

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**CARACTERIZACIÓN DE HERPES VIRUS
BOVINO (HVB) AISLADOS RECIENTEMENTE EN EL URUGUAY**

por

Rodrigo Eduardo PUENTES PALOMBO



TRABAJO FINAL presentado como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
(Orientación Tecnología de los
Alimentos)

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

030 TG

Caracterización

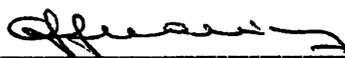
Puentes Palombo, Rodrigo Eduardo



FV/26556

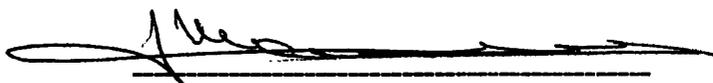
TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:



Nombre completo y Firma
HELENA GUARINO

Segundo Miembro (Tutor):



Nombre completo y Firma
Jacqueline Maisonnave

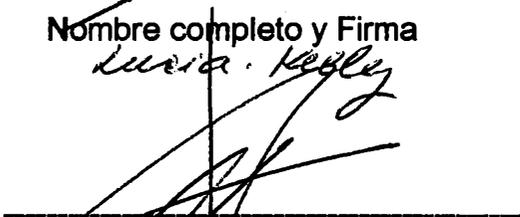
Tercer Miembro:



Nombre completo y Firma

Lucia Kelly

Co tutor:



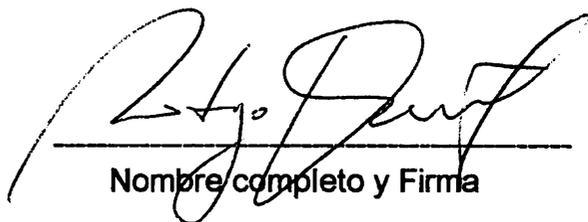
Nombre completo y Firma

MARTIN BLEVINS

Fecha:

29/09/2005

Autor:



Nombre completo y Firma

RODRIGO PUENTES

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	2
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
4.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE.....	4
4.2. CLASIFICACIÓN DEL HVB-1 EN DIFERENTES SUBTIPOS.....	5
4.3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	6
4.4. LATENCIA.....	7
4.5. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	8
4.6. RESPUESTA DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR HVB-1.....	9
4.7. DIAGNÓSTICO Y CONTROL.....	10
5. <u>OBJETIVO</u>	12
6. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	13
6.1 VIRUS	13
6.2 IDENTIFICACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD).....	13
6.3 TITULACIÓN, PROPAGACIÓN Y CONCENTRACIÓN VIRAL.....	13
6.4 EXTRACCIÓN DE DNA VIRAL.....	14
6.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	14
6.6 CORTE DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR CON ENZIMAS.....	14
6.7 ENSAYO DE INMUNOPEROXIDASA EN MONOCAPA.....	15
6.8 POLIMORFISMO DEL LARGO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)	15
7. <u>RESULTADOS</u>	16
8. <u>DISCUSIÓN</u>	17
9. <u>CONCLUSIONES</u>	19
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	20

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, muy especialmente a mi madre, a mi padre, a mi hermana, a mi abuela. Los considero como el gran incentivo de este logro, y el apoyo incansable ante cualquier necesidad que pude haber tenido. Creo que lo más importante no fue el apoyo económico que me dieron, que sin duda fue clave, pero el amor, la alegría, la confianza y el incentivo desde todo momento en diversas circunstancias. Les agradezco mucho por comprenderme en los momentos que no pude estar junto a ellos en todo este tiempo. A todos mis tíos y primos sin excepciones, a Fabián, Kimon, Pelusa, Kathe, Alfonso, Lucia, Cristina, Zulma y Elida que de algún modo me incentivaron también. Y a todos los que ya no están junto a nosotros les agradezco desde donde se encuentren.

A Natasha, mi gran compañera, le agradezco profundamente y le pido disculpas por muchas veces "atomizarla" con mi trabajo en el laboratorio, y estoy seguro que hoy, ella podría defender esta tesis casi que como yo, pues fue en muchas oportunidades mi gran consejera. Supo postergar sin rencor ni quejas, muchas de nuestras salidas y diversiones, por horas que me tocaba pasar en el laboratorio. Espero que le haya servido para su carrera, todo lo compartido durante este tiempo.

A la querida Facultad de Veterinaria de la Universidad de la Republica por ser nuestra gran escuela. Agradezco a todos los que en algún momento, en algún lugar de ella, por diferentes razones, con diferentes ánimos, nos cruzamos e intercambiamos ideas, conocimientos o simplemente conversaciones vagas, que nos hicieron crecer juntos.

A la Asociación de estudiantes de veterinaria (AEV), nuestro gremio, por el cual aprendí muchas de las cosas que hoy, desde otra óptica, siento que me hicieron "más universitario". No podemos ignorar esta inmensa responsabilidad de participación que nos compete a todos los estudiantes universitarios de que en algún momento de nuestra carrera, debamos intercambiar ideas y aportes, en post de una universidad cada vez mejor y más justa para todos.

A mis amigos: Alejandro, Mauricio, Betina, España, Chile, Tato, Charoná, Maria Olga, "el Pastor", "el Pi", Paola, Valeria Berruti, "la Hannay", "la negra", Rodrigo García, "el blanquito", Ana Steineck, Cesar, Germán, Orestes, Guille Cazulli, Anita, Santana, "la gallega", Graña, Leticia, "el pupa", "beto". No olvidaré jamás de todo lo compartido durante este tiempo de Facultad con cada uno de ellos, en diferentes momentos. Les agradezco sinceramente por ser como son y espero que dentro unos años y en otro contexto, podamos revivir todo esto.

A todos los compañeros del Área de Inmunología, que constantemente me han apoyado en las actividades allí realizadas. Muy especialmente a Jacqueline, Martin, Fernanda, Pablo, Uruguay y Hernán quienes juntos mucho compartimos. Aprendí no solo de inmunología, si no que de conceptos sobre la investigación científica y sobre todo aprendí mucho de mi gran compañero de muchas horas "el herpesvirus". Sinceramente les agradezco mucho a todos ellos, y espero que podamos continuar juntos en esta búsqueda incansable por el saber.

También agradezco mucho a los investigadores del laboratorio de virología del Instituto de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor (IPVDF), RS-Brasil, muy especialmente a Paulo Roehe, Paulinho, Alessandra y Fernando Spilki, que me ayudaron mucho con sus experiencias y conocimientos, para poder hacer este trabajo. La verdad que fueron unos verdaderos amigos, que mucho les agradezco y los recuerdo con mucho cariño.

Asimismo quiero agradecer a los investigadores de la Sección de Virología de la Facultad de Ciencias, que me apoyaron mucho para poder realizar la caracterización de estos virus, muy especialmente a Juan Arbiza, Sandra Frabasile y Lorena Tomé. Muchas Gracias por la disposición y la buena onda.

Tampoco puedo olvidarme de los animales a quienes simbólicamente les pido disculpas, ya que dependemos de ellos muchas veces y en algunas circunstancias nos prestan, o mejor dicho les quitamos la vida "justificadamente" por un resultado o aporte a la ciencia.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Fig. I: INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA CON ANTICUERPOS ANTI HVB-1.....	27
Fig. II: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	28
Fig. III: CORTE DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR CON ENZIMAS (<i>Bgl</i>II y <i>Ddel</i>).....	29
Cuadro I: REACCIÓN DE LAS CEPAS CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	30
Fig. IV: INMUNOPEROXIDASA DE LAS CEPAS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	31
Fig. IV: POLIMORFISMO DEL LARGO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP).....	32

1. RESUMEN

Herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) es agente etiológico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Vulvovaginitis/Balanopostitis pustular infecciosa. HVB-1 presenta tres subtipos (HVB-1.1, HVB-1.2a y HVB-1.2b). Los subtipos HVB-1.1 y HVB-1.2a clínicamente pueden cursar con síntomas respiratorios, conjuntivitis, signos clínicos nerviosos, infertilidad y abortos. El subtipo HVB-1.2a además puede producir enfermedad genital (IPV/IBP). Por otro lado el HVB-1.2b, esta asociado a IPV/IBP y no se encuentra asociado a abortos. En Uruguay existen evidencias clínicas y epidemiológicas de la presencia de la enfermedad desde la década del 70, siendo aislado por primera vez en el año 1981. En los últimos años se aislaron tres nuevas cepas de HVB de animales infectados naturalmente. El objetivo de este trabajo es la identificación y caracterización de los dos últimos aislamientos, utilizando técnicas inmunológicas (inmunofluorescencia directa y inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales) y moleculares (PCR y análisis por enzimas de restricción). Los resultados demuestran que las dos cepas pertenecen al subtipo HVB-1.2. Una se caracteriza como HVB-1.2a, mientras que la otra presenta un patrón similar a HVB-1.2b, basado en la digestión del DNA con la enzima *HindIII*. Por primera vez en Uruguay se aísla y caracteriza HVB-1.2, permitiéndonos comunicar su presencia en los rodeos bovinos del territorio. La HVB-1.2a fue aislada de un animal al cual previamente se le había aislado una cepa de HVB-1.1, demostrándose la posibilidad de reinfección natural con subtipos de HVB diferentes.

2. SUMMARY

Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is the etiological agent of Infectious Bovine Rhinotracheitis and Infectious vulvovaginitis/balanopostitis. BHV-1 has been subdivided into three subtypes (BHV-1.1, BHV-1.2a and BHV-1.2b). Subtypes BHV-1.1 and BHV-1.2a may cause respiratory disease, conjunctivitis, neurological signs, infertility and abortion. BHV-1.2a subtype can also cause genital disease (IPV/IBP). While BHV-1.2b is associated to genital infection, but has not been linked to abortions. In Uruguay there were clinical and epidemiological evidence of the disease since 1970, and was isolated for the first time in 1981. Lately three new BHV strains were isolated from naturally infected bovines. The objective of the present work is to identify and characterize the last two isolates. By means of immunological assays (direct immunofluorescence and immunoperoxidase techniques using monoclonal antibodies), and molecular techniques (PCR and restriction enzyme analysis).

