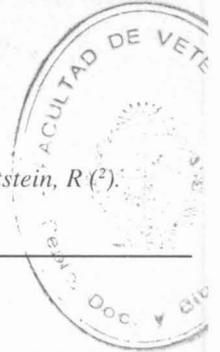


MENINGOENCEFALITIS POR HERPESVIRUS EN BOVINOS Y SU COMPROBACION MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO DE HIBRIDIZACION DE ACIDOS NUCLEICOS (DOT-BLOT)

Rivero, R.⁽¹⁾; del Campo, R.⁽²⁾; Saizar, J.⁽¹⁾; Gil, J.⁽¹⁾; Giannechini, E.⁽¹⁾; Mendaro, A.⁽³⁾; Wettstein, R.⁽²⁾.



RESUMEN

En agosto del año 1995, se desarrolló un foco de meningoencefalitis linfoplasmocitaria por herpesvirus en bovinos, en un establecimiento del Departamento de Paysandú. Los animales afectados fueron novillos de uno a dos años de edad de diversas razas y terneras Holando y Charolais menores de un año. La tasa de morbilidad fue de 5,7%, la mortalidad de 3,6%, y la letalidad del 63,8%. Los animales presentaban básicamente sintomatología de tipo nervioso: deambulación en círculo, sensorio deprimido, temblores, opistótonos, incoordinación, ataxia y temperatura elevada. Al examen histopatológico se caracterizó por una meningitis linfoplasmocitaria, encefalitis difusa, áreas con necrosis en la corteza cerebral y en algunos astrocitos se observaron corpúsculos de inclusión intranucleares.

La confirmación del agente etiológico, se realizó mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (DOT-BLOT) con sonda específica de Herpesvirus bovino tipo-1.1, a partir de muestras de cerebros de los animales necropsiados.

La sensibilidad obtenida por esta técnica fue de 1 pg.

Se demostró que las muestras pueden ser procesadas después de varios meses de conservadas a -80°C sin que se afecte la detección viral.

Palabras clave: Herpesvirus, meningoencefalitis, bovinos, DOT-BLOT.

SUMMARY

In August, 1995, an outbreak of lymphoplasmocitary meningoencephalitis in cattle due to herpesvirus, took place in a farm of Paysandú county. Affected animals were steers of different breeds, between one to two years old, and female Holstein and Charolais calves under one year old. The morbidity reached 5,7%, mortality 3,6% and a lethality of 63,8%. The symptomatology was basically nervous, including circling deambulation, depressed sensorium, trembling, opistotonus, incoordination, ataxia and hyperthermia. The histopathological examination was characterized by lymphoplasmocitary meningitis, diffuse encephalitis, necrosis in the cerebellar cortex, and intranuclear inclusion bodies in some astrocytes. Confirmation of the etiologic agent, was made through the nucleic acids hybridization (DOT-BLOT), from brain samples of necropsiated animals with a specific probe of bovine herpesvirus type-1.1.

The sensibility obtained with this technique was 1 pg.

The samples maintained at -80°C can be processed after several months.

Key words: Bovine Herpesvirus, meningoencephalitis, cattle, DOT-BLOT.

INTRODUCCION

El Herpesvirus Bovino tipo-1 (HVB-1) también conocido como el virus de la

Rinotraqueítis Bovina Infecciosa (IBR), pertenece a la familia HERPESVIRIDAE, subfamilia alphaherpesvirinae, género varicellovirus.

El HVB-1 es uno de los patógenos más importantes de los bovinos, que provoca una enfermedad contagiosa de amplia distribución mundial (3, 13, 14)

Presentado: 07/01/97, Arbitrado aprobado: 08/04/97

⁽¹⁾ Técnicos de la Dirección de Laboratorios Veterinarios «Miguel C. Rubino», M.G.A.P. Casilla de Correos N° 57.037. C.P. 60.000. Paysandú, Uruguay.

⁽²⁾ Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable». Uruguay.

⁽³⁾ Profesión liberal.

La infección por HVB-1 ha sido asociada a diversas manifestaciones clínicas incluyendo: rinitraqueítis (IBR), vulvovaginitis (IPV), balanopostitis (IPB), conjuntivitis, abortos, infecciones neonatales generalizadas y meningoencefalitis (2, 3, 7, 13).

