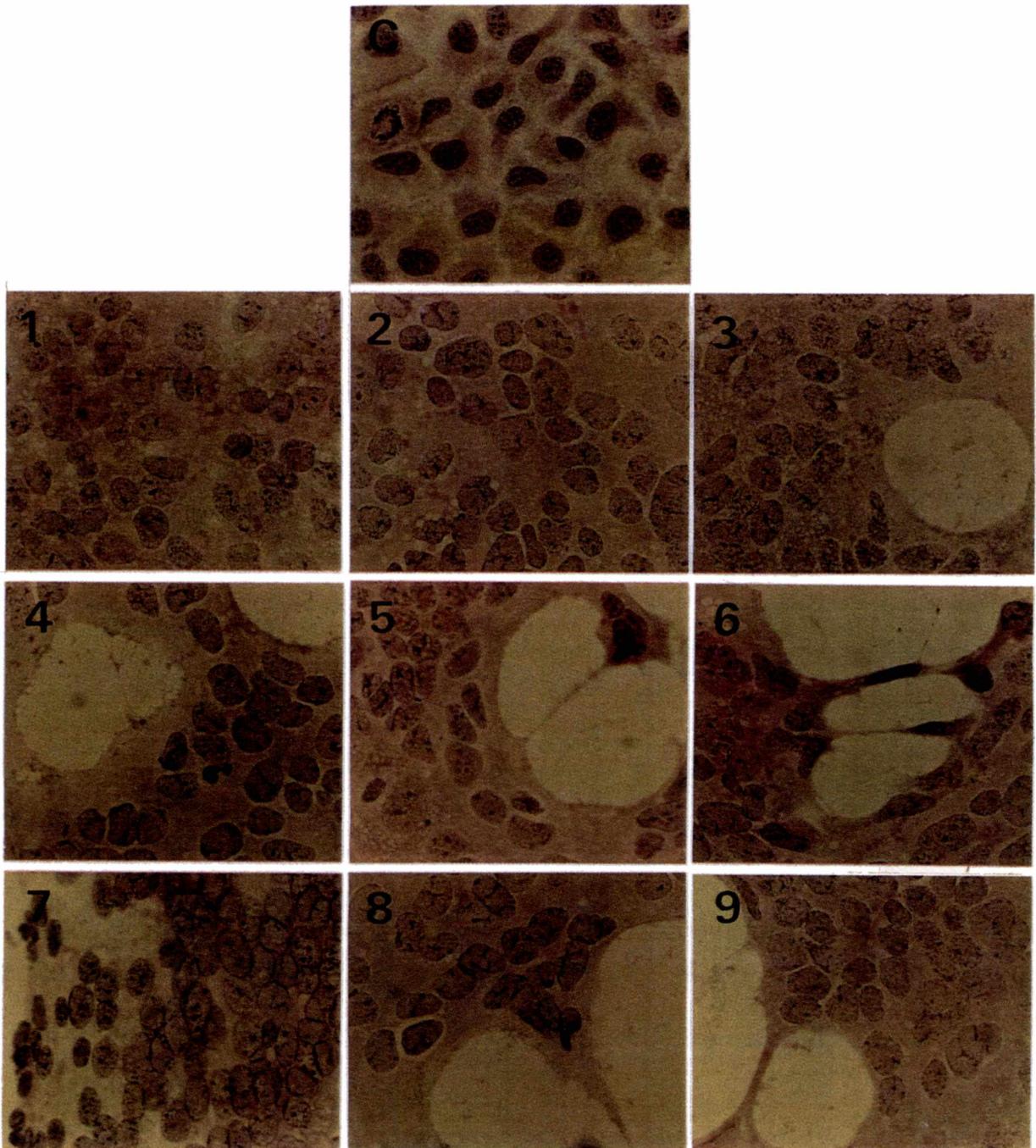
El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). "S" señala sincicio y las flechas cuerpos de inclusión intranucleares. Tinción H y E. (400 X).

Figura 9: células CPK infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



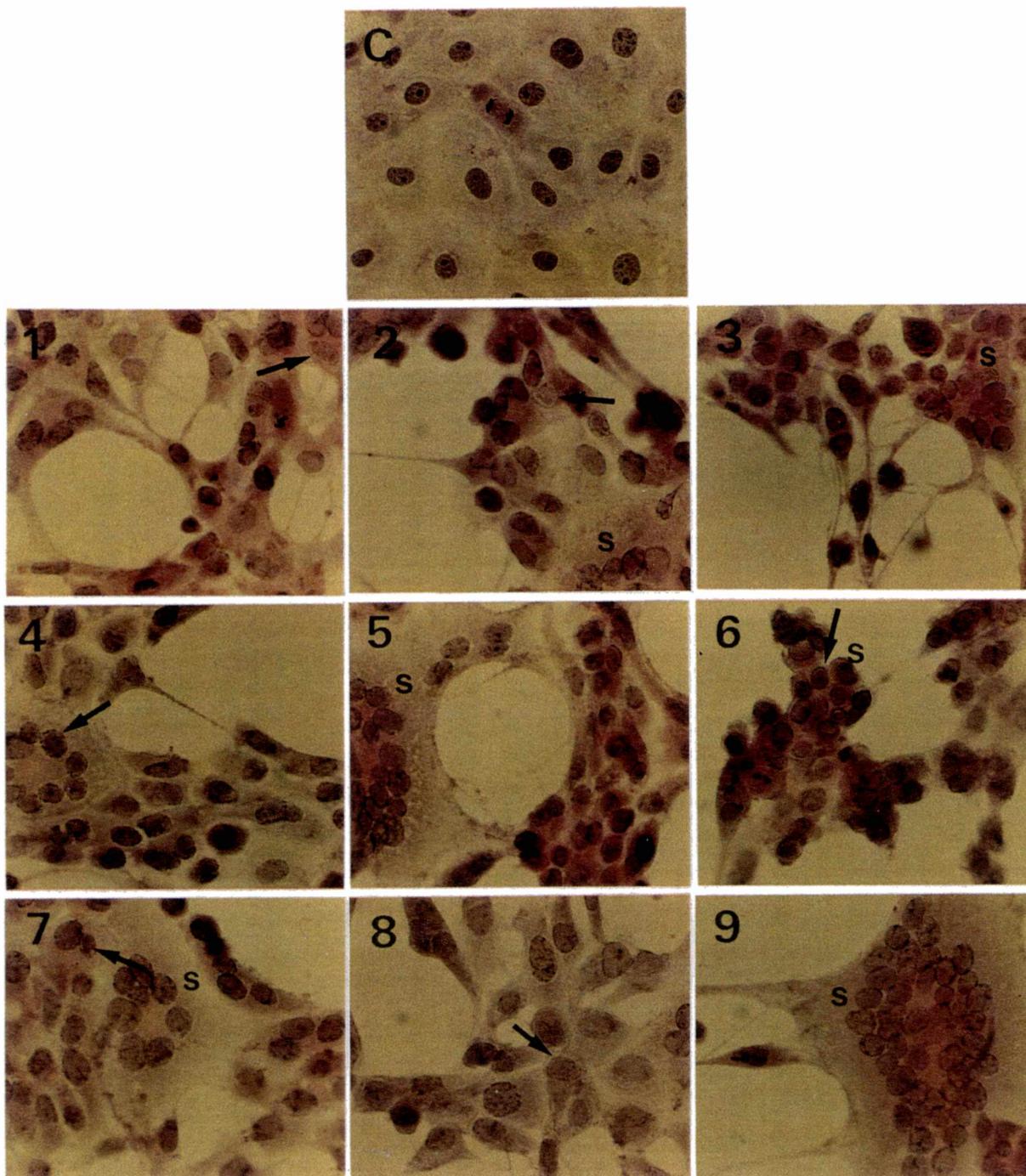
El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Las flechas señalan cuerpos de inclusión intranucleares. Tinción H y E. (400 X).

Figura 10: células RK-13 infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



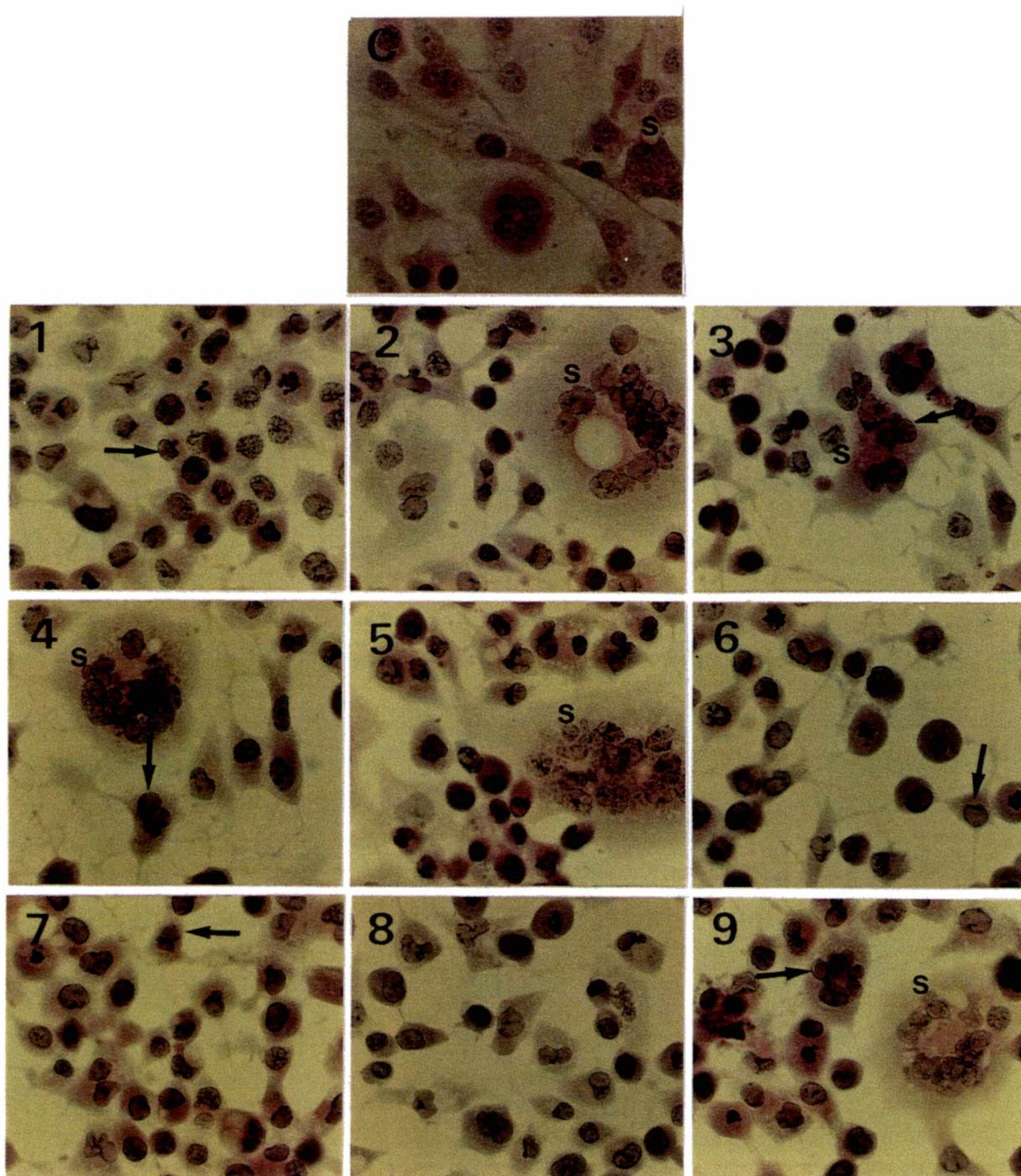
El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Todas las monocapas infectadas tienen aspecto de gran masa sincicial. Tinción H y E. (400X).

Figura 11: células MDBK infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



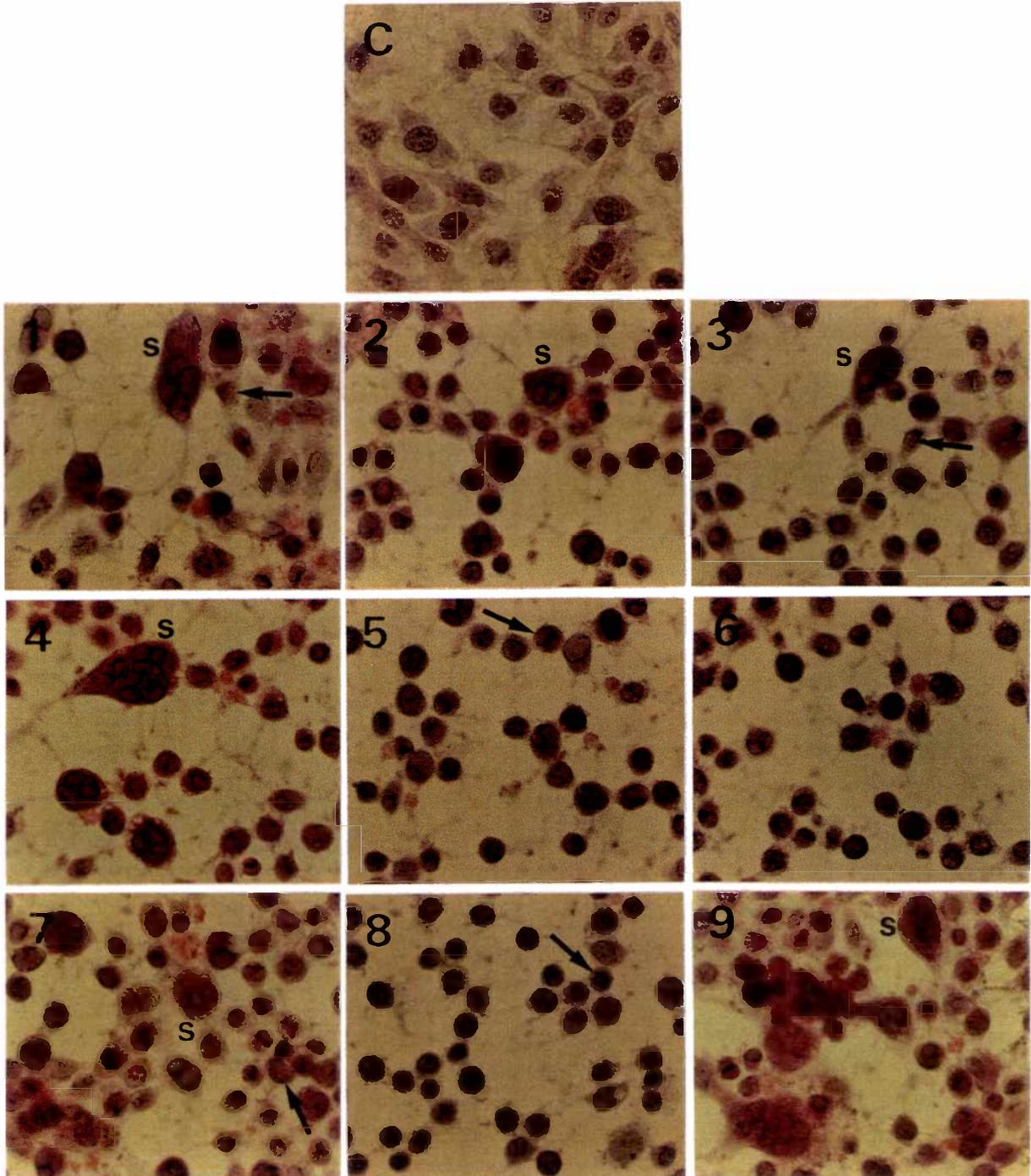
El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). "S" señala sincicio y las flechas cuerpos de inclusión intranucleares. Tinción H y E. (400 X).