Results show that both isolates belong to subtype BHV-1.2. Based on *HindIII* restriction enzyme digestion one was characterized as BHV-1.2a and the other has a pattern similar to BHV-1.2b.

BHV-1.2 was isolated and characterized for the first time in Uruguay. This allows us to confirm the presence of this subtype in our herds. The BHV-1.2a was isolated from the same animal from which a BHV-1.1 was isolated previously. This is showing the possibility of natural re-infection with two different BHV sub-types.

3. INTRODUCCIÓN

El herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) y el herpesvirus bovino tipo 5 (HVB-5), pertenecen a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alphaherpesvirinae*, género *varicellovirus* (Roizmann y col., 1992). El HVB-1 es el agente etiológico de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y de Vulvovaginitis/Balanopostitis pustular infecciosa (IPV/IBP), mientras que el HVB-5 es el responsable de la encefalitis herpética de los bovinos (Studdert, 1989; Roizmann y col., 1992). El HVB-1 presenta tres subtipos (HVB-1.1, HVB-1.2a y HVB-1.2b). Los subtipos HVB-1.1 y HVB-1.2a clínicamente pueden cursar con síntomas respiratorios, conjuntivitis, signos clínicos nerviosos, infertilidad y abortos. Por otro lado el HVB-1.2b, esta asociado a la enfermedad genital (IPV/IBP) y no se encuentra asociado a abortos (Metzler y col., 1985; Miller y col., 1991).

El HVB-1 se encuentra diseminado prácticamente por todo el mundo (Kahrs, 1977). Es considerado la causa más importante de abortos de etiología viral en los bovinos (Ackermann y col., 1990).

En el Uruguay se ha detectado la presencia del herpes virus bovino (HVB) por aislamiento viral (Guarino y col., 1981; Rivero y col., 1987; Alonzo y col., 2002), hibridización de ácidos nucleicos (Rivero y col., 1997) así como por detección de animales seropositivos (Saizar, 1997; Repiso y col., 2001). El agente fue aislado por primera vez en 1981, de un animal seropositivo, inmunodeprimido con corticoides (Guarino y col., 1981).

En el año 1999 se logró aislar una cepa de HVB en nuestro país (Uy1999) de hisopados oculares y nasales de un bovino macho Limousin de nueve meses de edad con signos neurológicos, corrimiento ocular y nasal unilateral (Alonzo y col., 2002).

Por otro lado en el año 2002 se aisló la cepa Uy2002 a partir de líquido seminal de un toro Hereford de 5 años seropositivo a HVB, mediante un protocolo experimental de inmunodepresión con corticosteroides.

Posteriormente en el año 2004, se logro el aislamiento de una nueva cepa (Uy2004) a partir de muestras de líquido seminal, post inmunodepresión, del mismo animal que fue aislada la cepa Uy1999.

Hasta el momento en nuestro país, se ha caracterizado solamente una cepa de HVB (HVB-1.1), utilizando enzimas de restricción (Alonzo y col., 2002), mientras que se desconoce la presencia de HVB-1.2a, HVB-1.2b y HVB-5.

4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

4.1 DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

Los herpesvirus son virus envueltos, que presentan en su genoma una doble cadena de DNA lineal, rodeado por una cápside icosaédrica, recubierta por una envoltura lipoproteica. Son sensibles al éter y otros solventes lipídicos, así como a pH extremos.

En lo que se refiere al DNA del HVB-1, posee alrededor de 136 kilobases (Kb), que codifica por lo menos 69 proteínas. Este DNA puede ser dividido en un segmento único largo (U_L) de 102 a 104 Kb, y un segmento único corto (U_S) de aproximadamente 11 Kb (Tikoo y col., 1995; Schwyzer y Ackermann, 1996). Esta estructura genómica es común al HVB-1 y HVB-5 (Roizmann y col., 1992).

En cuanto a las proteínas codificadas por este virus, se describen en base a su función, proteínas de envoltura viral (glicoproteínas), proteínas de la cápside viral, enzimas (ej. Timidina kinasa, dUTPasa, DNA polimerasa), proteínas regulatorias y otras que aun se desconocen su función (Schwyzer y Ackermann, 1996).

Del punto de vista antigénico, las glicoproteínas por su localización en la superficie del virus, son importantes blancos del sistema inmune. Juegan un rol fundamental en la patogenicidad por mediar la entrada del virus en la célula del huésped y la diseminación del virus de célula a célula. Al menos diez se han identificado denominándolas glicoproteínas B (gB), C (gC), D (gD), E (gE), I (gI), H (gH), L (gL), G (gG), K (gK) y M (gM). Poseen un peso molecular aproximado que varía entre 17 a 101 Kilodaltons (Kda). Actualmente algunas de estas glicoproteínas (ej. gE y gI), están siendo utilizadas en la elaboración de vacunas diferenciales (van Oirschot, 1999b).

4.2 CLASIFICACIÓN DEL HVB EN DIFERENTES SUBTIPOS

Antiguamente los HVB eran divididos teniendo en cuenta apenas criterios clínicos y serológicos (Kahrs, 1977). La primera subdivisión propuesta fue basada en diferencias clínicas existentes (asociadas a enfermedades respiratorias o abortos y enfermedades genitales), permitiendo la distinción de muestras asociadas al IBR, como "IBR-like" y las asociadas al IPV, como "IPV-like" (Ludwig, 1983).

Al utilizar técnicas moleculares, se han podido detectar diferencias significativas en los perfiles genómicos de las cepas de HVB. Éstas técnicas, tal como el análisis con enzimas de restricción (REA) o también llamado polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) han sido ampliamente utilizadas con este fin (Hayward y col., 1975; Engels y col., 1981; Mayfield y col., 1983; Misra y col., 1983; Osorio y col., 1985; Seal y col., 1985; Miller y col., 1988; Varady y col., 1994).

Otra herramienta para poder diferenciar distintas cepas de HVB-1, es mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Mabs) (Metzler y col., 1985; Rijsewijk y col., 1999; D'arce y col., 2002). Por ejemplo el Mab 71 que está dirigido contra algunos aminoácidos de la glicoproteína C del HVB-1, puede diferenciar los subtipos HVB-1.1 de HVB-1.2 (Rijsewijk y col., 1999).

Utilizando REA y Mabs, Metzler y col. (1985) propusieron la denominación de HVB-1.1 (las cepas asociadas a IBR o abortos), HVB-1.2a (las cepas asociadas a IBR, abortos e IPV) y HVB-1.2b (la cepa asociada a IPV/IBP). De la misma manera, las muestras "IBR-like" y "IPV-like" previamente descritas correspondieron a los subtipos HVB-1.1 y HVB-1.2, respectivamente.

Miller y col. (1991) confirmaron el carácter abortivo de las cepas HVB-1.1 y HVB1.2a, mientras que la cepa HVB-1.2b no produjo aborto luego de la inoculación endovenosa en hembras gestantes.

En cuanto a las cepas encefalogénicas, Metzler y col. (1986) la habían clasificado inicialmente como una cepa de HVB-1 (HVB-1.3), hasta su clasificación actual como HVB-5 (Roizmann y col., 1992).

Las similitudes en las secuencias genómicas basados en los sitios de restricción, es de aproximadamente 95% entre HVB-1.1 y HVB-1.2 (Mayfield y col., 1983; Seal y col., 1985). Por otro lado estas similitudes son de 85% entre los genomas de HVB-1 y HVB-5 (Engels y col., 1986).

4.3 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

El HVB-1 se encuentra diseminado prácticamente por todo el mundo (Kahrs, 1977). En lo que se refiere a América de Sur, se ha diagnosticado la enfermedad en diversos países, siendo el porcentaje de prevalencia serológica muy variable en algunos de ellos (Alice, 1978; Griffiths y col., 1983; Galarza y Periolo, 1983; Carrillo y col., 1983; Anunciação y col., 1989; Weiblen y col., 1992; Lovato y col., 1995; Vidor y col., 1995; Riedmann y col., 1996; Obando y col., 1999; Stahl y col., 2002; Campero y col., 2003).

En el Uruguay el primer aislamiento fue en el año 1981, de un animal seropositivo, inmunodeprimido con corticoides (Guarino y col., 1981). Los últimos estudios serológicos para esta enfermedad, demuestran que la prevalencia por HVB en ganado de carne es de 37% y en ganado de leche 44-48%. El porcentaje de establecimientos con animales seropositivos, supera el 90% (Saizar, 1997; Repiso y col., 2001).

En cuanto a la transmisión de la enfermedad, la infección natural por HVB-1 ocurre a través de la transmisión directa por aerosoles o por contacto entre animales infectados (Mars y col., 2000). Las puertas de entrada potenciales para el virus son la cavidad nasal, ojos y tracto genital. Durante la infección primaria, cuando el virus se está replicando intensamente, una cantidad importante de partículas virales están presentes en exudados nasales y los animales infectados son altamente contagiosos (Turín y col., 1999). La excreción viral ocurre durante un período de 4 a 17 días y los títulos virales máximos se alcanzan a los 4 a 6 días post infección (Tikoo, 1995).

La transmisión indirecta puede ocurrir vía contaminación del agua, alimentos o por inseminación artificial (Turín y col., 1999).

Pasado el periodo de excreción viral, el virus posee la capacidad de establecer latencia en ganglios nerviosos, quedando los animales como portadores y potenciales reservorios del patógeno (Pastoret y Thiry, 1985).