Como otros herpesvirus, el HVB-1 posee la característica de establecer latencia en animales clínicamente sanos, con episodios intermitentes de reactivación y/o reexcreción. Es así que el virus no puede ser eliminado del huésped una vez infectado, incluso la vacunación previene solo la enfermedad clínica, pero no el establecimiento de la latencia.

En Uruguay, la presencia de IBR se sospechó por mucho tiempo, tanto del punto de vista clínico como epidemiológico. El virus fue aislado por primera vez en 1982, a partir de un toro sano seropositivo, luego de la administración de corticoides (11).

En el año 1982, Díaz y cols., describieron un foco de Rinitraqueítis Infecciosa Bovina, en terneros Holando de 1 a 4 meses de edad, presentando principalmente sintomatología nerviosa y un cuadro histopatológico de encefalitis no supurada (5).

Estudios de prevalencia de la enfermedad en nuestro país la ubican en un 45% a 48%, a nivel del rodeo nacional (21).

La vacunación a virus inactivado fue aprobada oficialmente por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, a partir de 1996. Los métodos convencionales de diagnóstico usados hasta el presente (test de seroneutralización o ELISA), no permiten diferenciar anticuerpos anti-HVB-1, generados por una primo infección de los producidos por la vacunación, por lo que se debería implementar otras técnicas que confirmen el diagnóstico.

El desarrollo de técnicas en biología molecular en los últimos años han contribuido decisivamente para el estudio del virus. Análisis del genoma por endonucleasas de restricción de varios aislamientos de casos clínicos de HVB-1 han dado tres patrones de

migración diferentes, identificando así 3 cepas distintas. La cepa del tipo 1.1 (HVB 1.1) es la más patogénica y está comúnmente asociada a enfermedad respiratoria (8); la cepa 1.2 (HVB-1.2) es la menos patogénica y frecuentemente vinculadas a enfermedad genital (6), y la cepa HVB-1.3 neurovirulenta (7) ha sido aislada de casos de meningoencefalitis en terneros (4,10,11).

En los últimos años, informaciones obtenidas a través de análisis de restricción, secuenciamiento de segmentos del genoma y por perfil de polipéptidos codificados por este virus han confirmado la estrecha relación entre los aislados HVB-1.1 y HVB-1.2 y una relación un poco más distante con HVB-1.3 recientemente clasificado como HVB-5 (20). Esta cepa (HVB-5), se diseminan rápida y eficientemente en el sistema nervioso central, causando severa patología neurológica (20).

En la búsqueda de métodos de diagnóstico alternativos más rápidos, sensibles y específicos que los métodos convencionales, se ensayó en el Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable» (IICBCL), la hibridización de ácidos nucleicos (DOT-BLOT) para la detección de HVB-1 (Herpesvirus bovino tipo-1).

Los objetivos del presente trabajo son: describir la epidemiología de un foco por herpesvirus bovino con sintomatología nerviosa y su confirmación diagnóstica mediante la técnica de hibridización de ácidos nucleicos (DOT-BLOT), con sonda específica de HVB1.1, de muestras de cerebro de los animales afectados.

MATERIALES Y METODOS

A) DESCRIPCIÓN DEL FOCO.

Los datos epidemiológicos y clínicos fueron extraídos y observados en el lugar del foco.

En el establecimiento fueron necropsiados nueve animales de ambas categorías.

Los estudios bacteriológicos,

histopatológicos y virológicos fueron realizados en la DILAVE «MIGUEL C. RUBINO».

B) HISTOPATOLOGÍA.

Los materiales (órganos de la cavidad abdominal, torácica, y sistema nervioso central) fueron fijados en formol buferado al 10 % y embebidos en parafina. Los cortes histológicos se realizaron a 5 micras de espesor y se colorearon con hematoxilina-eosina (HE). Del sistema nervioso central fueron realizados cortes representativos de diferentes áreas: corteza cerebral, ganglios basales, tálamo, hipocampo, mesencéfalo anterior, mesencéfalo posterior, cerebelo, obex, médula oblongada, y médula cervical, torácica y lumbar.