Figura 12: células CRFK infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



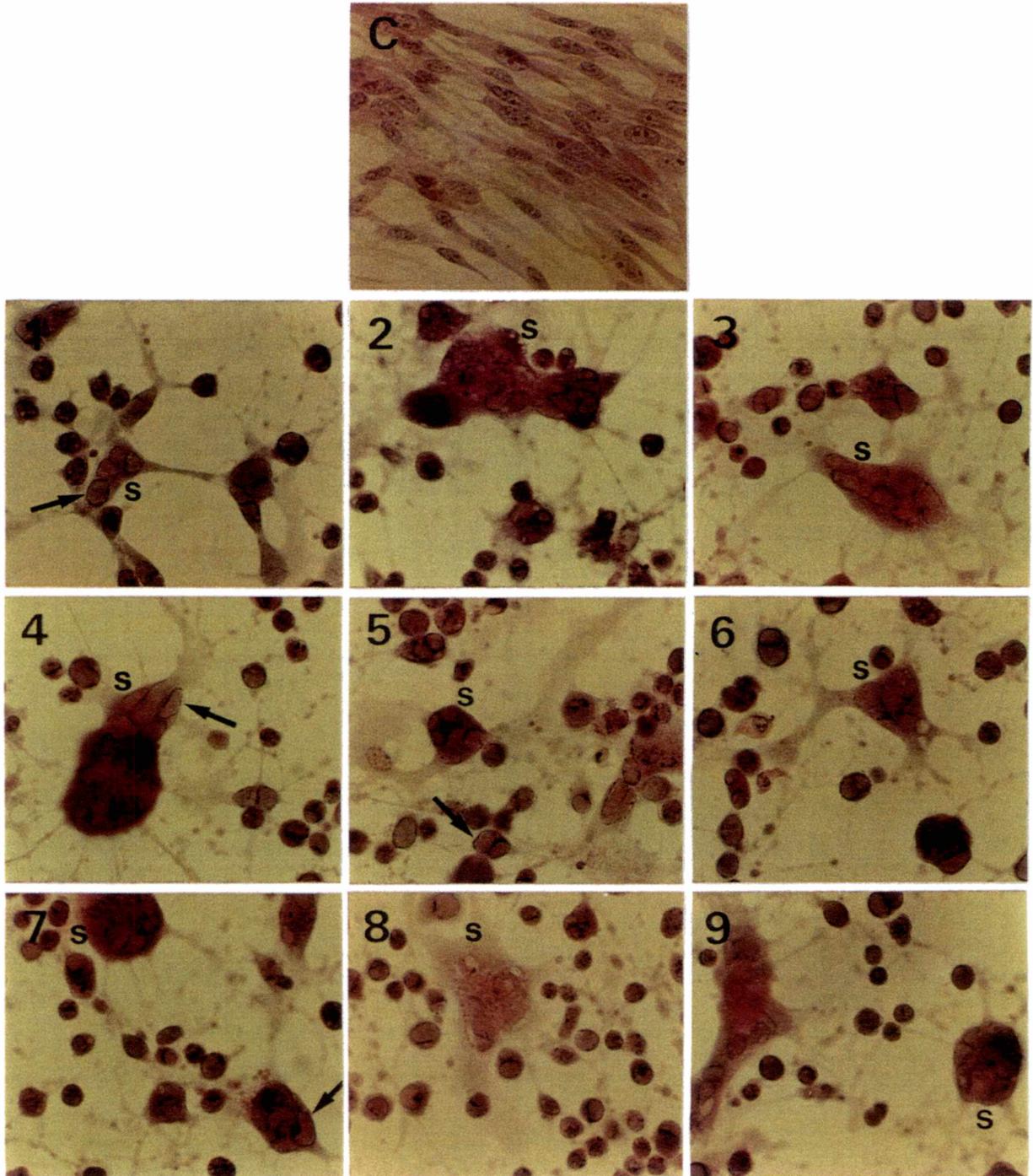
El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). "S" señala sincicio y las flechas cuerpos de inclusión intranucleares. Tinción H y E (400 X).

Figura 13: células HeLa infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). "S" señala sincicio y las flechas cuerpos de inclusión intranucleares. Tinción H y E (400 X).

Figura 14: células BHK infectadas con cada una de las diferentes cepas virales y las características de ECP que presentan.



El control sin inocular (C) y las diferentes cepas virales son: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). "S" señala sincicio y las flechas cuerpos de inclusión intranucleares. Tinción H y E (400 X).

1.2 PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Tabla 8: pruebas de caracterización físico-química realizadas en las 9 cepas de PRV:

A

	<i>RC/79</i>	<i>Mer</i>	<i>CL-7</i>	<i>CL-15</i>	<i>TL/92</i>	<i>S-66</i>	<i>Ind-S</i>	<i>Alf</i>	<i>YS-81</i>
Título*	10 ⁷	10 ^{7,75}	10 ^{6,5}	10 ^{7,5}	10 ^{7,5}	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{7,5}	10 ^{7,5}
Eter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorof.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trip. 0,5	10 ^{2,25}	10 ⁴	10 ^{3,75}	10 ^{3,5}	10 ⁵	10 ⁴	10 ^{2,75}	10 ^{2,5}	10 ^{4,25}
Trip. 0,1	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{6,25}	10 ⁷	10 ^{5,75}	10 ^{5,75}	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{7,25}
56° 15'	10 ^{1,5}	10 ^{2,25}	10 ^{1,5}	10 ^{0,75}	10 ^{2,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,5}
56° 30'	10 ^{0,75}	-	-	10 ¹	10 ^{1,5}	-	-	-	10 ^{1,5}
pH 3	10 ^{1,5}	-	-	-	10 ^{1,5}	10 ¹	-	-	-

B

	<i>RC/79</i>	<i>Mer</i>	<i>CL-7</i>	<i>CL-15</i>	<i>TL-92</i>	<i>S-66</i>	<i>Ind-S</i>	<i>Alf</i>	<i>YS-81</i>
Trip. 0,5	4,75	3,75	2,75	4	2,5	2,5	4,25	5	3,25
Trip. 0,1	0,5	0,75	0,25	0,5	1,75	0,75	0,5	0,5	0,25
56° 15'	5,5	5,5	5	6,75	5	5	5,5	6	6
56° 30'	6,25	7,75	6,5	6,5	6	6,5	7	7,5	6
pH 3	5,5	7,75	6,5	7,5	6	5,5	7	7,5	7,5

Los títulos se expresan en DICT₅₀/0,05 ml. **A:** (*) indica título previo al tratamiento; (-) indica ausencia de ECP. La tabla **B** muestra la disminución del título viral luego de someter las diferentes cepas a los agentes físico-químicos con respecto al título viral previo al tratamiento (expresados en la recíproca del log 10)

2.1 VN cruzada

Tabla 9: reactividad de los antisueros producidos en ratas contra las diferentes cepas virales (sueros inactivados a 56°C 30 min con el agregado de C' heterólogo)

	<i>RC/79</i>	<i>Mer</i>	<i>CL-7</i>	<i>CL-15</i>	<i>TL/92</i>	<i>S-66</i>	<i>Ind-S</i>	<i>Alf</i>	<i>YS-81</i>	<i>Cer*</i>
RC/79	128	16	32	16	32	8	-	-	4	1024
Mer	256	32	64	64	128	16	4	16	16	512
CL-7	128	4	64	32	64	4	-	8	4	512
CL-15	256	64	128	128	64	16	4	16	16	512
TL/92	64	16	64	32	64	4	-	8	4	1024
S-66	64	32	32	32	32	8	4	4	8	512
Ind-S	256	128	128	64	128	16	4	16	16	2048
Alf	64	8	16	32	32	4	-	8	4	128
YS-81	>256	128	64	128	256	32	4	32	32	>4096

En la horizontal se ubicaron los antisueros y en la vertical las distintas cepas virales. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución que neutraliza 10^2 DICT₅₀/0,05 ml. (-) indica ausencia de AcN. (*) Suero policlonal de cerdo de referencia.

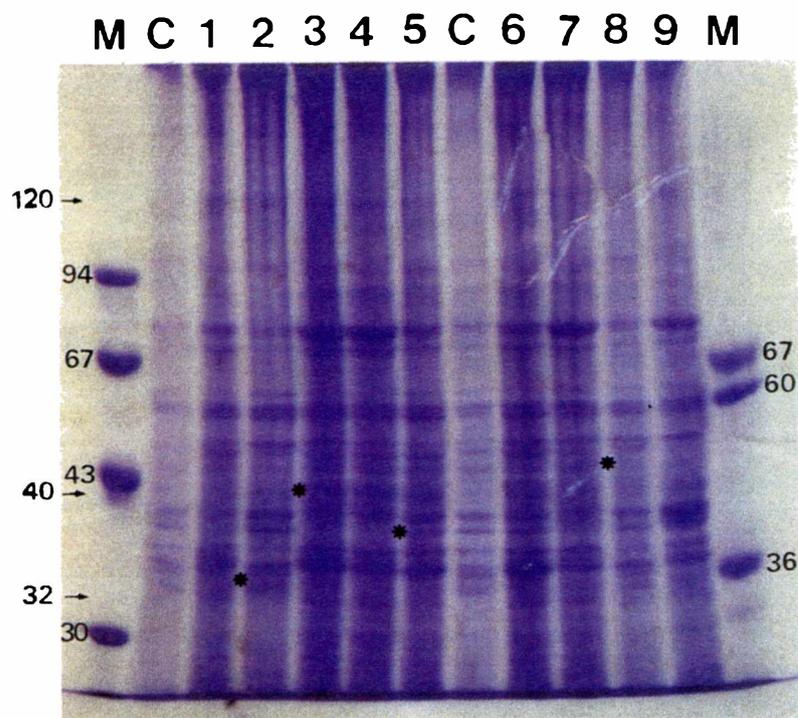
Tabla 10: reactividad de los antisueros producidos en ratas contra las diferentes cepas virales (sueros inactivados a 56°C 30 min sin C')

	<i>RC/79</i>	<i>Mer</i>	<i>CL-7</i>	<i>CL-17</i>	<i>TL/92</i>	<i>S-66</i>	<i>Ind-S</i>	<i>Alf</i>	<i>YS-81</i>	<i>Cer*</i>
RC/79	64	4	16	16	32	4	-	-	-	128
Mer	32	8	32	16	32	8	4	8	8	16
CL-7	64	8	32	16	16	-	-	4	-	32
CL-15	64	4	64	32	32	4	-	4	-	64
TL/92	16	8	16	16	16	-	-	4	-	64
S-66	32	32	16	8	32	4	4	-	4	16
Ind-S	128	64	64	32	64	-	-	-	-	128
Alf	64	4	16	16	32	4	-	4	4	64
YS-81	128	4	8	8	64	8	4	8	8	128

En la horizontal se ubicaron los antisueros y en la vertical las distintas cepas virales. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución que neutraliza 10^2 DICT₅₀/0,05 ml. (-) indica ausencia de AcN. (*) Suero policlonal de cerdo de referencia.

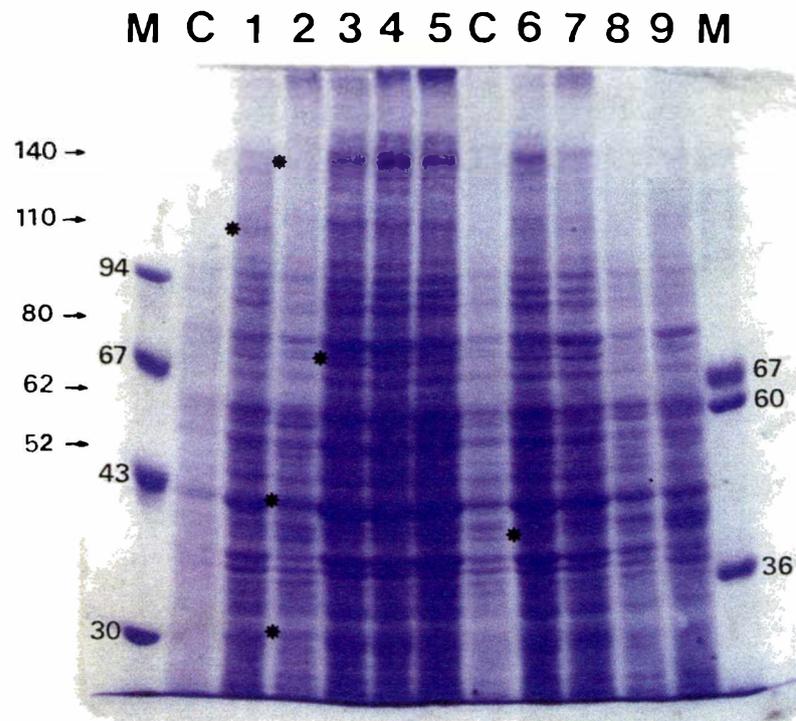
3.1 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE

Figura 15: separación proteica de los Ag de membranas celulares modificadas por las 9 cepas de PRV mediante electroforesis en gel de PAA al 10% bajo condiciones de no reducción



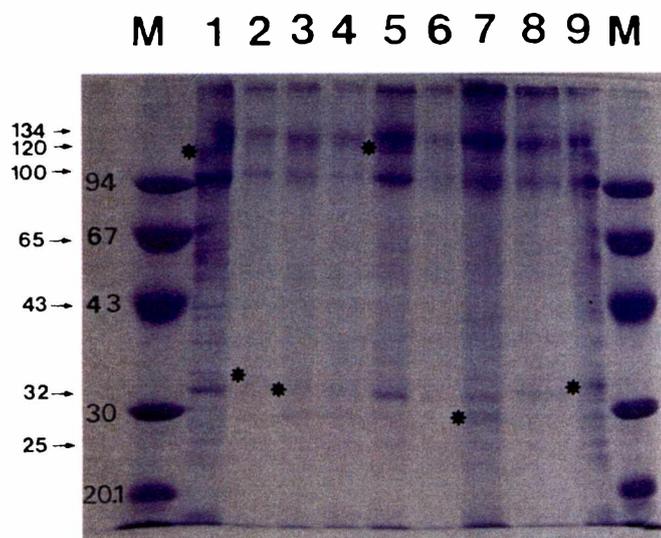
M: marcador de PM; C: control negativo (Ag de membrana obtenido de células sin inocular); cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican proteínas celulares modificadas por las diferentes cepas virales, bandas que resultan ausentes en el control de células sin inocular. Con asteriscos se indican diferencias de movilidad electroforética o ausencia de polipéptido entre las cepas. Todos los PM se expresan en kD.

Figura 16: separación proteica de los Ag de membranas celulares modificadas por las 9 cepas de PRV mediante electroforesis en gel de PAA al 10% bajo condiciones de reducción



M: marcador de PM; C: control negativo (Ag de membrana obtenido de células sin inocular); cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican proteínas celulares modificadas por las diferentes cepas virales, bandas que resultan ausentes en el control de células sin inocular. Con asteriscos se indican diferencias de movilidad electroforética o ausencia de polipéptido entre las cepas. Todos los PM se expresan en kD.