4.4 LATENCIA

La latencia es una propiedad compartida por todos los herpesvirus que les permite persistir indefinidamente en el huésped después de una infección. Se define a la misma como la persistencia silenciosa del virus en el organismo, que no se puede detectar mediante los procedimientos virológicos clásicos (Ackermann y Wyler 1984; Pastoret y Thiry, 1985; Rock y col., 1986). La localización de la latencia, dependiendo del herpesvirus puede ser nerviosa, epitelial o linfoide. Para los alfa herpesvirus (ej. HVB) la latencia es establecida en tejido nervioso (Pastoret y Thiry, 1985)

Durante la replicación inicial en la puerta de entrada, los herpesvirus pueden penetrar en los axones de las células nerviosas locales, y de ahí transportarse hasta el cuerpo celular en los ganglios regionales, donde la latencia es establecida (Rock, 1994; Engels y Ackermann, 1996). La replicación inicial en la mucosa del tracto respiratorio superior, produce latencia en neuronas sensoriales del ganglio trigémino (Winkler y col., 2000). También se ha demostrado el establecimiento de la latencia en varios ganglios nerviosos sacrales, así como en nódulos linfoides regionales en animales infectados vía intraprepucial/intravaginal con HVB-1 (Ackermann y Wyler 1984; Vogel y col., 2004).

Por otro lado, HVB-1 puede infectar, replicarse y hacer latencia en las amígdalas post infección aguda en los rumiantes (Schuh y col., 1992; Winkler y col., 2000; Pérez y col., 2005).

La presencia del DNA viral en el núcleo de las neuronas del ganglio trigémino, (estadio latente del HVB), fue demostrado por Ackermann y col. (1982). El genoma del HVB-1 es transcripcionalmente activo en neuronas ganglionares durante la fase latente de la infección (Rock y col., 1986).

Este estado de latencia viral puede ser reactivado frente a procesos inmunosupresores dados por ejemplo por la administración de corticosteroides por vía exógena, o por situaciones de estrés (Snowdon, 1965; Sheffy y Davies, 1972; Sheffy y Rodman, 1973; Rock y col., 1992).

4.5 PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los miembros de esta sub-familia (*Alphaherpesvirinae*) se caracterizan por la rápida replicación en el sitio de entrada, llevando a la lisis de las células infectadas causada por la replicación del virus. Durante esta replicación inicial, los herpesvirus pueden penetrar el organismo por los axones de las células nerviosas locales o por vía sanguínea (Engels y Ackermann 1996). El virus posee la capacidad de infectar monocitos y de adsorberse a linfocitos, lo que corresponde a un valioso mecanismo de diseminación sistémica (Nyaga y MacKecher, 1980; Forman y col., 1982).

Varios factores están relacionados con la severidad de la enfermedad, como por ejemplo la cepa viral, el estado inmunológico y factores de estrés del animal (parto, transporte). Las lesiones primarias producidas por el virus, pueden facilitar infecciones secundarias con cuadros bacterianos de neumonía (Babiuk y col., 1988).

Los síntomas clínicos de la enfermedad respiratoria son fiebre, anorexia, disnea, tos, descarga nasal bilateral y depresión, a menudo acompañado por conjuntivitis y secreción ocular mucopurulenta. Los animales se recuperan luego de 2 semanas, excepto cuando ocurre una superinfección bacteriana. En estos casos, la bronconeumonía puede causar la muerte. En rumiantes la enfermedad puede presentarse de forma subclínica sin signos aparentes. (Gibbs y Rweyemamu, 1977; Kahrs, 1977).

Pérdidas reproductivas son producidas por la infección de hembras gestantes con HVB-1, ocasionando muertes embrionarias o abortos (Bowen y col., 1985; Miller y col., 1991). Sin embargo, la posibilidad que algunos aislamientos de HVB-1 no sean letales para fetos bovinos, ha sido sugerida, puesto que HVB-1 fue aislada de bazo de fetos bovinos aparentemente normales (Ludwig y Storz 1973).

En cuanto a la infección genital por HVB-1.2 en los machos, luego de la exposición al virus, se produce una aguda replicación local. Durante esta etapa, el virus puede ser recuperado de lavados prepuciales o semen por varios días (Snowdon, 1965; Huck y col., 1971; Deas y Johnston, 1973; Weiblen y col., 1992). Del punto de vista clínico, la inoculación experimental de HVB-1.2, se caracteriza por un cuadro de balanopostitis, que comienza con hipertermia y pequeñas vesículas en la mucosa de prepucio y pene, pudiendo progresar y producir una secreción fibrinosa blanco-amarillenta (Vogel y col., 2004). Sin embargo también se ha detectado la presencia de HVB-1 así como HVB-5 en semen de toros sin sintomatología clínica en centros de inseminación artificial, lo que indica la posibilidad de una infección subclínica (Van Oirschot y col., 1993; Esteves y col., 2003).

En cuanto a la calidad del semen de animales infectados, se ha visto que es afectada negativamente, caracterizándose por disminución en la motilidad, así como aumento de patologías en las células espermáticas (Mare y Rensburg 1961; Huck y col., 1971).

4.6 RESPUESTA DEL HOSPEDADOR A LA INFECCIÓN POR HVB-1

La interacción inicial del virus con la célula huésped, es mediada por las principales glicoproteínas (gB, gC y gD) (McClain y Fuller, 1994). De éstas, gC es considerada la principal proteína involucrada en la adhesión del virus directo a los receptores (Liang y col., 1992). Del punto de vista inmunogénico, la gC es considerada el mayor blanco de la respuesta inmune (Babiuk y col., 1987). Se ha visto que la misma, presenta variación en algunos epítopes entre HVB-1.1 y HVB-1.2 que pueden ser detectado con la utilización de anticuerpos monoclonales (Rijsewijk y col., 1999). Por otro lado, las glicoproteínas gB y gD participan en la penetración y fusión del virus en la célula (Babiuk y col., 1996). Por su localización en la superficie del virión, estas glicoproteínas son importantes blancos del sistema inmune del hospedador y tienen un rol fundamental en la patogenicidad, por mediar la entrada, fusión y dispersión del virus célula-célula (Baranowski y col., 1993; Schwyzer y Ackermann, 1996).

La respuesta inmune mediada por células, ha sido detectada por linfoproliferación *in vitro*, citotoxicidad directa y producción de citoquinas. En muchos casos, el pico de actividad de esta respuesta celular ocurre en la primera semana post infección y se correlaciona con la recuperación de la infección (Babiuk y col., 1996).

En cuanto a la inmunidad humoral, los anticuerpos normalmente son detectables 7 a 10 días post-infección por técnicas diagnósticas de rutina. Los isotipos de inmunoglobulinas M (IgM) y G (IgG), llegan a su título máximo a los 14 y 35 días post-infección respectivamente (Guy y Potgieter, 1985). También se ha estudiado experimentalmente la inmunidad de mucosas frente a la infección por HVB-1, señalando la importancia de la misma en la protección, basado en la alta producción de anticuerpos IgA a nivel local (Madic y col., 1995).

4.7 DIAGNÓSTICO Y CONTROL

El aislamiento viral en cultivos celulares de hisopados nasales, oculares o prepuciales durante una infección clínica aguda, en conjunción con la detección de anticuerpos en muestras de sueros pareadas, son los métodos más comunes usados para la identificación de la infección viral (van Oirschot, 1999a). Para la detección de anticuerpos contra HVB-1, frecuentemente se utilizan técnicas como seroneutralización *in vitro* (SN) y Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Estas técnicas serológicas, junto con el aislamiento viral en cultivo celular, son las herramientas diagnósticas más utilizadas en nuestro país.

Se han desarrollado kits de ELISA altamente sensibles para la detección de anticuerpos contra HVB-1 (Kramps y col., 1994), inclusive para la diferenciación de la respuesta inmune inducida por HVB-1.1 de HVB-1.2 (Spilki y col., 2005).

En cuanto a las técnicas moleculares de diagnóstico, se han utilizado ampliamente en el estudio de los herpesvirus, posibilitando su identificación y clasificación en tipos y subtipos (Engels y col., 1986; d'Offay y col., 1993; Whetstone y col., 1993; D'arce y col., 2002). A pesar de que la importancia epidemiológica de los subtipos de HVB-1 es cuestionada, el análisis con enzimas de restricción corresponde a un método seguro para la caracterización de estos virus (Kennedy y col., 1986; Horiuchi y col., 1995).

Otras técnicas moleculares también se han desarrollado como por ejemplo la PCR, hibridación y estudios de secuenciación genética (Seal y Whetstone 1994). La PCR, Múltiple PCR (M-PCR) y nested-PCR, se han utilizado como prueba diagnóstica rápida de HVB-1, altamente sensibles, permitiendo además la diferenciación entre HVB-1 y HVB-5 (Zhou y col., 1999; Moore y col., 2000; Alegre y col., 2001; Claus y col., 2005; Silva y col., 2005). En cuanto al diagnóstico en semen, se ha demostrado que la PCR es una técnica superior en sensibilidad y rapidez que el aislamiento viral para la detección de HVB-1 (Van Engelenburg y col., 1993; Vilcek y col., 1994; De Gee y col., 1996; Rocha y col., 1998).

En lo que se refiere al control de la enfermedad, si bien algunos países han podido erradicarla de sus rebaños, esto solo es posible de ser instrumentado cuando la prevalencia inicial de la enfermedad es baja (van Oirschot, 1999a). Es importante en este punto, tener presente la característica de los herpesvirus de producir latencia, ya que esto puede derivar en la presencia de animales portadores, sin ningún signo clínico de infección e incluso pudiendo no ser detectados serológicamente por técnicas de rutina (Pastoret y Thiry, 1985).

Desde hace muchos años se han elaborado vacunas, basadas en la utilización de cepas atenuadas o inactivadas de HVB-1. Estas vacunas son ampliamente utilizadas en muchos países. En el Uruguay solamente está permitido el uso de vacunas a virus inactivado, aprobada oficialmente por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) a partir del año 1996. Sin embargo estas vacunas, tienen el inconveniente que interfiere con la detección serológica de animales naturalmente infectados. Esto hace difícil el monitoreo de la infección en poblaciones de animales vacunados, consecuentemente dificultando en el control del HVB-1. Basado en esto, se han desarrollado vacunas diferenciales de HVB-1, utilizando cepas mutantes con delección de glicoproteínas (ej. gE) (Kaashoek y col., 1994; Franco y col., 2002). Se ha visto que

estas cepas inducen respuesta inmune protectora, además de permitir diferenciar anticuerpos vacinales de los de infección, por ensayos serológicos (ej. ELISA) (Kaashoek y col., 1995; van Oirschot y col., 1997).