C) BACTERIOLOGÍA.

Se realizaron cultivos aeróbicos en medios de agar sangre y Mc.Conkey, y en medios especiales descritos por Mc Clain y Lee (1989)(15) para aislamiento de *Listeria monocytogenes* de tejidos del sistema nervioso central y líquido cerebro espinal, provenientes de 5 novillos afectados.

D) VIROLOGÍA

1) Serología

Muestras pareadas con un intervalo de 20 días, de suero sanguíneo provenientes de 11 animales con sintomatología clínica fueron procesadas mediante la técnica de ELISA para identificación de anticuerpos anti-IBR, según protocolo de referencia (22).

2) Aislamiento viral.

Con el material de cuatro cerebros se realizaron tres pasajes ciegos en cultivos celulares de la línea MDBK (Madin Darby Bovine Kidney).

3) Diagnóstico por técnicas biotecnológicas.

Se utilizó el procedimiento de

hibridización de ácidos nucleicos (DOT-BLOT), con las muestras de cuatro cerebros y una sonda de DNA del HVB-1 producida en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable» (IIBCE) (23).

Marcado de la sonda con P32

Fue seleccionado para su uso como sonda un fragmento BamHI de 206 pb del ADN de HVB-1. Este fue marcado con dATP alfa P32 por Random Primer de acuerdo al protocolo del kit usado (Multiprime de Amersham). Luego de marcada la sonda fue purificada por columna de Sephadex G 50, para extraer los nucleótidos no incorporados.

Extracción del ADN de las muestras

Se procesaron muestras de cerebro de cuatro animales afectados.

De cada muestra se extrajo, por separado y a temperatura ambiente de 4° C., 1 gramo de cerebro. Se maceraron por separado en un homogeneizador de vidrio estéril con 2 ml. de EDTA 10mM en PBS ph 7,2. Luego se tomaron alícuotas de 400 ul y se incubaron a 56°C durante una hora con SDS (sodium dodecyl sulfate) a una concentración de 2 % y proteinasa K a 100 ug/ml. El ADN fue purificado por extracción con fenol una vez, dos veces con éter y precipitado con acetato de sodio 0,3 M ph 5,2 en etanol 90 % a -20°C durante toda la noche. Luego el pellet fue lavado con etanol 70 % secado al vacío y resuspendido en NaOH 0,2 N, incubado a 100°C durante 5 minutos y rápidamente enfriado.

Muestras sembradas

Después de agregar 50 ul de acetato de amonio 2M cada muestra fue filtrada a través de una membrana de nylon positivamente cargada (Boehringer) usando el aparato de multifiltro (BIO-RAD).

La fijación del ADN a la membrana se realizó por cocción de 120°C. durante 30 minutos.

Se sembraron tres diluciones (100pg, 10pg. y 1pg. de ADN) de cada muestra de cerebro enfermo.

Se utilizó como control negativo una muestra de ADN de cerebro normal en las mismas diluciones que el anterior.

Se usó como control positivo el mismo fragmento BamHI del ADN de HVB-1 usado como sonda en las siguientes cantidades (1ng, 100pg, 10pg.).

Hibridización

Se prehibridizó en estufa de hibridización a 42°C con formamida al 50% en la solución de hibridización (5X SSC) (solución de cloruro de sodio y citrato de sodio), agente de bloqueo 0,5% (p/v), N-lauroilsarcosina, sal sódica, 0,1 % (p/v); SDS, 0,02 % (p/v)) durante 2 horas.

La hibridización fue realizada en las mismas condiciones de temperatura y formamida que la prehibridización, durante 20 horas.

Los filtros fueron lavados dos veces durante 15 minutos cada una en una solución de SSC 1X y SDS 0,1 %, y dos veces 30 minutos cada una en SSC 0,2X y SDS 0,1 %.

Fue expuesto a placas de autoradiografía a -80°C durante 48 horas.

4) Diagnóstico de Rabia.

Se remitieron muestras de sistema nervioso central refrigeradas, de cuatro bovinos afectados, para diagnóstico de Rabia Parálitica Bovina, al Departamento de Zoonosis y Vectores del Ministerio de Salud Pública (MSP). Las técnicas empleadas fueron inoculación intracerebral en ratones y la técnica de Seller para determinación de corpúsculos de Negri.