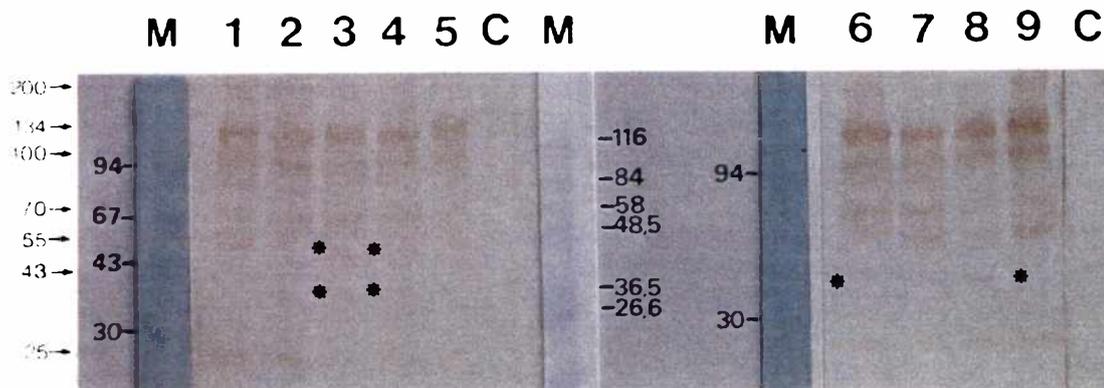
Figura 17: separación proteica de virus purificados de las cepas de PRV utilizadas en este trabajo mediante electroforesis en gel de PAA al 10% en condiciones no reducidas



M: marcador de PM; cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM de las distintas proteínas. Con asteriscos se indican diferencias de movilidad electroforética o ausencia de polipéptido entre las cepas según corresponda. Todos los PM se expresan en kD.

3.5 WESTERN BLOTTING

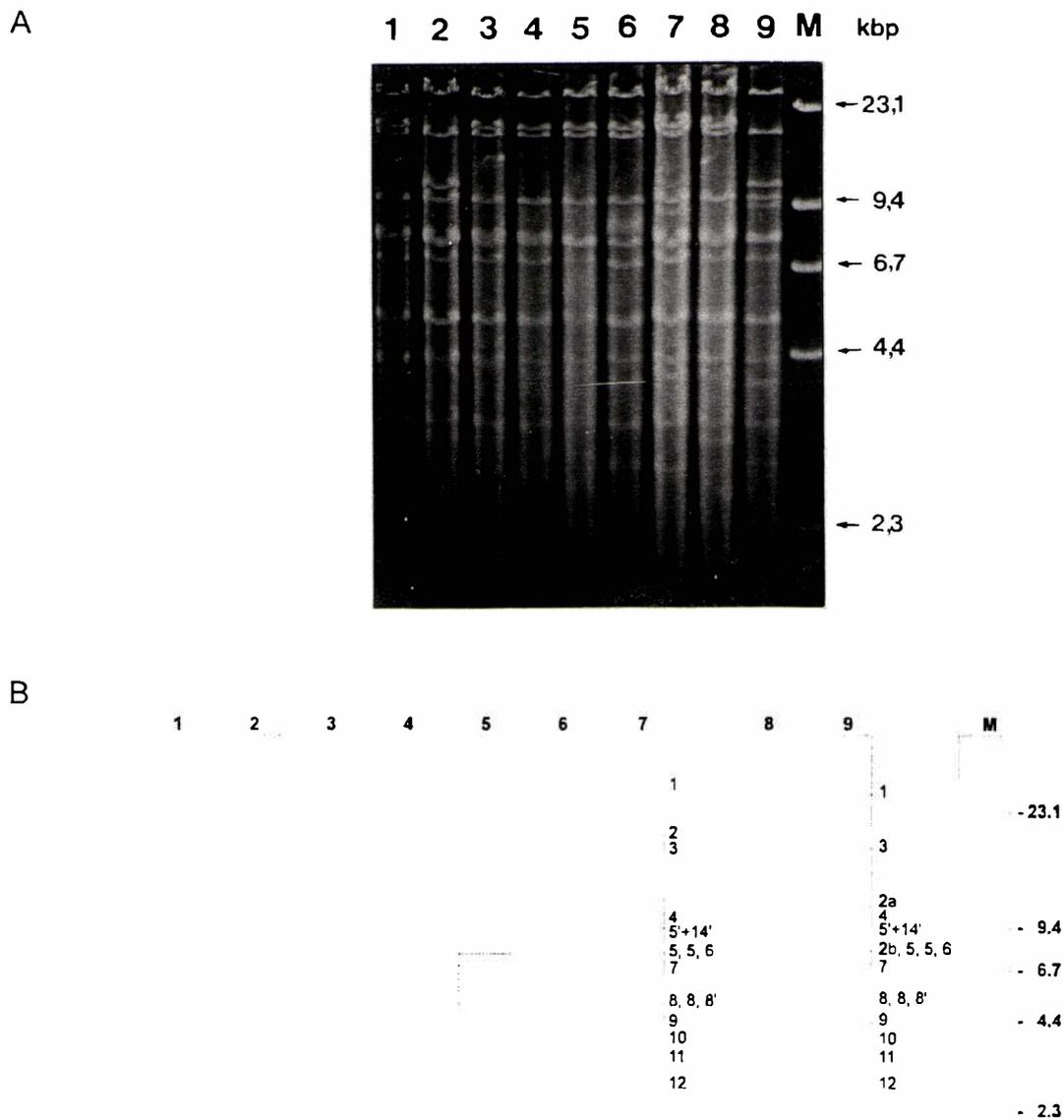
Figura 18: técnica de inmunodetección con anticuerpo policlonal (cabra anti-SHV-1) de diferentes proteínas de membranas celulares modificadas por las distintas cepas virales separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE al 10% en condiciones no reducidas e inmovilizadas sobre papel de nitrocelulosa.



M: marcador de PM; C: control negativo (Ag de membrana obtenido de células sin inocular); cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM de las proteínas celulares modificadas por las diferentes cepas virales detectadas por el suero policlonal, bandas que resultan ausentes en el control de células sin inocular. Con asteriscos se indican diferencias de movilidad electroforética o ausencia de polipéptido entre las cepas según corresponda. Todos los PM se expresan en kD.

4. PATRONES DE RESTRICCIÓN DEL ADN

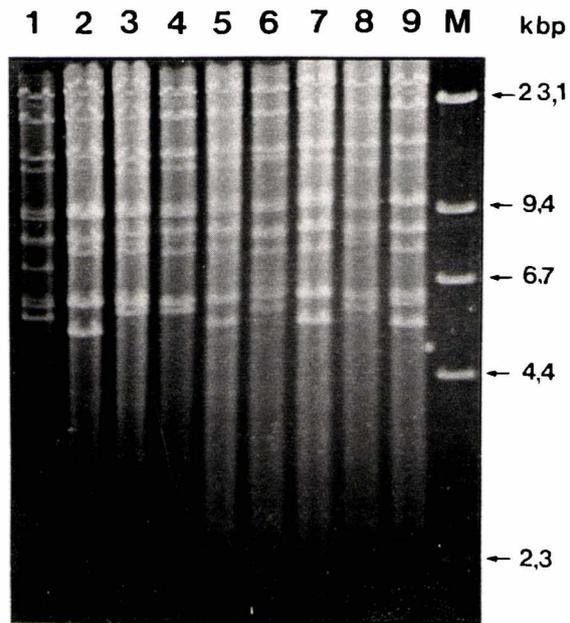
Figura 19: patrones de restricción del ADN obtenidos con *Bam*HI de las 9 cepas de PRV.



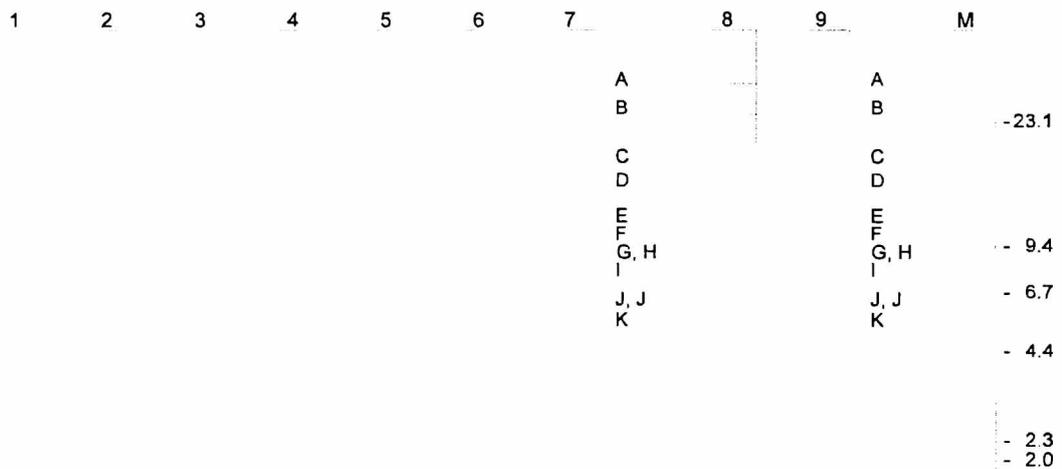
A: patrones de restricción obtenidos con *Bam*HI. B: esquema de las bandas obtenidas transcritas de la foto anterior; la denominación de las bandas se realizó de acuerdo a diferentes autores (se discute en el texto). M: marcador de PM; cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf); 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM del marcador.

Figura 20: patrones de restricción del ADN obtenidos con *KpnI* de las 9 cepas de PRV.

A

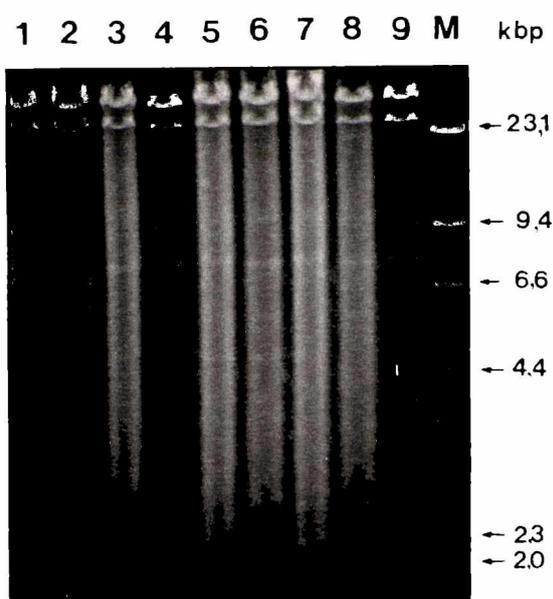


B



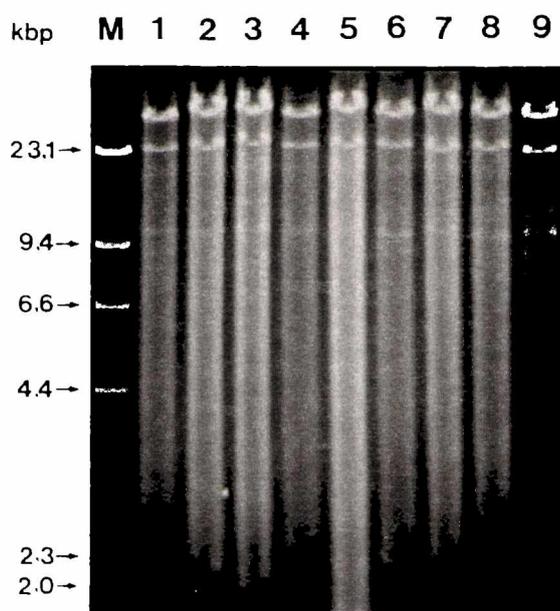
A: patrones de restricción obtenidos con *KpnI*. B: esquema de las bandas obtenidas transcritas de la foto anterior; la denominación de las bandas se realizó de acuerdo a diferentes autores (se discute en el texto). M: marcador de PM; cepas virales: 1- Rio Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf); 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM del marcador.

Figura 21: patrones de restricción del ADN obtenidos con *Hind*III de las 9 cepas de PRV.



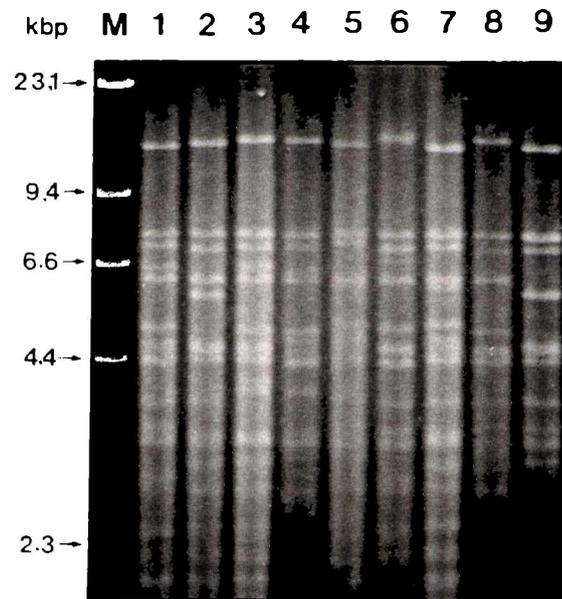
M: marcador de PM; cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM del marcador.

Figura 22: patrones de restricción del ADN obtenidos con *Xba*I de las 9 cepas de PRV.



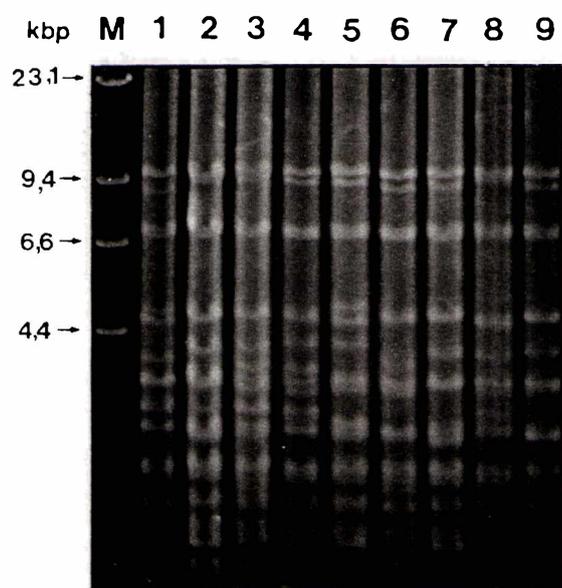
M: marcador de PM; cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM del marcador.

Figura 23: patrones de restricción del ADN obtenidos con *Pst*I de las 9 cepas de PRV.



M: marcador de PM; cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM del marcador.

Figura 24: patrones de restricción del ADN obtenidos con *SacI* de las 9 cepas de PRV.



M: marcador de PM; cepas virales: 1- Río Cuarto 79 (RC/79); 2- Mercedes (Mer); 3- Chañar Ladeado 7 (CL-7); 4- Chañar Ladeado 15 (CL-15); 5- Trenque Lauquen 92 (TL/92); 6- Sweden 66 (S-66); 7- Indiana (Ind-S); 8- Alfort (Alf) y 9- Yamagata 81 (YS-81). Mediante flechas se indican PM del marcador.