También se ha elaborado y estudiado la inmunización con sub-unidades de HVB-1, lográndose protección contra el desafío posterior (Babiuk y col., 1987; van Drunen Littel-van den Hurk y col., 1994; Zhu y Letchworth, 1996).

En los últimos años, se han volcado los esfuerzos en la elaboración de vacunas a DNA, como forma de lograr en un futuro métodos de inmunización más efectivos (Babiuk y col., 1999). Los genes que codifican las glicoproteínas D, B y C (proteínas de envoltura viral) son algunos ejemplos que se han utilizado para tal fin, ya que producen una importante estimulación antigénica y respuesta inmune protectora (Cox y col., 1993; Gupta y col., 2001; Castrucci y col., 2004; Manoj y col., 2004; Zheng y col., 2005).

5. OBJETIVO

Identificar y caracterizar herpesvirus bovino recientemente aislados en el Uruguay, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y técnicas moleculares (PCR y enzimas de restricción).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 VIRUS:

Las cepas Uy2002 y Uy2004 fueron aisladas de dos toros de la zona sur del país, utilizando un protocolo de inmunodepresión con corticoides descrito por Wentink y col. (1990). Durante 14 días posteriores a la inmunodepresión, se obtuvieron hisopados nasales, oculares, prepuciales y líquido seminal, que fueron inoculados en la línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), mantenida en minimun essential medium de Eagle's (E-MEM), 50 µg/mL de Gentamicina y 6% de suero fetal bovino irradiado (GIBCO).

La cepa Uy2002 fue aislada de líquido seminal de un toro seropositivo a HVB 9 días post inmunodepresión. Mientras que la cepa Uy2004 fue aislada de líquido seminal y prepucio en los días 8, 9, 10 y 11 post inmunodepresión, de un toro seropositivo a HVB.

Como cepas de referencia se utilizaron Uy1999 (HVB 1.1) (Alonzo y col., 2002) y las cepas EVI 123 (HVB-1.1) y EVI 88 (HVB-5) (D'Arce y col., 2002; Souza y col., 2002) gentilmente cedidas por el laboratorio de virología del Instituto de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor (IPVDF), RS-Brasil.

6.2 IDENTIFICACIÓN POR INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA (IFD):

Los virus aislados y las cepas de referencia, fueron inoculados en células MDBK. Al observar efecto citopático (CPE) superior al 50%, las células fueron tripsinadas y sembradas en porta objetos durante 2 horas a 37 °C en cámara húmeda. Luego fueron fijadas en acetona por 5 minutos y posteriormente incubadas por 1 hora a 37 °C con un anticuerpo policlonal específico para HVB conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (VMRD, USA). Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer PBS (pH 7.2) y se visualizó en microscopio de luz ultravioleta (UV).

6.3 TITULACIÓN, PROPAGACIÓN Y CONCENTRACIÓN VIRAL:

Las titulaciones se realizaron en placas de 96 hoyos, por Dosis Infectante de Cultivo de Tejido 50 (TCID₅₀) y calculadas por el método de Reed y Muench (1938). La propagación viral se realizó en botellas tipo "roller" 850 cm² (Costar[®]) con una confluencia de células de aproximadamente 90 %. Fueron inoculadas las cepas con título viral por encima de 10⁶ TCID₅₀/ml a 37 °C hasta 80-90 % de CPE evidente (36-48 horas). Luego fue clarificado el sobrenadante para la eliminación de restos celulares a 4000 rpm por 20 minutos. A continuación se procedió a la centrifugación con un colchón de sacarosa (25 %) a 100.000 x g por 2 horas. El pellet viral fue resuspendido en buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7.6) y estoqueado a -70 °C hasta su uso posterior.

6.4 EXTRACCIÓN DE DNA VIRAL:

Se trataron las muestras con una solución 40 mg de proteinasa K + 40 µl de SDS 10 % en 200 µl de buffer TEN (100 mM de Tris-HCl pH 8.5 + 12.5 mM de EDTA pH 8.0 + 150 mM de NaCl y 1% de SDS) para la digestión de las proteínas por 1h a 37 °C. Luego se separó el DNA viral de las proteínas mediante el agregado de 26 µl de 5 M NaCl + 440 µl de fenol por 30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante conteniendo el DNA se precipitó con 1 ml de etanol absoluto a -20 °C toda la noche. Finalmente el pellet se resuspendió en 50 µl de buffer TE y se conservó a -20 °C.

6.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

Se realizó PCR de las cepas, amplificando una región conservada de la gC, para confirmar del punto de vista molecular que se trataba de HVB. Se utilizaron dos "primers" (gentilmente cedido por el IPVDF-RS-Brasil), uno "forward" (PF) correspondiente a las regiones 17337-17320 (HVB-1) y 18242-18225 (HVB-5) 5'CGCCGCCGAGTACTACCC 3' y uno "reverso" (PR) correspondiente a las regiones 16763-16780 (HVB-1) y 17671-17688 (HVB-5) 5'CGGCCACGACGCTGACGA 3'. La PCR fue realizada en un volumen final de 50 µl, conteniendo 10 % de buffer de la enzima *Taq* polimerasa (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.4), 1 unidad de *Taq* polimerasa recombinante (GIBCO), 2.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 10 % de dimetilsulfoxido (DMSO), 0.2 µM de cada oligonucleótido, 10 ng (calculado según Sambrook y col., 2001) del DNA viral y agua estéril csp 50 µl. La amplificación fue realizada en un termociclador (Eppendorf®) sometiendo a un paso de desnaturalización inicial (94 °C, 3 minutos), seguidos por 35 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1 minuto); hibridación (62 °C, 1 minuto) y extensión (72 °C, 1 minuto). Luego de los 35 ciclos, la reacción fue sometida a un ciclo final de extensión (72 °C, 5 minutos).

Cinco microlitros del producto amplificado y un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen®) fueron analizados en un gel horizontal de agarosa 1 % (60 V, 20 min.) en buffer TBE (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8). Luego teñido con Bromuro de Etídio y visualizado en un transiluminador, bajo luz UV.

6.6 CORTE DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR CON ENZIMAS:

Los fragmentos amplificados de los aislamientos fueron cortados con las enzimas *Ddel* y *Bgl*I (NEB - New England Biolabs) para diferenciar entre HVB-1 y HVB-5. Para tal fin se preparó la solución de digestión de la enzima *Ddel* (1.5 µl de buffer de la enzima, 0.5 µl de *Ddel*, 5.0 µl del producto de la amplificación del DNA y 8 µl de agua bidestilada estéril) y de la enzima *Bgl*I (1.5 µl de buffer de la enzima, 0.5 µl de *Bgl*I, 5.0 µl del producto de la amplificación del DNA y 8 µl de Agua bidestilada estéril). La digestión se realizó incubando a 37 °C por 1 hora.

El producto digerido junto con el marcador de 100 pb (Invitrogen®) fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % durante 2 horas a 40 V, luego teñido con Bromuro de Etídio y posteriormente visualizado en un transiluminador, bajo luz UV.

6.7 ENSAYO DE INMUNOPEROXIDASA EN MONOCAPA (IPMA):

El test de IPMA se utilizó para diferenciar cepas HVB-1.1, HVB1.2 y HVB-5. La técnica fue realizada según lo descrito por Kramps y col. (1996). Se utilizó un panel de 5 monoclonales: anti gD (Mab 40); anti gE (Mab 51); anti gC (Mab 71 y Mab 77) y anti HVB-5 (Mab 2F9). Los cuatro primeros monoclonales (Mab 40, 51, 71 y 77) provinieron del Animal Health Intitute (Lelystad/ The Netherland) y el Mab 2F9 (Oldoni y col., 2004) fue gentileza del laboratorio de virología del Instituto de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor (IPVDF), RS-Brasil.

Las células fueron infectadas con las cepas virales, y luego de visualizado el CPE en aproximadamente el 50% del cultivo, fueron fijadas con paraformaldehído 4 % en buffer salino (PBS, pH 7.2) durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron separadamente con cada uno de los Mabs por 1h a 37 °C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS + Tween₂₀ y se incubaron con un conjugado a peroxidasa anti ratón (DAKO®) por 1h a 37 °C. Finalmente la reacción se reveló con 3-amino-ethyl-carbazole como sustrato cromogénico para la enzima.

6.8 POLIMORFISMO DEL LARGO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP):

Para diferenciar los subtipos de HVB-1 (HVB-1.1, HVB-1.2a y HVB-1.2b) se utilizó la enzima *Hind*III (Metzler y col 1985) (GIBCO®). Se preparó la solución de digestión con 2.0 µl del buffer de la enzima; 1.5 µl de *Hind*III; 80 –100 ng (calculado según Sambrook y col., 2001) de DNA viral; agua bidestilada estéril csp 20 µl y se incubó a 37 °C por 1 hora. Los productos de digestión junto con el marcador λ *Hind*III utilizado, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0.7 % horizontal durante 14 horas a 25 V. Luego se tiñó con Bromuro de Etídio y se visualizó en un transiluminador, bajo luz UV.

7. RESULTADOS

Las cepas virales aisladas cuando fueron inoculadas en el cultivo celular, presentaron CPE en racimos característicos de HVB y fueron positivas a la IFD utilizando anticuerpos anti HVB (Fig. I).

Al amplificar una región del DNA de los virus aislados mediante la PCR, se logró visualizar en la corrida electroforetica, una banda de aproximadamente 574/ 571 pb para HVB-1 y HVB-5 respectivamente, que corresponde a un fragmento del gen que codifica la gC (Silva y col., 2005) (Fig. II).

La digestión con las enzimas *Bgl*I y *Dde*I de los fragmentos amplificados por PCR, permitieron diferenciar si las cepas eran HVB-1 o HVB-5. La enzima *Dde*I que se utilizó como control, produjo dos bandas en cada una de las cepas. Mientras que la enzima *Bgl* I solo cortó el fragmento del DNA de la cepa EVI 88 (HVB-5). Por tal razón, las cepas aisladas pertenecen a HVB-1 (Fig. III).