RESULTADOS

a) Descripción del foco.

La enfermedad se presentó en el

mes de agosto de 1995, en novillos de 1 a 2 años de edad, de diversas razas (Hereford, Charolais, A. Angus, Holando, cebuínas y cruza), de los que enfermaron 25 y murieron 20; y en terneras, Holando y Charolais, menores de un año, de las cuales se vieron afectadas 22 y murieron 10. La morbilidad general fue de 5,7%, con una mortalidad del 3,6% y una letalidad del 63,8% (CUADRO 1).

Los indicadores de salud de cada categoría afectada, se detallan en el CUADRO 1. Estas dos categorías de animales no estuvieron en contacto entre sí, no existiendo ovinos en el predio.

Los mismos pertenecían a un establecimiento agrícola-ganadero-lechero del Departamento de Paysandú, de 1450 hectáreas, con más del 90% de su superficie mejorada (praderas convencionales y agricultura cerealera-forrajera).

Se detectaron factores predisponentes en la población de riesgo tales como: cambio de dentición en terneras, elevadas tasas de parasitismo y traslación, pastoreo en bloque con altas cargas instantáneas (7.6 a 39.3 animales por hectárea) según época del año y nivel forrajero.

Los animales enfermos presentaban deambulación en círculo, sensorio deprimido, temperatura de 41°C a 42°C, disnea, mucosas pálidas, deshidratación, frecuencia cardíaca aumentada, mioclonias faciales, opistótonos, masticación y salivación, dificultad en la ingestión de agua, deshidratación, y diarrea en algunos enfermos. Una vez instaurados los síntomas, la evolución sigue un curso agudo, muriendo en 72 a 96 horas.

También se encontraron animales que presentaban sintomatología de decaimiento e hipertemía sin signos nerviosos, que en general no murieron.

b) Necropsia y exámenes histopatológicos.

Los nueve animales necropsiados, presentaron aumento de líquido

Cuadro 1 - Datos de Población de riesgo, Morbilidad, Mortalidad y Letalidad.

CATEGORIA	STOK EXPUESTO	ENFERMOS	MUERTOS	MORBILIDAD	MORTALIDAD	LETALIDAD
NOVILLOS	590	25	20	4,2 %	3,2 %	80 %
TERNERAS HASTA 1 AÑO	230	22	10	9,5 %	4,3 %	45,4 %
TOTAL	820	47	30	5,7 %	3,6 %	63,8 %

cefalo-raquídeo y edema meníngeo. Tres animales (un novillo y dos terneras) presentaron neumonía en los lóbulos craneales de los pulmones.

Las lesiones histológicas más importantes se localizaron en el sistema nervioso central (S.N.C.), siendo similares en todos los casos.

Se observó una meningitis linfoplasmocitaria, que en ciertas áreas consistían en una densa capa de elementos mononucleares (Fig. N°1).

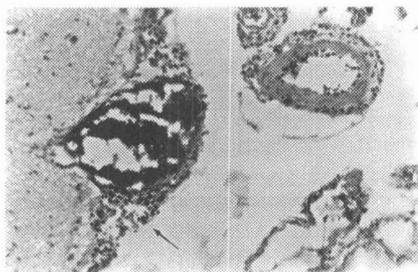


Fig.1. Corteza cerebral de un novillo de un año. Se observa infiltración de meninges por elementos mononucleares (linfocitos y plasmocitos) (flecha), congestión de los vasos sanguíneos e infiltración perivascular linfocitaria. H. E., 100 X.

La encefalitis se caracterizó por una difusa infiltración perivascular de elementos mononucleares (linfocitos, macrófagos y plasmocitos), formada hasta por seis capas de células inflamatorias afectando tanto la sustancia blanca como la gris (Fig. N°2).