DISCUSIÓN

Numerosos autores (22, 65, 89, 152, 160, 161, 234) comprobaron la susceptibilidad de una amplia gama de cultivos celulares a ser infectados con PRV, mostrando el ECP de diferentes maneras, de acuerdo al tipo celular y a la cepa viral inoculada. Según Darlington y Granoff (39) el tipo de ECP en cultivos celulares es dependiente de la constitución genética del virus (cepas virulentas o atenuadas), medio y método de cultivo (concentración del inóculo, presencia de glutamina, sistema roller o estacionario) y tipo de célula infectada. En nuestro caso, utilizando glutamina en los medios, sistema estacionario de cultivo celular e inoculando las monocapas celulares con suficiente cantidad de virus para asegurar la infección de prácticamente todas las células (multiplicidad de infección -MDI- > 10), demostramos la alta susceptibilidad de las células empleadas al ser inoculadas con 9 cepas de PRV.

En general, todas las cepas virales produjeron el mismo ECP en las distintas líneas celulares: lisis, sincicios y/o CI intranucleares eosinófilos (PK15, RK13, MDBK, CRFK, HeLa y BHK). En CPK ninguna cepa produjo sincicios con excepción de Ind-S que produjo sincicios escasos y muy pequeños, dato que no es significativo. Los CI formados fueron característicos: cromatina desplazada hacia la perifería y halo pálido rodeándolo, siendo observados en todos los tipos celulares excepto en RK13, debido probablemente al menor tiempo en que el virus produjo ECP en estas células.

Según Darlington y Granoff (39), los sincicios se forman ya sea como resultado de repetidas divisiones nucleares amitóticas o bien son resultado de fusiones celulares, formaciones que pueden favorecerse por el método estático de cultivo. Además, coincidiendo con nuestros resultados, la formación de sincicios se produce cuando la MDI es alta lo que se observa claramente en HeLa y RK13 (39).

Kaplan y Ben-Porat (89) observaron que con MDI entre 10-15, prácticamente se destruye una monocapa de RK13 luego de 18 hs de incubación, lo que en nuestro

caso se redujo a 9 hs solamente, ya que cuando fueron incubadas durante 14 hs como el resto de las líneas celulares, no existían células sobre el cubreobjeto utilizado para fijarlas (lisis total).

En MDBK aparecieron grandes sincicios, coincidiendo con los resultados de Zuffa y colaboradores (234), que observaron que a las 20 hs de incubación los sincicios presentaban hasta 12 núcleos aproximadamente. Para estos mismos autores (234) no existen sincicios ni CI en células de tipo fibroblásticas por que esta es una característica exclusiva de las células de tipo epitelial, dato que no coincide con lo observado en nuestro trabajo utilizando BHK (figura 14), ni con el observado por Darlington y Granoff que obtuvieron tanto células redondas como pequeños sincicios sobre células BHK infectadas con HSV, y extensos sincicios en células RK13 infectadas con el mismo virus (39).

En un intento por resumir las características presentadas en cultivos celulares inoculados con PRV, Bitsh (22) expresa que las cepas altamente patogénicas son capaces de formar sincicio a lo que Golais y Sabó (64) agregan que las atenuadas producen únicamente redondeamiento celular y que los sincicios se forman sólo en células porcinas como bovinas (22, 64). En nuestro caso se obtuvieron sincicios en todas la líneas celulares excepto CPK.

Son muy llamativos los sincicios producidos por todas las cepas en RK13 y considerando además el corto tiempo de incubación requerido para su aparición, se sugiere el uso de esta línea para el intento de aislamiento viral. Muchas líneas celulares presentan una formación espontánea de sincicios que generalmente no exceden los 4-5 núcleos (RK13, CRFK), siendo fácilmente diferenciables de los producidos por la replicación viral.

Según los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la virulencia es aparentemente la misma aún a elevados pasajes en cultivos celulares, coincidiendo

con Zuffa y colaboradores (234) y no es posible establecer diferencias de ECP de las 9 cepas virulentas de PRV sobre los diferentes sustratos celulares utilizados.

Debido a que la envoltura viral contiene una elevada concentración de lípidos, es muy sensible a los solventes orgánicos como los utilizados en este trabajo (éter, cloroformo) por lo tanto, cualquier agente químico que destruya la envoltura viral anula la infectividad del herpes.

La tripsina también actúa de alguna manera alterando dicha envoltura lipoproteica y por lo tanto haciendo a los herpes más sensibles (610). En el estudio realizado por Bodon y colaboradores (26) las cepas virulentas resultaron sensibles a la tripsina en concentraciones de 0,5 mg/ml; para ellos, resistencia al calor y a la tripsina se acompañan de virulencia reducida. Golais y Sabó (64) no obtuvieron relación directa entre termoresistencia y virulencia y no consideran la sensibilidad al calor adecuada para la caracterización de cepas. Para Bartha y colaboradores (7) el tratamiento con calor redujo los títulos originales (4-5 log) dependiendo de la cepa viral, y mediante el tratamiento con tripsina la sensibilidad fue menor utilizándola al 0,1%. Bodon y colaboradores (26), Bartha y colaboradores (7), y Lloyd y Baskerville (112) sugieren que PRV puede ser diferenciado por su sensibilidad a la tripsina, - atenuadas = tripsinosensibles y virulentas = tripsinoresistentes -, especulando con que el marcador de sensibilidad a la tripsina puede correlacionarse con virulencia. Por el contrario, Platt y colaboradores (161) no hallaron la correlación esperada entre sensibilidad a tripsina y virulencia en ratón: las cepas de campo deberían comportarse como más sensibles a este agente dispersante que las cepas vacunales, pero ocurrió lo contrario; en cambio, encontraron relación directa entre inactivación térmica y sensibilidad a la tripsina. La resistencia al calor ha sido indicada por Bodon y colaboradores (26) y Bartha y colaboradores (7) como marcador de reducida virulencia de ADV. Platt y colaboradores (160) también

estudiaron cepas vacunales y de campo y observaron marcadas diferencias entre las de campo entre sí y entre las vacunales entre sí y difieren de la conclusión realizada por Golais y Sabó (64). Tozzini (205) observó que la resistencia al calor se incrementaba con el grado de atenuación.

Los resultados de los experimentos realizados indicados en la tabla 8 muestran pocas diferencias de sensibilidad de las 9 cepas sometidas a los diferentes agentes físico-químicos. Las 9 cepas presentaron reducciones de títulos entre 2,5 y 5 log al ser sometidas a la acción de la tripsina en concentración del 0,5%, siendo Alf la cepa más sensible. Cuando las mismas cepas fueron enfrentadas con tripsina a menor concentración (0,1%) experimentaron menores reducciones de títulos (0,25 y 1,75 log) siendo la TL/92 la más sensible, lo que demuestra que es necesaria una concentración mínima de tripsina para reducir la virulencia de PRV en forma significativa.

Se comportaron altamente sensibles cuando fueron sometidas a la acción del calor: disminuyeron entre 5 y 6,75 log a 56°C durante 15 min siendo la CL-15 la más sensible y prolongando el período de tiempo a 30 min con la misma temperatura, la virulencia se redujo desde 6 log a la inactivación total del virus, siendo las más sensibles Mer y Alf (7,75 log), Ind-S (7 log) y CL-15 y S-66 (6,5 log).

Con respecto a la labilidad experimentada por las cepas frente a pH ácido, las variaciones oscilaron entre 5,5 log y 7,5 log siendo las más lábiles Mer, CL-15, Alf y YS-81 (7,5 log), Ind-S (7 log) y CL-7 (6,5 log).

La sensibilidad frente a diferentes agentes físico-químicos, no es de utilidad en estos casos al utilizar 9 cepas aisladas de campo, como lo demuestra también Tozzini (205), quien trabajando con 4 cepas de campo obtuvo las mismas variaciones de título en la resistencia al calor y no pudo correlacionar la sensibilidad de cepas con respecto a diferentes agentes, ni establecer cuál fue más resistente ni cual más sensible globalmente.

De acuerdo a los resultados contradictorios obtenidos por diferentes autores con respecto a la relación sensibilidad a la tripsina-calor/virulencia, es que consideramos que estos marcadores no son útiles en estos casos. En nuestra experiencia solo utilizamos cepas virulentas, las que no mostraron diferencias de sensibilidad.

Resumiendo, toda la metodología utilizada por diferentes autores, [Bartha y colaboradores (7), Lloyd y Baskerville (112), Platt y colaboradores (160, 161), y Bitsch (22)] y también utilizadas en este trabajo, como marcadores para relacionar sensibilidad-resistencia-virulencia (ECP en cultivos celulares, inactivación por UV, tratamiento con tripsina calor, patogenicidad en ratón o conejos) no permite la identificación de cepas, ni aún el agrupamiento en distintos serotipos, debido a su elevada laboriosidad y escaso poder resolutivo (34).

Para determinar si los diferentes aislamientos de PRV muestran diferencias en cuanto a su antigenicidad, se realizaron inmunizaciones periódicas a 9 ratas a fin de obtener 9 antisueros policlonales que fueron utilizados en VN cruzada. Para la obtención de los antisueros contra las distintas cepas de PRV se consideró la utilización de conejos. Debido a que resultó más adecuado por las condiciones de nuestro bioterio, utilizamos ratas machos Long Evans convencionales. Estas ratas resultaron de fácil maniobrabilidad para el esquema de inmunización seguido.

Los Ag (Ag de membrana) utilizados con éxito en la inmunización de ratones para la producción de AcMo y para la producción de Ac en conejos (150, 156), fueron los que empleamos con las ratas y el esquema de inmunización seguido fue similar al utilizado para la producción de AcMo (229).

Es sabido que el C' favorece la acción neutralizante de muchos virus, sobre todo para la detección de Ac tempranos, mejorando de algún modo la unión Ag-Ac (23). La neutralización dependiente del C' fue conocida entre los miembros de la

familia Herpesviridae, en sueros humanos o de conejos con Ac contra HSV-1 y fue utilizado también para la detección de infección temprana de BHV-1 y Rinotraqueítis Felina como método más sensible (76). Los AcN dirigidos contra gC y gD pueden ser independientes del C', mientras que los dirigidos contra gB son C' dependientes (34, 71). Sin embargo, como fue demostrado por Ben-Porat y colaboradores (18), existen variaciones antigénicas entre cepas de PRV, sobre todo entre aquellas aisladas de diferentes áreas geográficas. Los aislamientos de PRV de la misma zona geográfica parecen antigénicamente similares. Estas variaciones antigénicas se presentan principalmente en gE y gC (ambas esenciales para la replicación viral *in vitro*) y no en gB (18). Yamada y colaboradores, utilizando AcMo observaron que Ac dirigidos contra gB muestran diferencias de reactividad entre cepas americanas y japonesas, pero no entre las japonesas entre sí (229). Esta diferencia de reactividad también fue observada en nuestro laboratorio cuando realizamos VN cruzada empleando 5 AcMo contra 7 cepas de PRV. Cuatro de ellos neutralizan en presencia de C' y la diferente reactividad permite reunir a las cepas en 2 grupos (YS-81, S-66, CL-15 y Mer por un lado e Ind-S, RC/79 y Alf por el otro), no existiendo relación entre fenotipo y genotipo como se observará más adelante.

La tabla 9 muestra la diferente reactividad cruzada de las cepas frente al C' heterólogo: los mayores títulos neutralizantes se observaron contra las cepas Argentinas. En tabla 10 se observa que efectivamente los sueros sin el agregado de C' presentaron títulos menores. La actividad neutralizante aumentada por el C' también se demuestra por la diferencia de títulos del suero de cerdo policlonal de referencia de tablas 9 y 10.

Probablemente esta diferencia de reactividad sea debida, ya sea a características inmunológicas individuales de cada rata, ya sea por diferencias antigénicas entre cepas de diferentes áreas geográficas o bien que la alta cantidad

de pasajes por cultivo que tienen las cepas recibidas en nuestro laboratorio hayan modificado su antigenicidad.

El análisis de las gps de las 9 cepas de PRV por electroforesis en SDS-PAGE merece consideraciones especiales. En primer lugar podemos señalar que tanto el método empleado para la separación de las gps (SDS como buffer disociante) y la concentración de PAA utilizados en todos los geles fue correcta, permitiendo en general, una buena resolución (figuras 15, 16 y 17).

Los Ag de membrana de las 9 cepas y el control negativo (células sin infectar) otorgaron un número elevado de bandas proteicas en la concentración utilizada (>30 bandas en el caso de Ag reducidos). Algunas de estas bandas (120, 40 y 30 kD en muestras no reducidas y 140, 110, 80, 62 y 52 kD en Ag reducidos) están presentes únicamente en las cepas virales y ausentes en los controles sin inocular, lo que indica que son específicas de virus (figuras 15 y 16). Cabe recordar que los pesos moleculares de las gps presentes en el virión PRV son los siguientes: gB: 155 kD (subunidad a: 110-125; subunidad b: 68-74; subunidad c: 55-58); gC: 92 kD; gD: 55-60 kD; gE: 130 kD; gI: 63 kD y gH 95 kD. Los patrones obtenidos con las 9 cepas de PRV fueron similares, existiendo pequeñas diferencias, a saber: las cepas aisladas más recientemente en nuestro país (CL-7, CL-15 y TL/92) tienen prácticamente el mismo perfil proteico excepto la ausencia de una banda de aproximadamente 38 kD en CL-7 y CL-15, banda que también resulta ausente en Ind-S. Alf también tiene una banda ausente de aproximadamente 45 kD. Mer es la cepa que muestra mayores diferencias con el resto de las cepas argentinas e incluso difiere mucho de las de referencia; en ella aparece un grupo de bandas de entre 33 y 35 kD. En general las diferencias entre las cepas se comienzan a observar en PM < 60 kD y salvo la gD de PM entre 55-60 kD no tienen demasiada significancia, ya que podrían ser precursores proteicos o restos de otras proteínas celulares,

proteínas contaminantes, o productos parcialmente glicosilados (111) -figura 15-. Mer, Alf y YS-81 tienen una banda ausente de aproximadamente 140 kD; RC/79 presenta una banda de 100 kD y el resto de las cepas pequeñas diferencias de movilidad: Mer en 70, 40 y 30 kD (figura 16).

Para la obtención de Ag purificados se ensayaron 2 métodos: gradientes de sucrosa y de tartrato de potasio. Con el primero no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se ensayó posteriormente el segundo método que resultó óptimo y permitió obtener una buena banda viral en el gradiente correcto (25%). Los Ag purificados (figura 17) también otorgaron perfiles similares en SDS-PAGE; la banda de aproximadamente 120 kD fue muy marcada en RC/79 y TL/92 y en el resto se observaron pequeñas diferencias de movilidad en PM inferiores a 43 kD.

Los mismos Ag de membrana fueron inmovilizados sobre membrana de NC (WB) y enfrentados con un suero policlonal anti-SHV-1 para la detección de proteínas específicas y variación entre ellas si las hubiere. Este método resultó exitoso debido a que el sistema de transferencia utilizado (204) fue correcto y que el suero de cabra anti-SHV-1 detectó únicamente bandas proteicas en las cepas virales y no en los controles negativos y los PM de dichas bandas coinciden con los PM de las gpc de PRV y con el resto de los geles. Sólo se observaron pequeñas diferencias de movilidad electroforética en bandas de 55 kD de CL-7 y CL-15 con respecto a las demás cepas y no se detectaron las bandas de 43 kD de CL-7, CL-15, S-66 y YS-81, probablemente perdidas durante la transferencia.

Los resultados obtenidos para el perfil proteico de cepas de PRV coinciden con los de otros autores: Ben-Porat y colaboradores (18) no pudieron establecer diferencias entre cepas de distintos lugares del mundo aún utilizando inmunoprecipitación con AcMo. Sí pudieron establecerlas entre cepas vacunales (mutaciones de gpc debido a la manipulación) y cepas salvajes. Ellos concluyen que

además, los aislamientos de PRV de la misma área geográfica aparecen antigénicamente similares.