En cuanto a la IPMA, los aislamientos fueron reconocidos por el Mab 40 (dirigido contra la gD) y el Mab 51 (dirigido contra la gE). El Mab 71 y 77 (dirigidos ambos contra distintos epítopes de la gC) reconocieron de manera diferente a las dos cepas. Para el Mab 71 las cepas Uy2002 y Uy2004 fueron negativas, mientras que para el Mab 77 la Uy2002 fue positiva y la Uy2004 negativa. El Mab 2F9 (especifico para HVB-5) no reconoció ninguna de las cepas. Con estos resultados, desde el punto de vista antigénico, ambos aislamientos se corresponden a HVB-1.2 (Cuadro 1).

Utilizando la enzima *Hind*III para la RFLP, la cepa Uy2004 presentó un patrón de digestión que corresponde a HVB-1.2a. La cepa Uy2002 presentó un patrón de restricción diferente a los 3 subtipos de HVB-1 conocidos. Como se observa en la figura V, el producto de la digestión de esta cepa, presenta dos bandas anexas comprendidas entre 4.4 y 6.5 pb ausentes en cepas de referencia.

8. DISCUSIÓN

Las técnicas antigénicas utilizadas en este estudio (IFD con anticuerpos policlonales y IPMA con anticuerpos monoclonales) permitieron identificar del punto de vista antigénico que las cepas aisladas se trataban de HVB y se pudo diferenciar entre HVB-1.1, HVB-1.2 y HVB-5. En cuanto a los Mabs utilizados, el Mab 40 se incluyó en el trabajo, ya que reconoce la gD que es una proteína estructural de envoltura del HVB altamente inmunogénica, utilizándolo de esta manera para controlar que todas las cepas fueran reconocidas por el mismo (Schwyzer y Ackermann 1996). Por otro lado utilizamos los Mabs 71 y 77, que reconocen epítopes específicos de la glicoproteína C de HVB-1. Ésta glicoproteína de envoltura viral aunque no es esencial para la propagación del virus, juega un importante rol en la adhesión a la célula huésped y es altamente inmunogénica. La misma, presenta variaciones antigénicas que son detectables por anticuerpos monoclonales según sea HVB-1.1, HVB-1.2 o HVB-5. El Mab 71 reconoció la cepa Uy1999 (HVB-1.1), pero no la Uy2002 y la Uy2004 (ambas HVB-1.2). Ésta diferencia de reconocimiento (entre HVB-1.1 y HVB-1.2) por el monoclonal se debe a que existe una pequeña variación entre la secuencia de 75-80 de aminoácidos de la gC entre ambos subtipos (Rijsewijk y col., 1999). El Mab 77, reconoció a la cepa Uy1999 y Uy2002, siendo negativo para la cepa Uy2004. Por lo tanto este monoclonal reconoció de manera diferente a las dos cepas HVB-1.2 (Uy2002 y Uy2004). Lo cual esta de acuerdo con Rijsewijk y col., (1999) quien menciona que el Mab 77 no reconoce algunas cepas de HVB-1.2. En cuanto a la utilización del Mab 51 (anti gE) tanto la cepa Uy1999, Uy2002 y Uy2004 fueron positivas. Es importante destacar que epítopes de esta glicoproteína, pueden no ser expresados en algunas cepas en cultivos celulares (van Oirschot y col., 1999). La delección de esta glicoproteína no afecta la habilidad de HVB-1 para establecer latencia (Van Engelenburg y col., 1995). La utilización de cepas con delección de gE, es una herramienta potencial para la utilización como vacunas diferenciales en el control de la enfermedad (van Oirschot y col., 1997; Letellier y col., 2001).

Por ultimo, se descartó que las cepas en estudio pudiera tratarse de HVB-5 con la utilización del Mab 2F9, que reconoce específicamente la gC de HVB-5 (Oldoni y col., 2004) y ninguna de las cepas estudiadas reaccionó con este Mab.

Para corroborar y profundizar los resultados de las técnicas antigénicas, fue que se realizaron las técnicas moleculares. Con la PCR, pudimos confirmar del punto de vista molecular, que todas las cepas eran HVB. Ésta es una técnica rápida y sensible para su utilización en herpesvirus (Zhou y col., 1999; Moore y col., 2000; Alegre y col., 2001; Claus y col., 2005; Silva y col., 2005). Cortando los fragmentos amplificados por PCR con las enzimas *Ddel* y *BglI*, pudimos diferenciar entre HVB-1 y HVB-5 (Silva y col., 2005).

La RFLP con la enzima *HindIII*, se utilizó para separar las cepas en sus distintos subtipos conocidos (HVB-1.1, HVB-1.2a y HVB-1.2b) (Metzler y col., 1985). Utilizando el criterio establecido por Metzler y col. (1985), el patrón de digestión de la cepa Uy2002 no concuerda con HVB-1.2a o HVB-1.2b, lo que nos impediría de aseverar a que subtipo pertenece la misma. Sin embargo, estaría mas próximo de pertenecer al subtipo HVB-1.2b, aunque en el patrón de digestión con *HindIII* de ésta cepa, faltaría una banda

característica de HVB-1.2b (Fig. V, flecha amarilla) y presenta dos bandas menores que no corresponde con este subtipo (Fig. V, flechas rojas). Probablemente exista un sitio de la enzima de restricción *Hind*III extra en el DNA de la cepa Uy2002, que corta la banda que falta generando dos fragmentos menores. Es de destacar que en estudios anteriores con HVB-5 se han encontrado diferencias genómicas que tampoco concuerdan con las cepas de referencia (HVB-5a y HVB-5b) utilizando análisis por restricción de enzimas (D'Arce y col., 2002).

Este hallazgo nos hace sospechar de la posible presencia de cepas de HVB mutantes circulando en nuestros rebaños. Cabe la posibilidad también, de que pueda tratarse de nuevos subtipos de HVB-1.2 aun no descritos en la literatura. Serán necesarios estudios con otras enzimas de restricción y estudios filogenéticos como secuenciamiento, para identificar diversidades en el genoma de esta cepa. Así como también es importante que podamos determinar que moléculas son codificadas por estos genes que aparecen en esta cepa (Uy2002).

En cuanto a la cepa Uy2004 se caracteriza como HVB-1.2a, basado en la clasificación propuesta por Metzler y col. (1985) (Fig. V, carril 3).

Es la primera vez que se aísla y caracteriza cepas de HVB-1.2 en el Uruguay, siendo que la presencia de estos subtipos de HVB ya han sido descritos en países vecinos como Argentina (Pidone y col., 1999) y Brasil (D'Arce y col., 2002). Es importante este hallazgo para nuestro país, teniendo en cuenta las diferentes formas clínicas asociados a cada subtipo y la posibilidad de ocasionar mayores pérdidas económicas, según que subtipo este afectando nuestros rodeos.

Tanto la cepa Uy1999 (HVB-1.1) como Uy2004 (HVB-1.2a) han sido aisladas del mismo animal, lo que se trataría de una reinfección natural por dos subtipos de HVB. Es de destacar que el animal, permaneció seronegativo desde el año 1999 (periodo en el cual se aisló la cepa Uy1999) (Alonzo y col., 2004) hasta el año 2004 cuando se logró detectar anticuerpos neutralizantes HVB específicos y, luego de una inmunodepresión con corticoides, el aislamiento de la cepa Uy2004 (HVB-1.2a). La cepa Uy1999 fue aislada de hisopados nasales, mientras que la cepa Uy2004 fue aislada de hisopados prepuciales y líquido seminal, conformando diferentes rutas de excreción según el subtipo de HVB (IBR o IPV respectivamente). Este fenómeno de reinfección de un mismo animal con 2 subtipos de HVB ha sido descrito anteriormente pero de forma experimental (Whetstone y Miller 1989; Whetstone y col., 1989). También se ha descrito que el sistema nervioso central de terneros puede ser infectado naturalmente con dos cepas distintas de HVB, la respiratoria y la encefalogénica (HVB-1 y HVB-5) (d'Offay y col., 1993).

9. CONCLUSIONES

Se describe por primera vez la presencia de cepas de Herpes virus bovino-1 subtipo 2 (HVB-1.2) en Uruguay.

Una de los aislamientos (Uy 2002) no concuerda plenamente con el subtipo 1.2b (HVB-1.2b), por lo que se puede tratar de un nuevo subtipo de HVB-1.2 o una cepa de Herpesvirus bovino mutante.