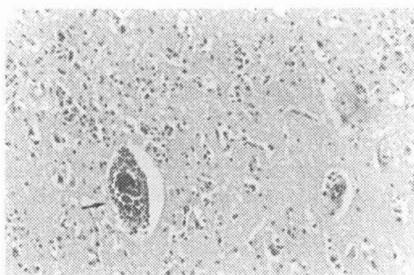


Fig.2. Corteza cerebral (ternera de un año). Acúmulos perivasculars linfocitos. H.E. 50 X

También se observó gliosis evidente y escasos neutrófilos. Las alteraciones inflamatorias eran menos evidentes a nivel de meséncefalo posterior, cerebelo, obex y médula oblongada. En la corteza cerebral se apreciaban áreas con necrosis laminar, marcada por la presencia de neuronas contraídas y eosinofílicas.

En algunas de estas áreas se observaron infiltración de neutrófilos, sin presencia de macrófagos debido probablemente a que se trataba de una lesión de curso agudo. En solo dos casos, las áreas de necrosis de la corteza cerebral eran más severas, evidenciadas por la presencia de células de Gitter. En algunos astrocitos, principalmente de la corteza cerebral, se encontraban corpúsculos de inclusión intranucleares (Fig. N°3).

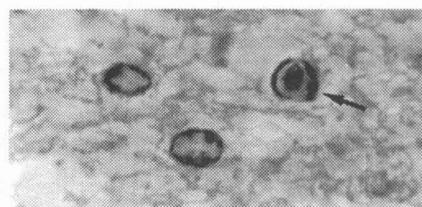


Fig.3. Corteza cerebral de novillo necropsiado, observándose corpúsculo de inclusión intranuclear en un astrocito (flecha), H.E. 500 X.

En los tres animales con lesiones pulmonares se observó neumonía del tipo intersticial con distensión de los tabiques interalveolares por elementos mononucleares, edema y congestión, con escaso exudado inflamatorio a nivel de bronquiolos.

c) Bacteriología.

Se efectuaron cultivos de material del Sistema Nervio Central (S.N.C.) y líquido cefaloraquídeo (5 novillos), no aislándose *Listeria monocytogenes* u otra bacteria de significación patológica.

d) Virología.

1) Las once muestras de sueros pareadas fueron positivas, sin variación en los títulos de anticuerpos entre la 1ra. y 2da. muestra.

2) Aislamiento del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina: Los tres pasajes ciegos en cultivo celulares resultaron negativos.

3) Diagnóstico biotecnológico mediante sondas de DNA.
(Cuadro N° 2) (Fig.4).

**Cuadro 2 - Resultados
DOT-BLOT**

Muestras	Cantidades de ADN		
	100pg.	10pg	1pg.
Cerebro 515 T2	+	+	+
Cerebro 515 T3	+	+	-
Cerebro 515 T4	+	+	-
Cerebro 515 T5	+	+	+
Cerebro Normal	-	-	-
Sonda de 206pb	(+)	(+)	(+)
	1ng	100pg	10pg

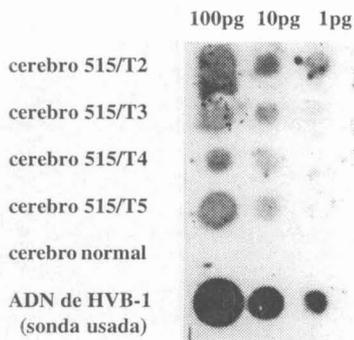


Fig.4. Hibridización DOT-BLOT. Muestras de cerebro con HVB-1: 512/T2, T3, T4, T5; control negativo positivo: ADN de HVB-1.

El ADN del HVB-1 fue detectado en las cuatro muestras de cerebro tomadas de animales que presentaron sintomatología nerviosa y con diagnóstico histopatológico de meningoencefalitis no supurada. El análisis por DOT-BLOT con sonda específica de HVB-1.1 de éstas muestras después de conservadas a -80° C durante meses, demostró la presencia de ADN de HVB-1 en todas las muestras.

No se detectaron secuencias genómicas no específicas en las muestras de cerebro normal utilizadas como control negativo. Las condicio-

nes de hibridización usadas fueron ajustadas para que solamente hibridizaran con la sonda aquellas secuencias altamente homólogas a la misma.

4) Diagnóstico de Rabia.

Las cuatro muestras remitidas al Departamento de Zoonosis y Vectores-MSP, resultaron negativas.