En nuestro caso, solo Mer aparece como diferente a las demás, sobre todo en SDS-PAGE de Ag de membrana sin reducción. Cabe destacar que esta cepa fue recibida en el laboratorio sin conocer su número anterior de pasajes en cultivos celulares. Los Ag de membrana utilizados también fueron efectivos en SDS-PAGE y en WB para Snowden y Halliburton (192) utilizando otros herpes virus. Obtuvimos bandas proteicas con virus purificados de PM similares a las obtenidas por Hampl y colaboradores (71) y Todd y colaboradores por inmunoprecipitación (203) y obtuvimos WB de similares características a las encontradas por Towbin y colaboradores (204).

Cabe recordar que la sistematización de los genomas de PRV comprende 4 tipos genómicos principales y un número sugerido de subtipos. Tomando a la enzima *Bam*HI como base de esta sistematización, Herrmann y colaboradores (74) designaron a los tipos genómicos como I, II, III y IV y con la enzima *Bst*EII como I, Ii (con un fragmento adicional bajo el 4), Iia, Iib (también con una fragmento adicional bajo el 4) y III (190). El tipo III difiere ligeramente del tipo I con *Bam*HI, pero son muy diferentes con *Bst*EII. El tipo IV es diferente al I y al III con ambas ER. Para este autor los genomas podrían agruparse de acuerdo al área geográfica donde fueron aisladas las cepas virales: tipos I y II representan virus aislados en Alemania y Bélgica; tipo III en Dinamarca y Suecia y tipo IV en Tailandia (74). Christensen, (34) agrupó a las cepas europeas en forma ligeramente diferente, subdividiendo el tipo genómico I en tipos I e Ii. A su vez, subdividió a ambos de la siguiente manera:

Ii: (Iia y Iip) se diferencia de los tipos I y III por la falta de un sitio de corte entre los fragmentos 14' y 5'.

I (Ip, Is, Ia, Ib y In): Ip, Is: se identifican con *BstEII*, dando un sitio de corte adicional en fragmento 2, lo que ocurre además en el tipo genómico III. Además Is posee varias copias del fragmento 5 de mayor tamaño. Ia: sufre la pérdida de 2 sitios de corte entre 8 y 8' y entre 8 y 13. Ib: aparece el fragmento 11 de mayor tamaño que co-migra con el 10. In: aparece otro sitio de corte en medio del fragmento 7, dando como resultado otro fragmento 7' de idéntico tamaño.

Al tipo II, este autor lo divide en IIa y IIb. En el primero comigran 2 copias de los fragmentos 5 + 7. Al tipo genómico III le falta un sitio de corte entre los fragmentos 2 y 9 (que lo diferencia de los otros tipos) y también se subdivide en IIIp y IIIa, este último también posee varias copias del fragmento 5 de mayor tamaño. En todos los tipos descriptos " p " indica prototipo.

El método utilizado para la extracción del ADN de las 9 cepas virales resultó exitoso, ya que no hubo mayor interferencia del ADN celular. Los patrones de restricción resultaron idénticos a los obtenidos por Christensen para S-66 utilizando *BamHI* y *KpnI* (34); Yamada y colaboradores (230) para Ind-S y YS-81 utilizando las mismas ER; Paul y colaboradores (155) para Ind-S con *BamHI* y Nishimori y colaboradores para YS-81 con *BamHI* (148), indicando entonces que los pasajes en cultivos celulares hechos en nuestro laboratorio no modifican el ADN viral. Ben-Porat y colaboradores obtuvieron idénticos patrones de restricción en cepas de PRV luego de más de 100 pasajes en cultivos celulares (16). Esta estabilidad genética observada en los patrones de restricción después de gran cantidad de pasajes de PRV en cultivos celulares, no se traduce en una estabilidad inmunológica del virus, dado que sí se observan diferentes reactividades por VN en cepas que sufrieron una alta cantidad de pasajes en células. La variabilidad en el tamaño de los fragmentos se puede observar luego de un número elevado de pasajes a través del cerdo, por lo que no deberían efectuarse pasajes en esta especie si se quieren indagar diferencias entre cepas de PRV utilizando los patrones de restricción del ADN (214).

Las cepas virales no se mezclaron entre ellas ya que no hay dos patrones de restricción idénticos (49).

Los patrones de restricción del ADN obtenidos mediante el corte con *Bam*HI de las 9 cepas de PRV se observan en la figura 19. La denominación de los fragmentos del esquema transcrito se basó en los de Ind-S (16, 230) y YS-81 (230). Basados en la presencia del fragmento 2, RC/79, CL-7, CL-15, TL/92, S-66 (34), Ind-S (16, 230) y Alf (63) pertenecen al tipo genómico I de acuerdo a la clasificación original de Herrmann (74). YS-81 y Mer pertenecen al tipo genómico II debido a la ausencia del fragmento 2 y la aparición de dos fragmentos característicos: 2a y 2b. Los fragmentos más variables observados con *Bam*HI son 5' + 14', 10 y 12. Estas variaciones son conocidas aún en virus aislados de la misma área geográfica y se expresan con pequeñas diferencias de menos de 500 pares de bases de tamaño. Estos fragmentos variables involucran a IR y TR y el extremo izquierdo del genoma viral y pueden ser debidas a inserciones o deleciones en la secuencia nucleotídica (34, 230). En las cepas argentinas y en Alf el fragmento 5' + 14' tiene menor PM que el mismo de Ind-S y YS-81 y la diferencia entre estos últimos es mayor de 500 pares de bases. El fragmento 5' + 14' de TL/92 presenta casi idéntica movilidad que el fragmento 5, 5, 6 y el fragmento 12 de la misma cepa es ligeramente más pequeño que el mismo de las cepas argentinas. El fragmento 10 de RC/79 aparentemente sufrió traslado hacia el 9. El resto de los fragmentos no presenta grandes variaciones, lo que indica que provienen de zonas altamente conservadas del genoma (62).

Las variaciones en longitud de los fragmentos obtenidos con *Bam*HI causados por la adición y/o deleción de secuencias nucleotídicas se encontraron en: RC/79, Mer, CL-7, CL-15, TL/92 y Alf en los fragmentos 5' + 14', 10 y 12; 5' + 14' más un fragmento que se agrega bajo el 4 en S-66, respecto de Ind-S y YS-81.

Los últimos 4 aislamientos argentinos pertenecen al genoma tipo I. Sin embargo Mer pertenece al tipo II; esta cepa fue aislada de una epizootia ocurrida en 1980 en la ciudad de Villa Mercedes, provincia de San Luis (186), donde la producción porcina se practica en menor escala. Esta epizootia se produjo en cerdos importados de Holanda, poco tiempo después de arribar a nuestro país. Esta cepa no se extendió en el país debido a que todos los animales fueron sacrificados (Fondevila, comunicación personal). El genoma tipo II se encontró en Holanda (63).

Con *KpnI* no se diferencian subtipos y no existe correspondencia entre genomas de tipos diferentes (34). Los patrones obtenidos con *KpnI* se observan en la figura 20. Las bandas fueron numeradas de acuerdo con Yamada y colaboradores para Ind-S y YS-81 (230). Hubo pequeñas diferencias en las cepas: las cepas argentinas de genoma tipo I de acuerdo a *BamHI* tuvieron los fragmentos G y H separados entre ellos excepto TL/92. En Mer y YS-81 sólo hay diferencia entre los fragmentos E y K, donde desaparecen dos bandas de Mer. Otras pequeñas diferencias de movilidad electroforética pueden observarse en D, I, J y K.

Las cepas argentinas tipo I se asemejan más a Alf que a Ind-S, especialmente por el fragmento 5' + 14' que es más liviano que en el resto de las cepas extranjeras. La observación de que cepas no relacionadas epidemiológicamente como las de referencia muestran distintos patrones de restricción lo observaron también Herrmann y colaboradores (74) y Yamada y colaboradores (230). Las cepas relacionadas epidemiológicamente muestran perfiles de ADN casi idénticos excepto por menores diferencias en la movilidad de algunos fragmentos, de acuerdo a la ER utilizada (figuras 19 a 24). Solo pudo establecerse el tipo y no el subtipo de las cepas de acuerdo al corte de genoma con *BamHI* de las cepas argentinas y de Alf, debido a que no era el objetivo del trabajo utilizar Southern blot.

Pudieron establecerse pequeñas diferencias entre las cepas con el uso de otras ER: *HindIII*, *XbaI*, *PstI* y *SacI* (figuras 21, 22, 23 y 24 respectivamente). PRV posee 2 sitios de corte para *XbaI* (228) y obtuvimos las 3 bandas esperadas, con muy poca diferencia de PM entre las cepas (banda 1 de 33 a 38,5 kbp; banda 2 de entre 23,1 a 26 kbp y banda 3 de entre 10,2 a 10,8 kbp). *HindIII* también tiene 2 sitios de corte del ADN de PRV (17, 110, 155, 228) otorgando 3 bandas con PM aproximados de 32 a 33 kbp la primera; 25 a 26,2 kbp la segunda y 7,6 a 7,7 kbp la tercera, mientras que *PstI* (17, 121, 155, 228) y *SacI* (155) generaron un gran número de bandas. *HindIII* y *XbaI* no son aptas para la diferenciación por el pequeño número de fragmentos que generan.

CONCLUSIONES

- No es posible establecer diferencias marcadas en el ECP producido por varias cepas de PRV en cultivos celulares.
- Se sugiere el uso de la línea celular RK13 para aislamiento de PRV dada la rapidez de aparición de ECP y la practicidad del uso de esta línea celular en el laboratorio.
- Las pruebas físico-químicas no aportan datos concluyentes que permitan observar diferencias significativas entre las cepas de campo de PRV.
- Con los antisueros obtenidos en ratas no se observaron diferencias entre cepas Argentinas de PRV .
- El estudio de la movilidad de las proteínas estructurales de las diferentes cepas de PRV en geles de PAA, no arrojó datos de importancia que permitieran diferenciarlas.
- Los patrones de restricción de los genomas empleando la enzima *Bam*HI, permitieron clasificar las cepas de PRV en grupos genómicos.
- Las cepas argentinas de PRV pertenecen al grupo genómico I de acuerdo a la clasificación de Herrmann.
- En Argentina fue aislada una cepa de PRV en el año 1981, clasificada como grupo II. Este tipo genómico no volvió a ser aislado hasta el presente.

BIBLIOGRAFÍA

1. AFSHAR, A.; WRIGHT, P. F.; DULAC, G. C. (1986) Dot-enzyme immunoassay for visual detection of antibodies to Pseudorabies virus in swine serum. *J. Clin. Microbiol.* 23: 563-567.
2. AFSHAR, A.; WRIGHT, P. F.; DULAC, G. C. (1987) Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of antibodies to Pseudorabies virus in porcine field sera. *Can. J. Vet. Res.* 51: 539- 541.
3. ALLAN, G. M.; McNULTY, M. S.; TODD, D.; McFERRAN, J.B. (1985) The rapid detection of Aujeszky's Disease virus in pigs by immunoperoxodase labelling. *Vet. Microbiol.* 10: 481-486.
4. AMBROGI, A.; GIRAUDO, J.; BUSO, J.; BIANCO, B.; BAGNAT, E.; SEGURA de ARAMBURU, M.; RAMOS, B.; CERIATTI, S. (1981) Primer diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. *Gaceta Veterinaria*, tomo XLIII: 58-64.
5. AUJESZKY, A. (1902) Ueber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. *Centralblatt Bakt. Parasitkde Abt. I. Orig.* XXXII: 353-357.
6. BANKS, M.; CARTWRIGHT, S. (1983) Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's Disease virus. *Vet. Rec.*113: 38-41.
7. BARTHA, A.; BELAK, S.; BENYEDA, Y. (1969) Trypsin- and heat- resistance of some strains of the Herpesvirus group. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 19: 97-99.
8. BARTOSZCZE, M.; ROSZKOWSKI, J. (1979) The use of the indirect immunoperoxidase method for the detection of Aujeszky's Disease virus in cell culture. *Zbl. Vet. Med. B* 26: 253-256.
9. BASKERVILLE, A. (1982) Cellular immunity in Aujeszky's Disease. En: Wittmann G., Hall, S. A. (eds): *Aujeszky's Disease. Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 99-106.

10. BELAK, S.; ROCKBORN, G.; WIERUP, M.; BELAK, K.; BERG, M.; LINNE, T. (1987) Aujeszky's Disease in pigs diagnosed by a simple method of nucleic acid hybridization. *J. Vet. Med B* 34: 519-529.
11. BELAK, S.; LINNE, T. (1988) Rapid detection of Aujeszky's Disease (Pseudorabies) virus infection of pigs by direct filter hybridization of nasal and tonsillar specimens. *Res. in Vet. Sci.* 44: 303-308.
12. BELAK, K.; FUNA, K.; KELLY, R.; BELAK, S. (1989) Rapid diagnosis of Aujeszky's Disease in pigs by improved *in situ* hybridization using biotinylated probes on paraffin-embedded tissue sections. *J. Vet. Med. B* 36: 10-20.
13. BENNETT, M.; TIMMINIS, J. G.; THOMSEN, D. R.; POST, L. E. (1986) The processing of Pseudorabies virus glycoprotein gX in infected cells and in an uninfected cell line. *Virology* 155: 707-715.
14. BEN-PORAT, T.; VEACH, R. A. (1980) Origin and replication of the DNA of a Herpesvirus (Pseudorabies). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 172-175.
15. BEN-PORAT, T.; BROWN, L.; VEACH, R. A. (1982) Recombination occurs mainly between parenteral genomes and precedes DNA replication in Pseudorabies virus-infected cells. *J. Virol.* 44: 134-143.
16. BEN-PORAT, T.; DEATLY, A. M.; EASTERDAY, B. C.; GALLOWAY, D.; KAPLAN, A. S.; Mc GREGOR, S. (1984) Latency of Pseudorabies virus. En: Wittmann, G.; Gaskell, R. M.; Rziha, H. J. (eds.): *Latent herpes virus infections in veterinary medicine*, *Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 27*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 365-383.
17. BEN-PORAT, T.; KAPLAN, A. S. (1985) Molecular biology of Pseudorabies virus. En: Roizman, B. (ed.): *The Herpesviruses. Vol III*, Plenum Press, New York, 105-173.

18. BEN-PORAT, T.; DeMARCHI, J.; LOMNICZI, B.; KAPLAN, A. (1986) Role of glycoproteins of Pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. *Viol.* 154: 325-334.
19. BEN-PORAT, T.; DeMARCHI, J.; PENDRYIS, J.; VEACH, R. A.; KAPLAN, A. S. (1986) Proteins specified by the short unique region of the genome of Pseudorabies virus play a role in the release of virions from certain cells. *J. Virol.* 57: 191-196.
20. BERAN, G.; DAVIS, E. B.; ARAMBULO, P. V. 3rd, WILL, L. A.; HILL, H. D.; ROCK, D. L. (1980) Persistence of Pseudorabies virus in infected swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 998-1000.
21. BITSCH, V.; ESKILDSEN, M. (1976) A comparative examination of swine sera for antibody to Aujeszky's virus with the conventional and modified virus serum neutralization test and modified direct complement fixation test. *Acta Vet. Scand.* 17:142.
22. BITSCH, V. (1980) Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's Disease virus and their ability to cause cell fusion -syncytia formation- in cell cultures. *Acta Vet. Scand.* 21: 708-714.
23. BITSCH, V.; ESKILDSEN, M. (1982) Complement dependent neutralization of Aujeszky's Disease virus by antibody. En: Wittman G., Hall, S. A. (eds.): *Aujeszky's Disease. Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 41-49.
24. BLOOD, D.C.; HENDERSON, J. A.; RADOSTITS, O. M. (1988) *Medicina Veterinaria*. 6ta edición, Editorial Interamericana, México, 898-902.
25. BLYTH, W. A.; HILL, T. J. (1984) Establishment, maintenance and control of Herpes Simplex virus (HSV) latency. En: Rouse, B. T.; Lopez, C (eds.): *Immunobiology of Herpes Simplex virus infection*, CRC Press, Boca Ratón, 9-32.