Por otro lado, se evidencia la posibilidad de la re-infección natural de un bovino con dos subtipos de HVB diferentes (HVB-1.1 y HVB-1.2a).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ackermann, M. and Wyler, R. (1984) The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet Microbiol*; 9(1):53-63.
2. Ackermann, M.; Muller, H.K.; Bruckner, L.; Kihm, U. (1990) Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet Microbiol*; 23(1-4):365-70.
3. Ackermann, M.; Peterhans, E.; Wyler, R. (1982) DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am J Vet Res*; 43:36-40.
4. Alegre, M.; Nanni, M.; Fondevila, N. (2001) Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the differentiation of bovine Herpesvirus-1 and -5. *J Vet Met B*; 48:613-621.
5. Alice, S.J. (1978) Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus (IBR) in Brazil (preliminary note). *Rev Bras Biol*; 38(4): 919-20.
6. Alonzo P.; Benavides U.; Isnardi F.; Puentes R.; Carol H.; Clavijo A.; del Campo R.; Bonnevaux J.; Weiblen R.; Fondevila N.; Romera S. A.; Sadir A.M.; Maisonnave J. (2002) Caracterización de un herpesvirus, aislado de un ternero, con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria (Montevideo)*; 37(147-148):15-22.
7. Alonzo, P.; Puentes, R.; Benavides, U.; Isnardi, F.; Maisonnave, J. (2004) Lack of specific immune response after BHV infection. *Immunology 2004, Collection of Free Papers presented at the 12th Int. Congress of Immunology and 4th annual Conference of FOCIS (Montreal Canada, July 18-23, 2004), Medimond, Bologna.*
8. Anunciação, A.V.M.; Leite, R.C.; Moreira, E.C. (1989) Presença de anticorpos para o herpesvirus bovino 1 (HVB 1) em bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemaglutinação passiva. *Arq Bras Med Vet Zoot*; 41(5):433-441.
9. Babiuk, L.A.; L'Italien, J.; Van Drunen Little-Van den Hurk, S.; Zamb, T.; Lawman, M.J.P.; Hughes, G.; Gifford, G.A. (1987) Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*; 159:57-66.
10. Babiuk, L.A.; Lawman, M.J.P.; Ohmann, H.B. (1988) Viral-bacterial synergistic interactions in respiratory disease. *Adv Virus Res*; 35:219-49.
11. Babiuk, L.A.; Lewis, J.; Suradhat, S.; Baca-Estrada, M.; Foldvari, M.; Babiuk, S. (1999) Polynucleotide vaccines: potential for inducing immunity in animals. *J Biotechnol*; 73(2-3):131-40.
12. Babiuk, L.A.; van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Tikoo, S.K. (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol*; 53:31-42.
13. Baranowski, E.; Dubuisson, J.; Pastoret, P.P.; Thiry, E. (1993) Identification of 108k, 93K and 42k glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. *Arch Virol*; 133(1-2):97-111.
14. Bowen, R.A.; Elsdén, R.P.; Seidel, G.E. Jr. (1985) Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am J Vet Res*; 46(5):1095-7.
15. Campero, C.M.; Moore, D.P.; Odeon, A.C.; Cipolla, A.L.; Odriozola, E. (2003) Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun*; 27(5):359-69.
16. Carrillo, B.J.; Ambrogi, A.; Schudel, A.A.; Vazquez, M.; Dahme, E.; Porpischil, A. (1983) Meningoencephalitis caused by IBR virus in Argentina. *J Vet Med B*; 30:327-332.
17. Castrucci, G.; Ferrari, M.; Marchini, C.; Salvatori, D.; Provinciali, M.; Tosini, A.; Petri, S.; Sardonini, Q.; Lo Dico, M.; Frigeri, F.; Amici, A. (2004) Immunization against bovine

- herpesvirus-1 infection. Preliminary tests in calves with a DNA vaccine. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*; 27:171-179.
18. Claus, M.P.; Alfieri, A.F.; Folgueras-Flatschart, A.V.; Wosiacki, S.R.; Medici, K.C.; Alfieri, A.A. (2005) Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods*; 128(1-2):183-8.
 19. Cox, G.J.M.; Zamb, T.J.; Babiuk, L.A. (1993) Bovine herpesvirus-1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol*; 67:5664-7.
 20. D'Arce, R.C.F.; Almeida, R.S.; Silva, T.C.; Franco, A.C.; Spilki, F.; Roehe, P.M.; Ams, C.W. (2002) Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol*; 88:315-324.
 21. d'Offay, J.M.; Mock, R.E.; Fulton, R.W. (1993) Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am J Vet Res*; 54(4):534-9.
 22. De Gee, A.L.W.; Wagter, L.H.A.; Hage, J.J. (1996) The use a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Microbiol*; 53:163-168.
 23. Deas, D.W. and Johnston, W.S. (1973) The isolation and transmission of the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Vet Rec*; 92:636-639.
 24. Engels, M. and Ackermann, M. (1996) Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol*; 53(1-2):3-15.
 25. Engels, M.; Giuliani, C.; Wild, P.; Beck, T.M.; Loepfe, E.; Wyler, R. (1986) The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res*; 6(1):57-73.
 26. Engels, M.; Steck, F.; Wyler, R. (1981) Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*; 67:169-174.
 27. Esteves, P.A.; Spilki, F.R.; Franco, A.C.; Silva, T.C.; Oliveira, E.A.S.; Moojen, V.; Esmeraldino, A.M.; Roehe, P.M. (2003) Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec*; 152(21):658-9.
 28. Forman, A.J.; Babiuk, L.A.; Misra, V.; Baldwin, F. (1982) Susceptibility of bovine macrophages to infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Infect Immun*; 35(3):1048-57.
 29. Franco, A.C.; Rijsewijk, F.A.M.; Flores, E.F.; Weiblen, R.; Roehe, P.M. (2002) Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Braz J Microbiol*; 33:274-278.
 30. Galarza, J.M. and Periolo, O.H. (1983) Rinotraqueítis Infecciosa Bovina – Prevalencia en la Provincia de Formosa mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. *Gazeta Vet*; 45:1296-1300.
 31. Gibbs E.P.J. and Rweyemamu, M.M. (1977) Bovine herpesviruses. Part 1. Bovine herpesvirus-1. *Vet Bull*; 47:317-343.
 32. Griffiths, I.B.; Gallegom, M.I.; Marino, O.; de Clavijo, E.; Diaz, I. (1983) Antibodies against viral pathogens in dairy cattle in Colombia. *Trop Anim Health Prod*; 15(4):214.
 33. Guarino, H.; Maisonnave, J.; Capano, F.; Pereira, J. (1981) Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*; 17(78):131-134.
 34. Gupta, P.K.; Saini, M.; Gupta, L.H.; Rao, V.D.P.; Bandyopadhyay, S.K.; Butchaiah, G.; Garg, S.K. (2001) Induction of immune response in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol*; 78(4):293-305.

35. Guy, J.S. and Potgieter, L.N.D. (1985) Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J Vet Res*; 46(4):893-898.
36. Hayward, G.S.; Frenkel, N.; Roizman, B. (1975) Anatomy of Herpes simplex virus DNA: Strain differences and heterogeneity in locations of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc Nat Acad Sci USA*; 72:1768-1772.
37. Horiuchi, M.; Yamazaki, N.; Furuoka, H.; Matsui, T.; Nakagawa, M.; Ishiguro, N.; Shinagawa, M. (1995) Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *J Vet Med Sci*; 57(3):577-580.
38. Huck, R.A.; Millar, P.G.; Evans, D.H.; Stables, J.W.; Ross, A. (1971) Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (I.B.R./I.P.V.) virus in a stud of bulls. *Vet Rec*; 88:292-297.
39. Kaashoek, M.J.; Moerman, A.; Madic, J.; Rijsewijk, F.A.M.; Quak, J.; Gielkens, A.L.J.; van Oirschot, J.T. (1994) A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*; 12(5):439-44.
40. Kaashoek, M.J.; Moerman, A.; Madic, J.; Weerdmeester, K.; Maris-Veldhuis, M.; Rijsewijk, F.A.M.; van Oirschot, J.T. (1995) An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*; 13(4):342-6.
41. Kahrs, R.F. (1977) Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J Am Vet Med Assoc*; 171(10):1055-1064.
42. Kennedy, T.P.; Evermann, J.F.; Cheevers, W.P. (1986) Restriction endonuclease patterns of bovine herpesvirus type 1 isolated from bovine mammary glands. *Am J Vet Res*; 47:2525-2529.
43. Kramps, J.A.; Magdalena, J.; Quak, J.; Weerdmeester, K.; Kaashoek, M.J.; Maris-Veldhuis, M.A.; Rijsewijk, F.A.; Keil, G.; van Oirschot, J.T. (1994) A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J Clin Microbiol*; 32(9):2175-81.
44. Kramps, J.A.; Perrin, B.; Edwards, S.; Van Oirschot, J.T. (1996) A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet Microbiol*; 53:153-161.
45. Letellier, C.; Delangre, A.; De Smet, A.; Kerkhofs, P. (2001) Characterization of monoclonal antibodies directed against the bovine herpesvirus-1 glycoprotein E and use for the differentiation between vaccinated and infected animals. *Vet Microbiol*; 83(4):301-15.
46. Liang, X.; Babiuk, L.A.; Zamb, T.J. (1992) An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (HVB-1) mutant expressing beta-galactosidase: Evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology*; 189(2):629-39.
47. Lovato, L.T.; Weiblen, R.; Tobias, F.L.; Moraes, M.P. (1995) Herpesvírus bovino 1 (HVB 1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciencia Rural*; 25(3):425-430.
48. Ludwig, H. (1983) Bovine herpesviruses. In: Roizman F, ed. *The herpesviruses*. Vol 2. New York: Plenum Press; 135-214.
49. Ludwig, H. and Storz, J. (1973) Activation of herpesvirus from normal bovine fetal spleen cells after prolonged cultivation. *Med Microbiol Immunol*; 158:209-217.
50. Madic, J.; Magdalena, J.; Quak, J.; van Oirschot, J.T. (1995) Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Vet Immunol Immunopathol*; 46(3-4):267-83.

51. Manoj, S.; Griebel, P.J.; Babiuk, L.A.; van Drunen Little-van den Hurk, S. (2004) Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154. *Immunology*; 112(2):328-38.
52. Mare, C.J. and Van Rensburg, S.J. (1961) The isolation of viruses associated with infertility in cattle: a preliminary report. *J S Afr Vet Med Assoc*; 32:201-210.
53. Mars, M.H.; de Jong, M.C., van Manen, C.; Hage, J.J.; van Oirschot, J.T. (2000) Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet Microbiol*; 76(1):1-13.
54. Mayfield, J.E.; Good, P.J.; Van Oort, H.J.; Campbell, A. R.; Reed, D.E. (1983) Cloning and cleavage site mapping of the DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper Strain). *J Virol*; 47:259-264.
55. McClain, D.S. and Fuller, A.O. (1994) Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. *Virology*; 198:690-702.
56. Metzler, A.E.; Matile, H.; Gassman, U.; Engels, M.; Wyler, R. (1985) European isolates of bovine herpesvirus-1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol*; 85(1-2):57-69.
57. Metzler, A.E.; Schudel, A.A.; Engels, M. (1986) Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol*; 87(3-4):205-217.
58. Miller, J.M.; Van Der Maaten, M.J.; Whetstone, C.A. (1988) Effects of a bovine herpesvirus-1 isolate on reproductive function in heifers: Classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*; 49(10):1653-1656.
59. Miller, J.M.; Whetstone, C.A.; Van der Maaten, M.J. (1991) Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*; 52(3):458-61.
60. Misra, V.; Babiuk, L.A.; Darcel, C.Q. (1983) Analysis of bovine herpes virus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch Virol*; 76(4):341-54.
61. Moore, S.; Gunn, M.; Walls, D. (2000) A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet Microbiol*; 75:145-153.
62. Nyaga, P.N. and McKecher, D.G. (1980) Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 2(4):587-602.
63. Obando, R.C.; Hidalgo, M.; Merza, M.; Montoya, A.; Klingebom, B.; Moreno-Lopez, J. (1999) Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). *Prev Vet Med*; 41(4):271-8.
64. Oldoni, I.; Weiblen, R.; Inkelmann, M.A.; Flores, E.F. (2004) Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 37:213-221.
65. Osorio, F.A.; Reed, D.E.; Van der Maaten, M.J.; Metz, C. (1985) Comparison of the herpesviruses of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis. *Am J Vet Res*; 46(10).
66. Pastoret, P.P. and Thiry, E. (1985) Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 8(1):35-42.
67. Perez, S.; Inman, M.; Jones, C. (2005) Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J Clin Microbiol*; 43(1):393-401.