DISCUSION

Los datos epidemiológicos, la forma de presentación clínica del foco, con un período largo de aparición de animales enfermos que se extendió a 47 días, (algunos se recuperaron); una mortalidad del 3,6 % y factores predisponentes de stress con alta dotación por hectárea, guardan similitudes con otros brotes de Herpesvirus Bovino y sus variantes, descritas en la bibliografía (2, 8, 14, 18).

Las alteraciones histológicas (encefalitis difusa, lesiones necróticas de la corteza cerebral y meningitis asociado a la presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares encontradas en las muestras procesadas son características de la infección por el herpesvirus bovino (3, 9, 12, 19).

La presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares en la mayoría de los casos podría explicarse por el curso agudo de la enfermedad, demostrado por la ausencia de macrófagos (células de Gitter) en las lesiones degenerativas de la corteza, en siete de los nueve animales necropsiados.

La distribución de las lesiones inflamatorias del SNC, afectando tanto la sustancia gris como la sustancia blanca, más marcadas en la corteza cerebral y diencéfalo, decreciendo en intensidad hacia el mesencéfalo posterior y mielencéfalo son similares a las observadas por Eugster y cols. (1974) y Riet Correa y cols. (1989) (9, 19).

Beck (1975), en Canadá describe un brote donde las alteraciones fueron situadas preferentemente en la médula y pedúnculos cerebelares (1), en tanto que otros investigadores no reportan

una ubicación exacta a las lesiones inflamatorias (3, 12).

Las siguientes enfermedades fueron descartadas en base a los resultados de laboratorio y datos epidemiológicos obtenidos: fiebre catarral maligna, rabia paralítica bovina, lengua azul, listeriosis, y polioencefalomalacia por carencia de tiamina.

La primera y segunda muestra de sueros procesados por ELISA fueron positivas, sin variación en los títulos de anticuerpos entre ambas.

La presencia de anticuerpos anti-IBR indica que los animales estuvieron en contacto con el virus. La no variación en los títulos entre ambas muestras podría explicarse porque la primera se extrajo recién a los 15 días de la aparición de los primeros casos. Posiblemente al momento de la primera extracción los animales habrían producido anticuerpos anti-IBR cuyos títulos habrían alcanzado la meseta de la curva. Por este motivo no se registró un alza de los títulos en la segunda muestra obtenida 20 días después.

Dada las condiciones de stress en que se encontraban los animales y las características de los herpesvirus de desarrollar latencia, se podría pensar en una reactivación y/o reexcreción del virus.

Los resultados negativos de los tres pasajes ciegos en cultivos celulares para aislamiento viral, podría deberse a la pérdida de infectividad de las partículas virales por las condiciones de extracción, almacenamiento y arribo de las muestras.

Sin embargo, se pudo identificar la presencia del virus mediante técnicas biotecnológicas (DOT-BLOT) que no requieren la conservación de la capacidad infectiva de la partícula viral.

Los resultados obtenidos por hibridización de ácidos nucleicos (DOT-BLOT), con sonda específica de HVB-1.1 marcada radioactivamente con P32 nos confirman la etiología de la enfermedad. Las muestras de ADN extraídas de cerebros de cuatro animales del establecimiento, con

diagnóstico histopatológico de meningoencefalitis no supurada y sembradas en diluciones decrecientes sobre membrana de nylon, hibridizaron con la sonda de ADN de HVB-1.1. No hibridizaron las muestras de cerebro normal, lo que indica la especificidad de la técnica. La sensibilidad de detección evaluada por las diferentes diluciones fue de 1 pg.

En este ensayo solo podemos confirmar la etiología (HVB-1) de la enfermedad pero no el subtipo del virus actuante.

Agradecimientos

A la Dra. Stella Quintana, por su contribución en la evaluación de los datos epidemiológicos del foco.

A los Sres. Beatriz Fabrega y Marcelo Bottino por el procesamiento del material.