26. BODON, L.; MÉSZÁROS, J.; PAPP-VID, G.; ROMVÁRY, J. (1968) Properties of Aujeszky's Disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. *Acta Vet. Sci. Hung.* 18: 107-109.
27. BURGESS, G. W.; STEVENSON, B. J.; BUDDLE, J. R. (1976) Demonstration of a herpesvirus from piglets with lesions of Aujeszky's Disease in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 24 : 214.
28. CHASEY, D. (1980) A simple and rapid immunoperoxidase test for the detection of virus antigens in tissue cultures. *Vet. Rec.* 106: 506-507.
29. CHEUNG, A. K. (1989) Detection of Pseudorabies virus transcripts in trigeminal ganglia of latently infected swine. *J. Virol.* 63: 2908-2913.
30. CHEUNG, A. K.; FANG, J.; WESLEY, R. D. (1994) Characterization of a Pseudorabies virus that is defective in the early protein 0 and latency genes. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1710-1716.
31. CHEUNG, A. (1995) Investigation of Pseudorabies virus DNA and RNA in trigeminal ganglia and tonsil tissues of latency infected swine. *Am. J. Vet. Res.* 56: 45-50.
32. CHINSAKCHAI, S.; MOLITOR, T. (1994) Immunobiology of Pseudorabies virus infection in swine. *Vet. Immun. and Immunopathol.* 43: 107-116.
33. CHRISTENSEN, L. S. (1988) Comparison by restriction fragment pattern analysis and molecular characterization of some European isolates of Suid Herpes virus-1: a contribution to strain differentiation of European isolates. *Arch. Virol.* 102: 39-47.
34. CHRISTENSEN, L. S. (1995) The population biology of Suid Herpes virus 1". *APMIS Supplem.* 48: 1-48.
35. COATES, P. J.; HALL, P. A.; BUTLER, M. G.; D'ARDENNE, A. J. (1987) Rapid technique of DNA-DNA *in situ* hybridization on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation. *J. Clin. Pathol.* 40: 865-869.

36. CORTINI, R.; WILKIE, N. M. (1978) Physical maps for the Herpes Simplex virus type 2 DNA with five restriction endonucleases. *J. Gen. Virol.* 39: 259-280.
37. CRANDELL, R. A.; FABRICANT, C. G.; NELSON-REES, W. A. (1973) Development, characterization and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro* 9: 176-185.
38. CRANDELL, R. A. (1985) Selected Animal Herpesviruses: new concepts and technologies. *Adv. in Vet. Sci. and Comp. Med.* 29: 281-327.
39. DARLINGTON, R. W.; GRANOFF, A. (1973) Replication- Biological aspects. En: Kaplan, A. S. (ed.): *The Herpesviruses*. Academic Press Inc., New York, 94-132.
40. DAVIDO, M. (1981) Enfermedad de Aujeszky en el sur de la provincia de Córdoba. *Gac. Vet.* 44: 291-296.
41. DAVIES, E. B.; BERAN, G. W. (1980) Spontaneous shedding of Pseudorabies from a clinically recovered postparturient sow. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 1345-1347.
42. DAVISON, A. J.; WILKIE, N. M. (1983) Location and orientation of homologous sequences in the genomes of five herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 64: 1927-1942.
43. DEAN, H. J.; CHEUNG, A. K. (1995) A deletion at the U_L/I_R junction reduces Pseudorabies virus neurovirulence. *J. Virol.* 69: 1334-1338.
44. DUCATELLE, R.; COUSSEMENT, W.; HOORENS, J. (1982) Immunoperoxidase study of Aujeszky's Disease in pigs. *Res. in Vet. Sci.* 32: 294-302.
45. DUCATELLE, R.; COUSSEMENT, W.; HOORENS, J. (1984) Demonstration of Pseudorabies viral antigen in thick and ultrathin tissue sections of young pigs using an immunogold method. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1913-1917.
46. DURHAM, P. J. K.; OHARA, P. J. (1980) A survey of antibodies to Aujeszky's Disease virus in pigs. *N. Z. Vet. J.* 28: 179-183.

47. ECHEVERRÍA, M. G.; NOSETTO, E. O.; PETRUCCELLI, M. A.; GIMENO, E. J.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. (1991) Ocurrencia y diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en las zonas de Chañar Ladeado y Saladillo . *Vet. Arg.* VIII: 252-257.
48. ECHEVERRÍA, M. G.; NOSETTO, E. O.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; GALOSI, C. M.; FONROUGE, R. D.; PEREYRA, N. B.; BELAK, K.; GIMENO, E. J. (1992) Pseudorabies (Aujeszky's Disease) in Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 11: 819-827.
49. ECHEVERRÍA, M. G.; NORIMINE, J.; GALOSI, C. M.; OLIVA, G. A.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; NOSETTO, E. O.; TOHYA, Y.; MIKAMI, T. (1994) The genotype of Aujeszky's Disease viruses isolated in Argentina. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 985-987.
50. ELOIT, M.; FARGEAUD, D.; L'HARIDON, R. L.; TOMA, B. (1988) Identification of the Pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a major target of neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* 99: 45-56.
51. ELOIT, M.; FARGEAUD, D.; VANNIER, P.; TOMA, B. (1989) Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's Disease virus. *Vet. Rec.* 124 :91-94.
52. ELOIT, M.; VANNIER, P.; HUTET, E.; FOURNIER, A. (1992) Correlation between gI, gII, gIII and gp 50 antibodies and virus excretion in vaccinated pigs infected with Pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 123: 135-143.
53. ENGEL, M.; WIERUP, M. (1989) Vaccination and eradication programme against Aujeszky's Disease in Sweden based on a gI ELISA test. *Vet. Rec.* 125: 236-237.
54. FIELD, H. J.; WILDY, P. (1978) The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of Herpes Simplex virus in mice. *J. Hyg. Camb.* 81: 267-277.
55. FLYNN, S.; RYAN, P. (1995) A heterologous heparin-binding domain can promote functional attachment of Pseudorabies virus gC mutant to cell surfaces. *J. Virol.* 69: 834-839.

- 56.FONDEVILLA, N. (1982) Enfermedad de Aujeszky: etiología, patogénesis y diagnóstico. Memorias de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Jornadas de Actualización porcina. Enfermedades Infecciosas, 23 al 25 de septiembre de 1982, 68-76.
- 57.FUCHS, W.; RZIHA, H. J.; LUKACS, N.; BRAUNSCHWEIGER, I.; VISSER, N.; LUTTICKEN, D.; SCHREURS, C.; THIEL, H.; METTENLEITER, T. (1990) Pseudorabies virus glycoprotein gI: *in vitro* and *in vivo* analysis of immunorelevant epitopes. J. Gen. Virol 71: 1141-1151.
- 58.FUKUSHO, A.; SHIMIZU, M.; KJUBO, M.; NAMBA, K.; SHIMIZU, Y.; KONNO, S.; SUZUKI, K.; OTAKI, T. (1981) The first outbreak of Aujeszky's Disease in swine in Japan. II Virus isolation. Bull. Natl. Inst. An. Health 85: 5-11.
- 59.GALEOTA WHEELER, J.; OSORIO, F. (1991) Investigation of sites of Pseudorabies virus latency using PCR. Am. J. Vet. Res. 52: 1799-1803.
- 60.GALOSI, C. M.; NOSETTO, E. O.; GIMENO, E. J.; GÓMEZ DUNN, C.; ETCHEVERRIGARAY, M.E.; ANDO, Y. (1989) Equine Herpes virus 1 (EHV-1): characterization of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 8: 117-122.
- 61.GENTRY, G. A.; RANDALL, C. C.; (1973) The physical and chemical properties of the herpesviruses. En: Kaplan, A. S. (ed.): The Herpesviruses. Academic Press Inc. New York, 45-92.
- 62.GIELKENS, A. L. J.; BERNS, A. J. M. (1982) Differentiation of Aujeszky's Disease virus strains by restriction endonuclease analysis of the viral DNA's. En: Wittman G., Hall, S. A. (eds): Aujeszky's Disease. Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 3-13.
- 63.GIELKENS, A. L. J.; VAN OIRSCHOT, J. T.; BERNS, A. J. M. (1985) Genome differences among field isolates and vaccine strains of Pseudorabies virus. J. Gen. Virol. 66: 69-82.

64. GOLLAIS, F.; SABO, A. (1975) The effect of temperature and urea on virulent and attenuated strains of Pseudorabies virus. *Acta Virol.* 19: 387-392.
65. GOLLAIS, F.; CIAMPOR, F.; SABO, A. (1977) The effect of supraoptimal temperature on the formation of Pseudorabies virus particles. *Acta Virol.* 21: 463-468.
66. GOYAL, S. M.; SOO JOO, H.; MOURNING, J. R.; McPHERSON, S. W.; GOYAL, K. (1987) Comparison of three serotests for the detection of Pseudorabies antibodies in pigs. *Comp. Immun. Microbiol. Infec. Dis.* 10: 167-171.
67. GUÉRIN, C.; ALLIETTA, M.; GUÉRIN, B.; THIBIER, M. (1995) Utilisation de la technique d'amplification de gène pour la détection du virus de la maladie d'Aujeszky dans le sperme de verrat. *Vet. Res.* 26: 140-144.
68. GUTEKUNST, D. E.; PIRTLE, E. C.; MENGELING, W. L. (1978) Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies to Pseudorabies virus in swine serum. *Am. J. Vet. Res.* 39: 207-210.
69. GUTEKUNST, D. E. (1979) Latent Pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1568-1572.
70. GUTEKUNST, D. E.; PIRTLE, E. C.; MILLER, L. D.; STEWART, W. C. (1980) Isolation of Pseudorabies virus from trigeminal ganglia of a latently infected sow. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1315-1316.
71. HAMPL, H.; BEN-PORAT, T.; EHRLICHER, L.; HABERMEHL, K. O.; KAPLAN, A. S. (1984) Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *J. Virol.* 52: 583-590.
72. HARKNESS, J. W.; SANDS, J. J. (1985) Quantitative evaluation of syncytium formation in cell culture by British isolates of Aujeszky's Disease virus. *Br. Vet. J.* 141: 151-159.

73. HEFFNER, S.; KOVÁCS, F.; KLUPP, B. G.; METTENLEITER, T. C. (1993) Glycoprotein gp50-negative Pseudorabies virus: a novel approach toward a nonspreading live Herpesvirus vaccine. *J. Virol.* 67: 1529-1537.
74. HERRMANN, S.; HEPPNER, B.; LUDWIG, H. (1984) Pseudorabies virus from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. En: Wittmann, G.; Gaskell, R. M.; Rziha, H. J. (eds.): *Latent Herpesvirus infections. Curr. Top. Vet. Med. An. Sci. Vol 27*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 387-401.
75. HIPOLITO, O.; LAMAS DA SILVA, J. M.; BATISTA, J. A.; NACSIMENTO, L. S. (1962) Aujeszky's Disease in pigs in Brazil. *Args. Esc. Vet. Minas Gerais* 13: 61-63.
76. HORIMOTO, T.; LIMCUMPAO, J.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. (1989) Enhancement of neutralizing activity of anti-Feline Herpes virus 1 sera by complement supplementaton. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51: 1025-1027.
77. HOWARTH, J. A.; De PAOLI, A. (1968) An enzootic of Pseudorabies in swine in California. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 152: 1114-1118.
78. HOWARTH, J. A. (1969) A serologic study of Pseudorabies in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 154: 1583-1589.
79. HUANG, C. J.; RICE, M. K.; DEVI-RAO, G. B.; WAGNER, E. K. (1994) The activity of the Pseudorabies virus latency-associated transcript promoter is dependent on its genomic location in Herpes Simplex virus recombinants as well as on the type of cell infected. *J. Virol.* 68: 1972-1976.
80. IGLESIAS, G.; HARKNESS, J. W. (1989) *In vitro* comparison between four variants of Aujeszky's Disease virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 47-56.

81. IHARA, S.; FELDMAN, L.; WATANABE, S.; BEN-PORAT, T. (1983) Characterization of the immediate-early functions of Pseudorabies virus. *Viol.* 131: 437-454.
82. JACOBS, L. (1994) Glycoprotein E of Pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. *Arch. Virol.* 137: 209-228.
83. JEAN, J. H.; BEN-PORAT, T.; KAPLAN, A. S. (1974) Early functions of the genome of herpesvirus. III Inhibition of transcription of the viral genome in cells treated with cycloheximide early during the infective process. *Viol.* 59: 516-523.
84. JESTIN, A.; BLANCHARD, P.; GARBAN-CHENON, A.; VANNIER, P.; NICOLAS, J.C. (1990) Restriction fragment patterns analysis of genomes from French isolates of SHV-1 (Aujeszky's Disease virus). *Arch. Virol.* 112: 149-167.
85. JESTIN, A.; FOULON, T.; PERTIUSET, B.; BLANCHARD, P.; LABOURDET, M. (1990) Rapid detection of Pseudorabies virus genome sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. *Vet. Microbiol.* 23: 317-328.
86. JOHNSON, M. E.; THAWLEY, D. G.; SOLORZANO, R. F.; WRIGHT, J. C. (1983) Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to Pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 44: 28-30.
87. JOHNSTON, J. B.; WITTRICK, D. A.; ROBERTS, H. E.; DONE, J. T. (1961) An outbreak of Aujeszky's Disease. *Vet. Rec.* 73: 818-820.
88. JOO, H. S.; MOLITOR, T. W.; LEMAN, A. D. (1984) Radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies to Pseudorabies virus in swine serum. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2096-2098.
89. KAPLAN, A. S.; BEN-PORAT, T. (1959) The effect of Pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and the nucleic acid of rabbit kidney cells. *Viol.* 8: 352-366.