68. Pidone, C.L.; Galosi, C.M.; Echeverria, M.G.; Nosetto, E.O.; Etcheverrigaray, M.E. (1999) Restriction endonuclease analysis of HVB-1 and HVB-5 strain isolated in Argentina. *J Vet Med B*; 46(7):453-456.
69. Reed, L.J. and Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty-percent endpoints. *Amer J Hyg*; 27:493.
70. Repiso, M.; Herrera, B.; Silva, M.; Guarino, H.; Núñez, A.; Osawa, T.; Fernández, L.; Olivera, M.A.; Gil, A. (2001) Prevalencia de las enfermedades que afectan la reproducción de los bovinos de carne en el Uruguay. Seminario JICA/DILAVE Miguel C. Rubino. Treinta y Tres, Uruguay. 7-26.
71. Riedmann, S.; Reinhardt, G.; Tadich, N.; Aguilar, M.; Montecinos, M.I.; Miranda, J.C. (1996) Seroprevalencia de VDBD, VHB-1, PI-3 y VRSB en 12 predios lecheros de la provincia de Valdivia, Chile. *Arch Med Vet*; 28(1):121-124.
72. Rijsewijk, F.A.M.; Kaashoek, M.J.; Langeveld, J.P.M.; Meloen, R.M.; Judek, J.; Bienkowska-Szewczyk, K.; Maris-Veldhuis, M.A.; van Oirschot, J.T. (1999) Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol*; 80:1477-1483.
73. Rivero, R.; del Campo, R.; Saizar, J.; Gil, J.; Giannechini, E.; Mendaro, A.; Wettstein, R. (1997) Meningoencefalitis por herpesvirus en bovinos y su comprobación mediante el procedimiento de hibridización de ácidos nucleicos (Dot-Blot). *Veterinaria (Montevideo)*; 33(134): 5-10.
74. Rivero, R.; Haedo, F.; Feola, R.; Capano, F.; Guarino, H.; Saizar, J.; Bermudez, J. (1987) Granuloma nasal bovino: descripción de un caso colectivo y discusión sobre su probable etiología. *Veterinaria (Montevideo)*; 98: 5-11.
75. Rocha, M.A.; Barbosa, E.F.; Guimarães, S.E.F.; Neto, E.D.; Gouveia, A.M.G. (1998) A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet Microbiol*; 63:1-11.
76. Rock, D.L. (1994) Latent infection with bovine herpesvirus type-1. *Sem Virol*; 5:233-240.
77. Rock, D.L.; Hagemoser, W.A.; Osorio, F.A.; Reed, D.E. (1986) Detection of bovine Herpesvirus Type 1 RNA in Trigeminal Ganglia of Latently Infected Rabbits by *in situ* Hybridization. *J gen Virol*; 67:2515-2520.
78. Rock, D.L.; Lokensgard, J.T.; Lewis, T.; Kutish, G. (1992) Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine Herpesvirus 1. *J Virol*; 66(4):2484-2490.
79. Roizmann, B.; Desrosiers, R.C.; Fleckenstein, B.; Lopez, C.; Minson, A.C.; Studdert, M.J. (1992) The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*; 123(3-4):425-49.
80. Saizar, J. (1997) Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueitis bovina infecciosa en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*; 33:133-136.
81. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
82. Schuh, J.C.L.; Bielefeldt, O.H.; Babiuk, L.A.; Doige, C.E. (1992) Bovine herpesvirus-1-induced pharyngeal tonsil lesions in neonatal and weaning calves. *J Comp Pathol*; 106(3):243-253.
83. Schwyzer, M. and Ackermann, M. (1996) Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol*; 53(1-2):17-29.
84. Seal, B.S. and Whetstone, C.A. (1994) Immediate-early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Vet Microbiol*; 38:369-384.

85. Seal, B.S.; St Jeor, S.C.; Taylor, R.E.L. (1985) Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus-1 DNA and nucleic acid homology between isolates. *J Gen Virol*; 66:2787-2792.
86. Sheffy, B.E. and Davies, D.H. (1972) Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc Soc Exp Biol Med*; 140(3):974-976.
87. Sheffy, B.E. and Rodman, B.A. (1973) Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. *J Am Vet Med Assoc*; 163:850-851.
88. Silva, A.D.; Esteves, P.A.; Puentes, R.; Franco, A.C.; Maisonnave, J.; Rijsewijk, F.A.M.; Roehe, P.M. (2005) Development a polymerase chain reation/restriction enzyme analysis for the differentiation of bovine hepesvirus type 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5). XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia (Santos-SP).
89. Snowdon, W.A. (1965) The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust Vet J*; 41:135-142.
90. Souza, V.F.; Esteves, P.A.; Silva, T.C.; Almeida, R.S.; Spilki, F.R.; Weiblen, R.; Lemos, R.A.; Alfieri, A.A.; Pituco, E.M.; Roehe, P.M. (2002) Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pes Vet Bras*; 22(2):58-63.
91. Spilki, F.R.; Esteves, P.A.; Silva, A.D.; Franco, A.C.; Rijsewijk, F.A.M.; Roehe, P.M. (2005) A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *J Virol Methods*; (article in press).
92. Stahl, K.; Rivera, H.; Vagsholm, I.; Moreno-Lopez, J. (2002) Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. *Prev Vet Med*; 56(3):193-202.
93. Studdert, M.J. (1989) Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet Rec*; 2:584.
94. Tikoo, S.K.; Campos, M.; Babiuk, L.A. (1995) Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Ad Virus Res*; 45:191-223.
95. Turin, L.; Russo, S.; Poli, G. (1999) BHV-1: New Molecular Approaches to Control a Common and Widespread Infection. *Mol Med*; 5:261-284.
96. van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Van Donkersgoed, J.; Kowalski, J.; van den Hurk, J.V.; Harland, R.; Babiuk, L.A.; Zamb, T.J. (1994) A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine*; 12(14):1295-302.
97. Van Engelenburg, F.A.C.; Kaashoek, M.J.; van Oirschot, J.T.; Rijsewijk, F.A.M. (1995) A glicoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J Gen Virol*; 76:2387-2392.
98. Van Engelenburg, F.A.C.; Maes, R.K.; Van Oirschot, J.T.; Rijsewijk, F.A.M. (1993) Development of a Rapid and Sensitive Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Bovine Semen. *J Clin Microbiol*; 31:3129-3135.
99. Van Oirschot, J.T. (1999a) Bovine Viral Vaccines, Diagnostics, and Eradication: Past, Present, and Future. *Adv Vet Med*; 41:197-216.
100. van Oirschot, J.T. (1999b) Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol*; 73:195-205.
101. van Oirschot, J.T.; Kaashoek, M.J.; Maris-Veldhuis, M.A.; Rijsewijk, F.A.M. (1999) Strains of bovine herpesvirus 1 that do not express an epitope on glycoprotein E in cell culture still induce antibodies that can be detected in a gE-blocking-ELISA. *Vet Microbiol*; 65:103-113.
102. van Oirschot, J.T.; Kaashoek, M.J.; Maris-Veldhuis, M.A.; Weerdmeester, K.; Rijsewijk, F.A.M. (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J Virol Methods*; 67(1):23-34.

103. van Oirschot, J.T.; Straver, P.J.; van Lieshout, J.A.H.; Quak, J.; Westenbrink, F.; van Exsel, A.C.A. (1993) A sub clinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec*; 132:32-35.
104. Varady, E.; Tuboly, T.; Derbyshire, B. (1994) Restriction Endonuclease Analysis of a Porcine Isolate of Bovine Herpesvirus Type 1. *Can J Vet Res*; 58:65-66.
105. Vidor, T.; Halfen, D.C.; Leite, T.E.; Coswig, L.T. (1995) Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV 1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciencia Rural*; 25:421-424.
106. Vilcek, S.; Nettleton, P.F.; Herring, J.A.; Herring, A.J. (1994) Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) using polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*; 42:53-64.
107. Vogel, F.S.F.; Flores, E.F.; Weiblen, R.; Winkelmann, E.R.; Moraes, M.P.; Braganca, J.F.M. (2004) Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet Microbiol*; 98(3-4):185-96.
108. Weiblen, R.; Kreuz, L.C.; Canabarro, T.F.; Schunch, L.F.; Rebelatto, M.C. (1992) Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J Vet Diagn Invest*; 4:341-343.
109. Wentink, G.H.; Rutten, V.P.; van Exsel, A.C.; de Jong, W.A.; Vleugel, H.; Hensen, E.J. (1990) Failure of an vitro lymphoproliferative assay specific for bovine herpes virus type 1 to detect immunised or latently infected animals. *Vet Q*; 12(3):175-82.
110. Whetstone, C.A. and Miller, J.M. (1989) Two different strain of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol*; 107(1-2):27-34.
111. Whetstone, C.A.; Miller, J.M.; Bortner, D.M.; Van der Maaten, M.J. (1989) Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch Virol*; 106(3-4):261-79.
112. Whetstone, C.A.; Seal, B.S.; Miller, J.M. (1993) Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. *Vet Microbiol*; 38:181-189.
113. Winkler, M.T.C.; Doster, A.; Jones, C. (2000) Persistence and Reactivation of Bovine Herpesvirus 1 in the Tonsils of Latently Infected Calves. *J Virol*; 74:5337-5346.
114. Zheng, C.; Babiuk, L.A.; van Drunen Little-van den Hurk, S. (2005) Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *J Virol*; 79(3):1948-53.
115. Zhou, J.; Lyaku, J.; Fredrickson, R.A.; Kibenge, F.S.B. (1999) Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. *J Virol Meth*; 79:181-189.
116. Zhu, X. and Letchworth III, G.J. (1996) Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine*; 14(1):61-69.