BIBLIOGRAFÍA

1. BECK, B.E. (1975). Infectious bovine rhinotracheitis encephalomyelitis in cattle and its differential diagnosis. *Can. Vet. J.* 16:269-271.
2. BROWN, W.; CHOW, T.L.; JENSEN, R. (1957). Symposium on the mucosal disease complex. I. Infectious bovine rhinotracheitis in feedlots of Colorado. *J. A. Vet. Assoc.* 130:p. 379-381.
3. CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. (1983). Pathology of a bovine viral encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med.* B30: p. 161-168.
4. CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. (1983). Meningoencephalitis caused by IBR Virus in Calves in Argentina. *J. Vet. Med.* 30: p. 327-332.
5. DIAS, L.E.; MAISONNAVE, J.; PAULLIER, C.; PERDOMO, E.; FIGARES, A.; DE IZAGUIRRE, R. (1982). Rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR). Descripción de un cuadro clínico en terneros en tambo. III Congreso Nacional de Veterinaria, p. 521-530.
6. EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P.A. (1990). A Study of the predominant genotypes of Bovid Herpesvirus-1 found in the U.K. *Vet. Microbiol.* 22: p. 213-223.
7. ENGELS, M.; LOEPFE, E.; WILD, P.; SCHRANER, E.; WYLER, R. (1987). The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 1987, 68:p. 2019-2023.
8. ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. (1986). Comparison of genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 67: p. 169-174.
9. EUGSTER, A.K.; ANGULO, A.B.; JONES, L.P. (1974). Herpesvirus encephalitis in range cattle. Abstracts. 17th. Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Virginia, p. 267-281.
10. FRENCH, E.L. (1962). A specific Virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust. Vet. J.* 38: p. 216-221.
11. GUARINO, H.; MAISONNAVE, J.; CAPANO, F.; PEREIRA, J. (1982). Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Uruguay. *Revista Veterinaria*: 83: p. 131-134.
12. HILL, B.D.; HILL, M.W.M.; CHUNG, Y.S.; WHITE, R.J. (1984). Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. *Aust. Vet. J.* 61: p. 242-243.
13. KAHR, R.F. (1977). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update. *JAVMA Vol.171, N°10, p. 1055-1064.*
14. LUDWIG, H. (1984). Herpesviruses of bovidae: the characterization, grouping and role of different types, including latent viruses. In: Wittmann, G.; Gaskell, R.M.; Rziha, H.J. eds., *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine. Boston/The Hague/Dordrecht/Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers.* p.171-189.
15. MC CLAIN, D.; LEE, W.H. (1989). F.S.I.S. Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. *Laboratory communication N° 57. Revised May 24, 1989. U.S.D.A. - F.S.I.S. - Microbiology Division.*
16. MILLER, N.J. (1995). Infectious Necrotic Rhinotracheitis of Cattle. *JAVMA*, 126:p. 463-467.
17. OFFAY D', J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, W.M. (1993). Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.*, Vol 54, N° 4 :p. 534-539.
18. PASTORET, P.O.; THIRY, E.; BROCHER, B.; DERBOVEN, G. (1982). Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, Consequences of latency. *Ann.Rech.Vet.* 13:p. 221-235.
19. RIET CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C. (1989). Meningoencefalite e necrose do cortex cerebral em bovinos causadas por herpes virus bovino-1. *Pesq. Vet. Bras.* 9 (112): p.13-16.
20. ROIZMAN, R.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C. and STUDDER, M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123: p.425-440.
21. SAIZAR, J. (1995). Determinación de la prevalencia de IBR en bovinos de leche y carne en Uruguay. XXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. C.C.2.1.
22. SAIZAR, J.; GUARINO, H.; CAPANO, F. (1988). Puesta a punto de la técnica inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y su comparación con la seroneutralización. XVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. C.C.7.1.
23. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning, A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.

SAN JORGE IBR-DVB

El complemento efectivo en la prevención de las enfermedades respiratorias, reproductivas y nerviosas.

San Jorge I.B.R. actúa sobre las distintas manifestaciones clínicas atribuidas al virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.

REPRO POLIVAC

La vacuna múltiple que asegura altos porcentajes de preñez.

Vacuna contra Rinitraqueitis infecciosa Bovina, Diarrea Vial Bovina, Leptospirosis y Campylobacteriosis.



LABORATORIO URUGUAY S.A.

J. J. DESSALINES 1831/35 Tel.: 619 29 45
Montevideo - Uruguay



San Jorge-Bagó

CALIDAD QUE SE EXPORTA