90. KAVANAGH, N. T. (1986) Aujeszky's Disease in an Irish pig practice: incidence, trends and response to vaccination. *Vet. Rec.* 118: 481.
91. KELLING, C. L.; STANDINGER, W. L. RHODES, M. B. (1978) Indirect solid-phase microradioimmunoassay for detection of Pseudorabies virus antibody in swine sera. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1955-1957.
92. KIRKBRIDE, C. (1985) Managing an outbreak of livestock abortion- 3: diagnosis and control of porcine abortion. *Vet. Med* 80: 82-84.
93. KIT, S.; KIT, M.; PIRTLE, E. C. (1985) Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of Pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1359-1367.
94. KIT, S.; QAVI, H.; GAINES, J.; BILLINGSLEY, P.; McCONNELL, S. (1985) Thymidine kinase-negative Bovine Herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch. Virol.* 86: 63- 83.
95. KIT, S.; SHEPPARD, M.; ICHIMURA, H.; KIT, M. (1987) Second-generation of Pseudorabies virus vaccine with deletion in thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am. J. Vet. Res.* 48: 780- 793.
96. KLUGE, J. P.; BERAN, G. W.; HILL, H. T.; PLATT, K. B. (1993) Pseudorabies (Aujeszky's Disease). En: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'allaire, S.; Taylor, D. J. (eds.): *Diseases of swine*. 7a edition, Iowa State University Press, Ames IA, USA, 312-323.
97. KLUPP, B.; VISSER, N.; METTENLEITER, T. (1992) Identification and characterization of Pseudorabies glycoprotein H. *J. Virol.* 66: 3048-3055.
98. KLUPP, B.; BAUMEISTER, J.; KARGER, A.; VISSER, N.; METTENLEITER, T. (1994) Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in Pseudorabies virus, gL. *J. Virol* 68: 3868-3878.
99. KOPP, A.; METTENLEITER, T. C. (1992) Stable rescue of a glycoprotein gII deletion mutant of Pseudorabies virus glycoprotein gI of Bovine herpes virus 1. *J. Virol.* 66: 2754-2762.

- 100.KOPP, A.; BLEWETT, E.; MISRA, V.; METTENLEITER, T. C. (1994) Proteolytic cleavage of Bovine Herpes virus 1 (BHV-1) glycoprotein gB is not necessary for its function in BHV-1 or Pseudorabies virus. *J. Virol.* 68: 1667-1674.
- 101.LABIEDIE, J. P.; TOMA, B. (1979) Mise au point d'une technique d'hémagglutination passive pour le diagnostic sérologique de la maladie d'Aujeszky. *Rec. Med. Vet.* 155:47-50.
- 102.LADIN, B. F.; BLANKENSHIP, M. L.; BEN-PORAT, T. (1980) Replication of herpesvirus DNA. V Maturation of concatameric DNA of Pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. *J. Virol.* 33: 1151-1164.
- 103.LAEMMLI, V. (1970) Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 104.LEE, Y. S.; WILSON, M. R. (1979) A review of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) in Pigs. *Can. Vet. J.* 20: 65-69.
- 105.LIN, S. C.; TUNG, M. C.; LIU, C. I.; CHANG, C. F.; HUANG, W. C.; CHENG, C. W. (1972) An outbreak of Pseudorabies in swine in Pintung. *Chin. J. Microbiol.* 5: 56-57.
- 106.LINNE, T. (1987) Diagnosis of Pseudorabies virus infection in pigs with specific DNA probes. *Res. Vet. Sci.* 43: 150-156.
- 107.LIOU, P. P. (1986) The patterns in cross neutralization and immunodiffusion tests among swine Pseudorabies virus strains. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 12: 133-139.
- 108.LOFGREN, K. W.; STEVENS, J. G.; MARDSEN, H. S.; SUBAK-SHARPEE, L. (1977) Temperature sensitive mutants of Herpes simplex virus differ in the capacity to produce infections in mice. *Virol.* 76: 440-443.
- 109.LOMNICZI, B.; WATANABE, S.; BEN-PORAT, T. ; KAPLAN, A. S. (1984) Genetic basis of the neurovirulence of Pseudorabies virus. *J. Gen. Virol.* 52: 198-205.

- 110.LUDWIG, H.; HEPPNER, B.; HERRMANN, S. (1984) The genomes of different isolates of Aujeszky's disease virus. En: Wittmann, G., Gaskell, R.M.; Rziha, H. J. (eds.): Latent Herpesvirus infections. Curr. Top. Vet. Med. An. Sci. Vol 27, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 15-20.
- 111.LUKACS, N.; THIEL, H. J.; METTENLEITER, T.; RZIHA, H. J. (1985) Demonstration of three major species of Pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. J. Virol. 53: 166-173.
- 112.LLOYD, G.; BASKERVILLE, A. (1978) In vitro markers to differentiate an avirulent from a virulent strain of Aujeszky's Disease virus. Vet. Microbiol. 3: 65-70.
- 113.MACKEY, R. R.; DONE, J. T.; BURROWS, R. (1962) An outbreak of Aujeszky's Disease in pigs in Lincolnshire. Vet. Rec. 74: 669-671.
- 114.MAEDA, K.; KAWAGUCHI, Y.; ONO, M.; TAJIMA, T.; MIKAMI, T. (1995) Restriction endonuclease analysis of field isolates of Feline Herpes Virus type 1 and identification of heterogeneous regions. J. Clin. Microbiol. 33: 217-221.
- 115.MAES, R. K.; SCHULTZ, J. (1983) Evaluation in swine of a subunit vaccine against Pseudorabies. Am. J. Vet. Res. 44: 123-125.
- 116.MANSERVIGI, R.; CASSAI, E. (1991) The glycoproteins of the human herpesviruses. Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 14: 81-95.
- 117.MARCHIOLI, C. C.; YANCEY, R. J.; PETROVSKIS, E. A.; TIMMINIS, J. G.; POST, L. E. (1987) Evaluation of Pseudorabies virus glycoprotein gp 50 as a vaccine for Aujeszky's Disease in mice and swine: expression by vaccine virus and chinese hamster ovary cells. J. Virol. 61: 3977-3982.
- 118.MARTIN, S.; WARDLEY, R. C.; DONALDSON, A. J. (1983) Serological response of pigs infected with Aujeszky's Disease virus. Res. Vet. Sci. 35: 227-233.

- 119.MATSUOKA, T.; KURIHARA, T.; KONOSU, Y.; IJIMA, Y.; NARITA, M.; HARITANI, M. (1987) Demonstration of Aujeszky's Disease virus antigen in naturally infected cattle by immunoperoxidase method. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 725-727.
- 120.McCULLOUGH, S. J.; TODD, D.; (1988) Subclinical Aujeszky's Disease virus infection in a pig herd and the characterization of the strain of virus isolated. *Vet. Rec.* 122: 77-81.
- 121.McFARLAND, M. D.; HILL, H. T.; TABATABAI, L. B. (1987) Characterization of virulent and attenuated strains of Pseudorabies virus for thymidine kinase activity, virulence and restriction patterns. *Can. J. Vet. Res.* 51: 334-339.
- 122.McFARLANE, R. G.; THAWLEY, D. G. (1985) DNA hybridization procedure to detect Pseudorabies virus DNA in swine tissue. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1133-1136.
- 123.McFERRAN, J. B.; DOW, C. (1964) The excretion of Aujeszky's Disease virus by experimentally infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 5: 405-408.
- 124.McGINLEY, M. J.; PLATT, K. B. (1988) Studies on the ability of a 98-Kd Pseudorabies virus diagnostic antigen to detect latent infections induced by low-dose exposure to the virus. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1489-1493.
- 125.McGINLEY, M. J.; PLATT, K. B. (1989) Antibody response of Pseudorabies virus subunit-vaccinated pigs to viral nucleocapsid proteins following low-dose virus challenge of immunity. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1290-1293.
- 126.McGREGOR, S.; EASTERDAY, B. C.; KAPLAN, A.; BEN-PORAT, T. (1985) Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of Pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1494-1497.
- 127.MEDVECZKY, I.; TUBOLY, S. (1981) Diagnostic identification of Aujeszky's Disease by an immunodiffusion technique. *Acta Vet. Acad. Sci. Hungariae* 29: 45-51.

- 128.MENGELING, W. L. (1991) Virus reactivation in pigs latently infected with a thymidine kinase-vaccine strain of Pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 120: 57-70.
- 129.MERZA, M.; BELAK, S.; MOREIN, B. (1988) Characterization of an ISCOM prepared with envelope glycoproteins of Bovine Herpes virus type 1. *J. Vet. Med. B* 35: 695-703.
- 130.METTENLEITER, T. C.; LUKACS, N.; RZIHA, H. J. (1985) Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. *J. Virol.* 56: 307-311.
- 131.METTENLEITER, T. C.; SCHREURS, C.; ZUCKERMANN, F.; BEN-PORAT, T. (1987) Role of Pseudorabies virus glycoprotein gI in virus release from infected cells. *J. Virol.* 61: 2764-2769.
- 132.METTENLEITER, T. C. (1989) Glycoprotein gIII deletion mutants of Pseudorabies virus are impaired in virus entry. *Virology* 171: 623-625.
- 133.METTENLEITER, T. C.; ZSAK, L.; ZUCKERMANN, F.; SUGG, N.; KERN, H.; BEN-PORAT, T. (1990) Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of Pseudorabies virus. *J. Virol.* 64: 278-286.
- 134.METTENLEITER, T. C. (1991) Molecular biology of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 151-163.
- 135.METTENLEITER, T. C. (1994) Review : Pseudorabies (Aujeszky's disease virus) state of the art. *Acta Vet. Hung* 42: 153-177.
- 136.METTENLEITER, T. C.; SPEAR, P. (1994) Glycoprotein gB (gII) of Pseudorabies can functionally substitute for glycoprotein gB in Herpes Simplex Virus type 1. *J. Virol.* 68: 500-504.
- 137.MEYLING, A.; BITSCH, V. (1967) The diagnosis of Pseudorabies by the fluorescent antibody technique. *Acta Vet. Scand.* 8: 360.
- 138.MOCK, R. E.; CRANDELL, R. A.; MESTIN, G. M. (1981) Induced latency in Pseudorabies vaccinated pigs. *Can. J. Comp. Med.* 45: 56-59.

- 139.MOLITOR, T.; THAWLEY, D. (1987) Pseudorabies vaccines: past, present and future. *Compendium on Continuing Education Food Animal Practise* 9: 409-416.
- 140.MORAS, E.; IERACE, A.; BARBONI, A.; IRIBARREN, F.; BARCOS, O.; MENCHACA, E. (1986) Segundo aislamiento de Herpes Suis en un brote de la Enfermedad de Aujeszky en caninos de la Provincia de La Pampa. Libro de resúmenes del II Congreso Argentino de Virología, Córdoba, 20-24 de octubre.
- 141.MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HOGLUND, S.; DALSGAARD, K.; OSTERHAUS, A. (1984) ISCOM, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 308: 457-460.
- 142.MOREIN, B.; BELAK, S.; SOOS, T.; RUSVAI, M.; McGWIRE, B. S.; BOGNAR, K. (1989) ISCOM of viral envelope proteins protects against Aujeszky's Disease. *Vet. Microbiol.* 20: 143-154.
- 143.MOREIN, B. (1990) ISCOMS. *Vet. Microbiol.* 23: 79-84.
- 144.MORENO-LOPEZ, J. (1988) Nucleic-acid hybridization techniques in the diagnosis of infectious diseases. *Int. J. Anim. Sci.* 3: 149-156.
- 145.MOTHA, M. X. J.; OLIVER, R. E.; PENROSE, M. E.; FORBES, S. D.; MONTGOMERY, J. F. (1987) Evaluation of whole blood collected on to paper discs for the serodiagnosis of Aujeszky's Disease by ELISA. *N. Z. Vet. J.* 35: 77-79.
- 146.NARA, P. L. (1985) Porcine Herpesvirus 1. En: Olsen, R. D. et al (eds.): *Comparative Pathobiology of Viral diseases*. Vol 1, CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, 89-113.
- 147.NARITA, M.; IMADA, T.; TAKADA, M.; ISHIBASHI, K.; NEMOTO, F.; HARITANI, M.; KOBAYASHI, M. (1989) Detection of reactivating Pseudorabies virus in tissue by immunoperoxidase technique. *J. Comp. Pathol.* 101: 151-159.

148. NISHIMORI, T.; IMADA, T.; SAKURAI, M.; KITABAYASHI, T.; KAWAMURA, H.; NAKAJIMA, H. (1987) Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's Disease viruses isolated in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 365-367.
149. NOSETTO, E. O.; ECHEVERRÍA, M. G.; GIMENO, E. J.; PECORARO, M. R. I.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. (1990) Development of an indirect and a dot-ELISA to detect antibodies to porcine Pseudorabies virus in Argentina. *Proc. Final Res. Coord. Meet. FAO/IAEA/SIDA: 59-64, Heredia, Costa Rica, 22-26 de octubre.*
150. NOSETTO, E. O.; ECHEVERRIA, M. G.; HORIMOTO, T.; LIMCUMPAO, J.; GALOSI, C. M.; TOHYA, Y.; NORIMINE, J.; TAKAHASHI, E.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; MIKAMI, T. (1993) Characterization of several Pseudorabies viral strains by virus neutralization test using monoclonal antibodies. *Proceeding of the 2nd Meet. Coop. Res. Project in the area of Vet. Sci. between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency (JICA) agosto 12-14, 41-45.*
151. ONNO, M.; JESTIN, A.; NICOLAS, J.C. (1988) Rapid diagnosis of Aujeszky's Disease in fattened pigs by direct immunoperoxidase labelling in nasal cells. *Vet. Med. Rev.* 59: 152-156.
152. ONYEKABA, C.; BUEON, L.; KING, P.; FAHRMANN, J.; GOYAL, S. (1987) Susceptibility of various cell culture systems to Pseudorabies virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 163-166.
153. OSORIO, F. (1990) Estado actual en el desarrollo de vacunas virales. *Memorias Congreso Nacional de Producción porcina. VI Jornadas de actualización porcina, Río Cuarto, Córdoba, 13-15 setiembre.*
154. PAPP-VID, G.; DULAC, G. C. (1979) Pseudorabies: adaptation of the counter current immunoelectrophoresis for the detection of antibodies in porcine serum. *Can. J. Comp. Med.* 43: 119- 124.

155. PAUL, P.; MENGELING, W.; PIRTLE, E. (1982) Differentiation of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 73: 193- 198.
156. PAULI, G.; BUND, K.; PODESTÁ, B. (1982) Antigenic components of Aujeszky's Disease virus. En: Wittmann, G.; Hall, S. A. (eds): *Aujeszky's Disease. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 23-27.
157. PEETERS, B.; de WIND, N.; HOOISMA, M.; WAGENAAR, F.; GIELKENS, A.; MOORMANN, B. (1992) Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp 50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J. Virol.* 66: 894-905.
158. PFEIFFER, N. E.; SCHIPPER, I. A. (1979) Evaluation of Pseudorabies viral antigens in the agar gel immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* 40: 595-598.
159. PIANOVI, C. (1982) Enfermedad de Aujeszky -epidemiología y control-. *Memorias de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Jornadas de Actualización Porcina. Enfermedades Infecciosas, 23-25 de septiembre, 77-84.*
160. PLATT, K. B.; MARE, C. J.; HINZ, P. N. (1979) Differentiation of vaccine strains and field isolates of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus: thermal sensitivity and rabbit virulence markers. *Arch. Virol.* 60: 13-23.
161. PLATT, K. B.; MARE, C. J.; HINZ, P. N. (1980) Differentiation of vaccine strain and field isolates of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus: trypsin sensitivity and mouse virulence markers. *Arch. Virol.* 63: 107-114.
162. PLATT, K. B. (1982) The porcine humoral response to detergent-extracted Aujeszky's Disease (Pseudorabies) virus antigens. *Vet. Microbiol.* 7: 515-534.
163. PLATT, K. B. (1984) The evaluation of a lectin-agarose based subunit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's Disease (Pseudorabies) in pigs. *Vet. Microb.* 9: 35-51.