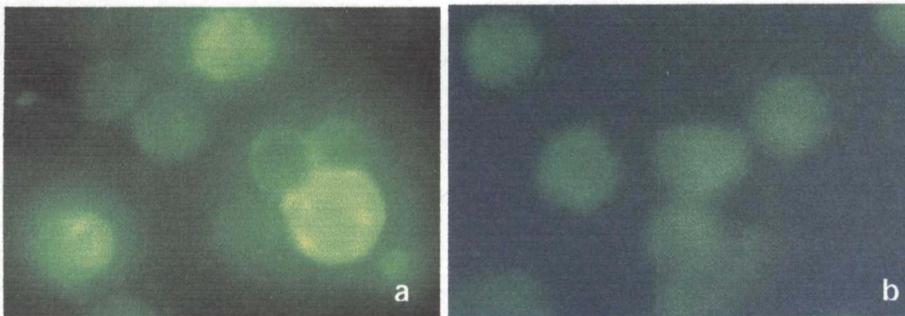
CUADROS Y FIGURAS

Fig. 1 Inmunofluorescencia directa con anticuerpos anti HVB-1. Cepas Uy2002 y Uy2004 inoculadas en MDBK. Ejemplo de a) reacción positiva: cepa Uy2002. b) reacción negativa: células sin infectar.

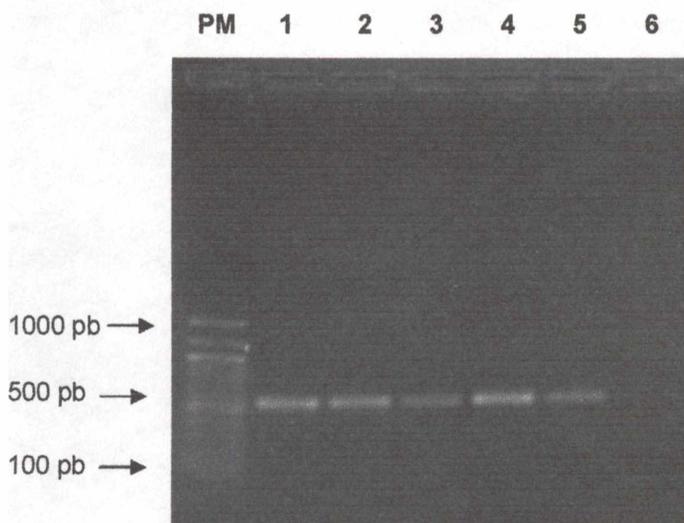


Fig. II PCR de las cepas en la cual muestra la amplificación de una porción del gen que codifica la Glicoproteína gC del HVB (574/571pb para HVB-1 y HVB-5 respectivamente). PM: Marcador de 100 pb, carril 1: cepa EVI 123 (HVB1.1), carril 2: cepa EVI 88 (HVB 5), carril 3: cepa Uy 1999, carril 4: cepa Uy 2002, carril 5: cepa Uy 2004 y carril 6: control negativo.

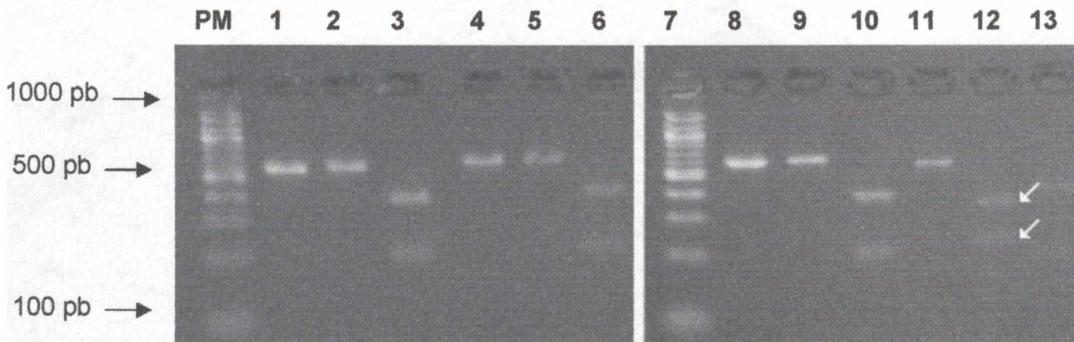


Fig. III Digestión con enzimas Bgl-I y Dde-I de los fragmentos amplificados por PCR de las cepas aisladas (Uy2002 y Uy 2004) y las cepas de referencia (EVI 123 y EVI 88): PM: Marcador de 100 pb, carril 1: cepa Uy2002 sin cortar, carril 2: cepa Uy2002 cortada con Bgl-I, carril 3: cepa Uy2002 cortada con Dde-I, carril 4: cepa Uy2004 sin cortar, carril 5: cepa Uy2004 cortada con Bgl-I, carril 6: cepa Uy2004 cortada con Dde-I, carril 7: Marcador de 100 pb, carril 8: cepa EVI-123 sin cortar, carril 9: cepa EVI-123 cortada con Bgl-I, carril 10: cepa EVI-123 cortada con Dde-I, carril 11: cepa EVI-88 sin cortar, carril 12: cepa EVI-88 cortada con Bgl-I, carril 13: cepa EVI-88 cortada con Dde-I. Las flechas muestran las 2 bandas que se producen al cortar HVB-5 con Bgl-I, lo que diferencia de las cepas HVB-1 que no es cortada por esta enzima.

Cuadro I Inmunoperoxidasa de las cepas con anticuerpos monoclonales.

Mab	Cepas		
	UY 1999	UY 2002	UY 2004
Mab 40 (anti gD)	+	+	+
Mab 51 (anti gE)	+	+	+
Mab 71* (anti gC)	+	-	-
Mab 77 (anti gC)	+	+	-
Mab 2F9 (anti HVB 5)	-	-	-
Clasificación	HVB-1.1	HVB-1.2	HVB-1.2

*El Mab 71 diferencia las cepas HVB-1.1 y HVB-1.2.



Fig. IV Inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales de las cepas aisladas de HVB-1 inoculadas en MDBK. Ejemplo de a) Reacción positiva: cepa Uy1999 con Mab 71 que detecta HVB-1.1, b) Reacción negativa: cepa Uy1999 con Mab 2F9 que detecta HVB-5, c) Control de células sin infectar con Mab 71.

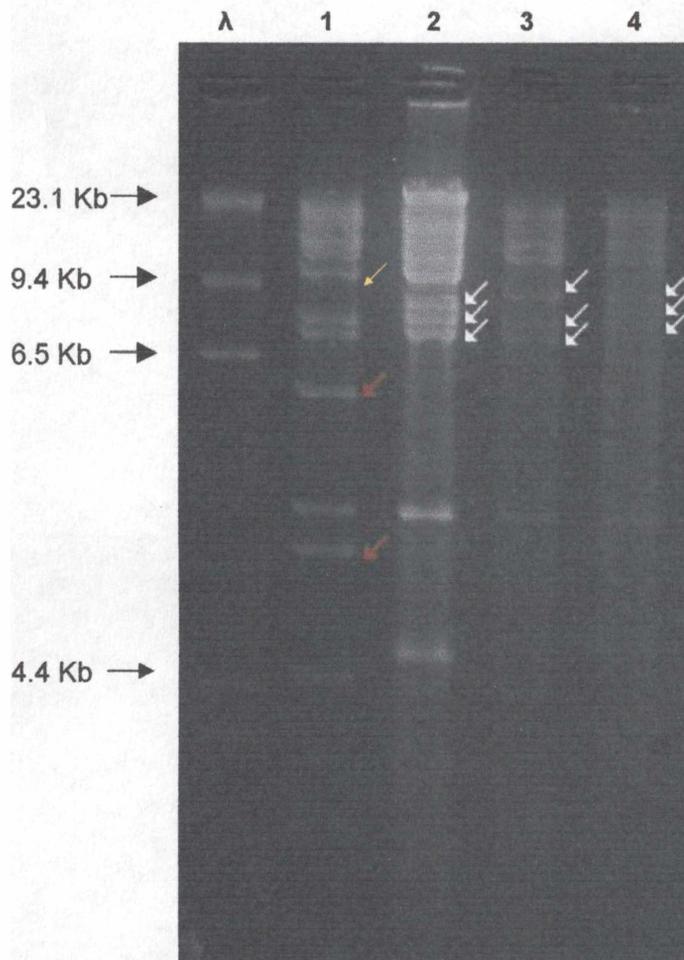


Fig. V Análisis con enzimas de restricción de los aislamientos de HVB-1. Los fragmentos de HindIII fueron separados en un gel de agarosa 0.7% y teñido con Bromuro de etidio. λ : Marcador λ /HindIII, carril 1: cepa Uy2002, carril 2: cepa Uy1999, carril 3: cepa UY2004 y carril 4: cepa EVI-123 (HVB-1.1). La flecha amarilla señala el lugar donde faltaría una banda de Uy2002 para pertenecer al subtipo HVB-1.2b. Las flechas rojas muestran las bandas de la misma cepa que no se corresponde con HVB-1.2a/b. Las flechas blancas señalan las bandas que caracterizan las cepas HVB-1.1 y HVB-1.2a.