164. QUINT, W. M.; GIELKENS, A.; VAN OIRSCHOT, J.; BERNIS, A.; CUYPERS, T. (1987) Construction and characterization of deletion mutants of Pseudorabies virus: a new generation of 'live vaccines'. *J. Gen. Virol.* 68: 523-534.
165. QVIST, P.; MEYLING, A.; HOFF-JORGENSEN, R. (1990) Detection by enzyme linked immunosorbent assay of Aujeszky's Disease virus in tissues of infected pigs. *J. Clin. Microb.* 28: 383-383.
166. RAWLS, W. E. (1985) Herpes Simplex virus. En: Fields, B. N. et al (eds.): *Virology*. Raven Press, New York, 527-552.
167. REA, T. J.; TIMMINS, J. G.; LONG, G. W.; POST, L. E. (1985) Mapping and sequence of the gene for the Pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J. Virol.* 54: 21-29.
168. REISIG, M.; KAPLAN, A. S. (1962) The morphology of non-infective Pseudorabies virus produced by cells treated with 5- fluoroacil. *Virol.* 16: 1-8.
169. ROBBINS, A. K.; WATSON, R. J.; WHEALY, M. E.; HAYS, W. W.; ENQUIST, L. W. (1986) Characterization of a Pseudorabies virus glycoprotein gene with homology to Herpes Simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein C. *J. Virol.* 58: 339-347.
170. ROBBINS, A. K.; WHEALY, M. E.; WATSON, R. J.; ENQUIST, L. W. (1986) Pseudorabies virus gene encoding glycoprotein gIII is not essential for growth in tissue culture. *J. Virol.* 59: 635-645.
171. ROBBINS, A. K.; DORNEY, D. J.; WATHEN, M. W.; WHEALY, M. E.; GOLD, C.; WATSON, R. J.; HOLLAND, L. E.; WEED, S. D.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J. C.; ENQUIST, L. W. (1987) The Pseudorabies virus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of Herpes Simplex virus. *J. Virol.* 61: 2691-2701.
172. ROCK, D. L.; REED, D. E. (1984) The evaluation of an experimental Porcine Herpesvirus 1 (Aujeszky's Disease virus) subunit vaccine in mice. *Vet. Microbiol.* 9: 35-51.

173. ROCK, D. L.; HAGEMOSER, W. A.; OSORIO, F. A.; McALLISTER, H. A. (1988) Transcription from the Pseudorabies virus genome during latent infection. *Arch. Virol.* 98: 99-106.
174. ROCKBORN, G.; HYLLSETH, B. (1968) The second outbreak of Pseudorabies in Sweden. *Nord. Vet. Med.* 20: 193-196.
175. RODAK, L.; SMID, B.; VALICEK, L.; JURAK, E. (1987) Four layer enzyme immunoassay (EIA) detection of differences in IgG, IgM and IgA antibody response to Aujeszky's Disease virus in infected and vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.* 13: 121-133.
176. ROIZMAN, B.; CARMICHEL, L. E.; DEINHARDT, F.; de-THE, G.; NAHMIAS, A. J.; PLOWRIGHT, W.; RAPP, F.; SHELDRIK, P.; TAKAHASHI, M.; WOLF, K. (1981) Herpesviridae. *Intervirology* 16: 201-217.
177. ROIZMAN, B.; BATTERSON, W. (1985) Herpesviruses and their replication En: Fields, B. N. et al (eds.): *Virology*. Raven Press, New York, 497-526.
178. ROIZMAN, B. (1990) Herpesviridae: a brief introduction. En: Fields, B. N.; Knipe, D. M. et al (eds.): *Virology*. 2nd edition, Raven Press Ltd, New York, 1787-1793.
179. ROIZMAN, B.; SEARS, A. E. (1990) Herpes Simplex viruses and their replication. En: Fields, B. N.; Knipe, D. M. et al (eds.): *Virology*. 2nd edition, Raven Press Ltd, New York, 1795-1841.
180. ROIZMAN, B. (1991) Clasification and nomenclature of viruses. Fifth report of the Int. Committee on Taxonomy of Viruses. En: Francki, R. I. B.; Fauquet, C. M.; Knudson, D. L.; Brown, F (eds.): *Arch. Virol.* 2 Supplementum. Springer-Verlag, Wien, New York, 3-110.
181. ROIZMAN, B.; BAINES, J. (1991) The diversity and unity of herpesviridae. *Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.* 14: 63-79.

182. ROIZMAN, B.; DEROSIENS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. (1992). The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123: 425-449.
183. ROSZKOWSKI, J.; BARTOSZCZE, M.; ZADURA, J.; SWIATEK, Z. (1978) Use of immunoenzyme technique for the detection of Aujeszky's Disease virus in cell culture. *Vet. Rec.* 102: 462-463.
184. RZIHA, H. J.; DOLLER, P. C.; WITTMANN, G. (1982) Detection of Aujeszky's Disease virus and viral DNA in tissues of latently infected pigs". En: Wittmann, G.; Hall, S. A. (eds): *Aujeszky's Disease. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 205-210.
185. SABO, A.; RAJCANI, J. (1976) Latent Pseudorabies virus in pigs. *Acta Virol.* 20: 208-214.
186. SAGER, R. L.; ROSSANIGO, C. E.; VAZQUEZ, R.; AVILA, J. D.; FONDEVILA, N. (1984) Enfermedad de Aujeszky en cerdos en Villa Mercedes (San Luis) Argentina. *Rev. Med. Vet. (Bs.As)* 65: 86-89.
187. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning- A laboratory manual*. 2nd. Edition Cold Spring Harbor Lab Press, New York.
188. SCHANG, L. M.; OSORIO, F. A. (1994) Quantitation of latency established by attenuated strains of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus. *J. Virol. Meth.* 50: 269-280.
189. SHIBATA, I.; HAMANO, A.; HIRAI, H.; HUKAMI, S.; YABIKI, T. (1988) Detection of antibodies to Aujeszky's Disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay in pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50: 828-831.
190. SHIBATA, I.; ASAI, T.; AKASHI, H.; INABA, Y. (1992) Characterization of Japanese isolates of Aujeszky's Disease virus by restriction endonuclease cleavage patterns, virulence in mice and thymidine kinase activity. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 523- 528.

191. SHIMIZU, M. (1986) Effect of a subunit vaccine prepared from virus-infected cell membrane on Aujeszky's Disease in pigs. *Japan Agriculture Research Quarterly (JARQ)* 20: 68-71.
192. SNOWDEN, W.; HALLIBURTON, Y. (1985) Identification of cross-reacting glycoproteins of four Herpes virus by western blotting. *J. Gen. virol.* 66: 2039-2044.
193. SNYDER, M. L.; STEWART, W. C. (1977) Application of an enzyme-labelled antibody test in Pseudorabies. *Am. Assoc. Vet. Diag. Proc.* 20: 17-22.
194. SORENSEN, K. J.; LEI, J. C. (1986) Aujeszky's Disease: blocking ELISA for the detection of serum antibodies. *J. Virol. Meth.* 13: 171-181.
195. STEVELY, W. (1975) Virus-induced proteins in Pseudorabies- infected cells. II- Proteins of the virion and nucleocapsid. *J. Virol.* 16: 944-950.
196. SUAREZ HEINLEIN, A.; PIANOV, C.; FONDEVILA, N.; RODRIGUEZ, M. (1991) Estudio comparativo de las pruebas de punto inmune y látex para la detección rápida de anticuerpos en la Enfermedad de Aujeszky. *Rev. Med. Vet.* 72: 186-189.
197. THACKER, B. J.; GONZALEZ, P. L. (1988) Infectious reproductive diseases in swine. *Compendium on Continuing education for the practicing veterinarian* 10: 669-679.
198. THIERY, R.; BOUTIN, P.; ARNAULD, C.; JESTIN, A. (1994) Pseudorabies virus latency: a quantitative approach by polymerase chain reaction. *Acta Vet. Hung.* 42: 277-287.
199. THIRY, E.; DUBUISSON, J.; PASTORET, P. (1986) Patogenia, latencia y reactivación de las infecciones provocadas por Herpesvirus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 5: 829-836.

200. THOMSEN, D. R.; MARCHIOLI, C. C.; YANCEY, R. J.; POST, L. E. (1987) Replication and virulence of Pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. *J. Virol.* 61: 229-232.
201. TISDALL, D. J.; BENTLEY, C. B.; HORNER, G. (1988) Genetic variation between New Zealand and Western Samoan Isolates of Aujeszky's Disease virus. *Vet. Microbiol.* 17: 335-343.
202. TODD, D.; McNAIR, J.; McNULTY, M. S.; McFERRAN, J. B. (1981) Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's Disease virus in pigs. *Vet. Rec.* 109: 534-537.
203. TODD, D.; HULL, J.; McNAIR, J. (1987) Antigenically important proteins of Aujeszky's Disease (Pseudorabies) virus identified by immunoblotting. *Arch. Virol.* 96: 215-224.
204. TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of the proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
205. TOZZINI, F. (1982) Characteristics of field and modified Aujeszky's Disease strains. En: Wittmann, G.; Hall, S. A. (eds): Aujeszky's disease. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* Vol 17. Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 31-36.
206. TRÉPANIER, P.; MINOCHA, H.; IBRAHIM, A.; SHEIKH-OMAR, A.; MONTPETIT, C.; LECOMTE, J.; ALAIN, R.; INSSIER, G.; TRUDEL, M. (1988) Further biological, serological and biochemical characterization of North American, European and Southeast Asian strains of Bovine Herpes virus 1 compared with other alphaherpesvirinae members. *Vet. Microbiol.* 18: 219-231.
207. URSACHE, R.; ALLIOT, A. (1987) Detection des anticorps du virus d'Aujeszky par le test ELISA et la seroneutralisation. *Revue Méd. Vét.* 138: 253-261.

208. VAN OIRSCHOT, J. T. (1984) Latency of virulent Aujeszky's Disease virus in pigs is not prevented by passive or active immunization. En: Wittmann, G.; Gaskell, R. M.; Rziha, H. J. (eds.): Latent herpesvirus infections in Veterinary medicine. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 27, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 417-427.
209. VAN OIRSCHOT, J. T. GIELKENS, A. L. (1984) *In vivo* and *in vitro* reactivation of latent Pseudorabies virus in piglets born to vaccinated sows. J. Am. J. Vet. Res. 45: 567- 571.
210. VAN OIRSCHOT, J. T.; RZIHA, H. J.; MOONEN, P. J.; POL, J. M.; VAN ZAANE, D. (1986) Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's Disease virus by a competitive Enzyme Immunoassay. J. Gen. Virol. 67: 1179-1182.
211. VAN OIRSCHOT, J. T.; de WAAL, C. A. H. (1987) An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. Vet. Rec. 121: 305-306.
212. VAN OIRSCHOT, J. T.; GIELKENS, A. L. J.; MOORMANN, R. J. M.; BERNS, A. J. M. (1990) Marker vaccines, virus protein-specific antibodies assays and control of Aujeszky's Disease. Vet. Microbiol. 23: 85-101.
213. WARDLEY, R. C.; POST, L. E. (1989) The use of the gX-deleted vaccine PRVTKgX-1 in the control of Aujeszky's Disease. En: Van Oirschot, J. T. (ed.): Vaccination and control of Aujeszky's Disease. Vol 49. Dordrecht Kluwer Academic Publications, Germany, 13-25.
214. WATHEN, M. W.; PIRTLE, E. C. (1984) Stability of the Pseudorabies genome after *in vivo* serial passage. J. Gen. Virol. 65: 1401-1404.
215. WATHEN, M. W.; WATHEN, L. M. K. (1984) Isolation, characterization and physical mapping of a Pseudorabies virus mutant containing antigenically altered gp 50. J. Virol. 51: 57-62.

216. WATHEN, M. W.; WATHEN, L. M. K. (1986) Characterization and mapping of a nonessential Pseudorabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 58: 173- 178.
217. WHEALY, M. E.; ROBBINS, A. K.; ENQUIST, L. W. (1988) Pseudorabies virus glycoprotein gIII is required for efficient virus growth in tissue culture. *J. Virol.* 62: 2512-2515.
218. WILDY, P.; WATSON, D. (1963) Electron microscope studies on the structure of animal viruses. *Cold Spring Harbour Symposium Quant Biol* 27: 25-47.
219. WILDY, P. (1986) Herpesvirus. *Intervirology* 25: 117-140.
220. WILLIAMS, P. P.; CORIA, M. F.; PIRTLE, E. C.; ERICKSON, G. A. (1984) Comparison of a modified counterimmunoelectrophoresis test and a microimmunodiffusion test for detection of Pseudorabies virus antibodies in porcine sera. *Can. J. Comp. Med.* 48: 92-96.
221. WITTMANN, G.; HOHN, V.; WEILAND, F.; BOHN, H. O. (1982) Experimental nasal infection of cattle with Aujeszky's Disease virus (A. D. V). En: Wittmann, G.; Hall, S. A. (eds.): *Aujeszky's Disease. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 117-122.
222. WITTMANN, G.; OHLINGER, V.; RZIHA, H. J. (1983) Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's Disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. *Arch. virol.* 75: 29- 41.
223. WITTMANN, G.; OHLINGER, V.; RZIHA, H. J. (1984) Latency of Aujeszky's Disease virus (A. D. V.) following challenge in previously vaccinated pigs. En: Wittmann, G.; Gaskell, R. M.; Rziha, H. J. (eds.): *Latent Herpes virus infections in Veterinary Medicine. Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 27*, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 445-455.
224. WITTMANN, G. (1986) La enfermedad de Aujeszky. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 5: 995-1009.

225. WITTMANN, G. (1991) Spread and control of Aujeszky's Disease (A.D.). *Comp. Immun. Microbiol. Infec. Dis.* 14: 165-173.
226. WÖLFER, U.; KRUF, V.; SAWITZKY, D.; HAMPL, H.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; HABERMEHL, K. O. (1990) Processing of Pseudorabies virus glycoprotein gII. *J. Virol.* 64: 3122-3125.
227. WONGWATCHARADUMRONG, R.; MORENO-LOPEZ, J. (1990) Comparison between results of virus neutralization test and those of two ELISAs when screening for antibodies to Pseudorabies virus in Thailand. *J. Vet. Med. B* 37: 197-202.
228. YAMADA, S.; SEKIKAWA, K.; SHIMIZU, Y. (1989) Molecular biology of Aujeszky's Disease virus. *Progress in Vet. Sci.* 63-84.
229. YAMADA, S.; IMADA, T.; NISHIMORI, T.; SEKIKAWA, K.; SHIMIZU, M. (1991) Antigenic variation of Pseudorabies virus glycoproteins gII and gIII demonstrated by neutralizing monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 119: 285-290.
230. YAMADA, S.; NISHIMORI, T.; SHIMIZU, M. (1992) Characterization of Pseudorabies viruses isolated in Japan by restriction endonuclease assay. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 541-549.
231. ZSAK, L.; SUGG, N.; BEN-PORAT, T. (1992) The different interactions of a gIII mutant of Pseudorabies with different cell types. *J. Gen. Virol.* 73: 821-827.
232. ZUCKERMANN, F.; ZSAK, L.; REILLY, L.; SUGG, N.; BEN-PORAT, T. (1989) Early interactions of Pseudorabies virus with host cells: functions of glycoprotein gIII. *J. Virol.* 63: 3323-3329.
233. ZUCKERMANN, F.; ZSAK, L.; METTENLEITER, T. C.; BEN-PORAT, T. (1990) Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *J. Virol.* 64: 802-812.
234. ZUFFA, A.; MATIS, J.; PLEVA, V. (1968) Studies on several strains of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus showing different virulence by means of

the immuno- and acridin orange fluorescence. Arch. für die gesamte
virusforschung 24: 396-405.