

Tesis Doctoral

Prevalencia y diagnóstico de herpes virus equino tipo 2 (HVE-2) en equinos deportivos SPC- su implicancia en cuadros respiratorios

Craig, María Isabel

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Craig, María Isabel. (2004). Prevalencia y diagnóstico de herpes virus equino tipo 2 (HVE-2) en equinos deportivos SPC- su implicancia en cuadros respiratorios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3706_Craig

Cita tipo Chicago:

Craig, María Isabel. "Prevalencia y diagnóstico de herpes virus equino tipo 2 (HVE-2) en equinos deportivos SPC- su implicancia en cuadros respiratorios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3706_Craig

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

***PREVALENCIA Y DIAGNOSTICO DE HERPES VIRUS EQUINO
TIPO 2 (HVE-2) EN EQUINOS DEPORTIVOS SPC –
SU IMPLICANCIA EN CUADROS RESPIRATORIOS.***

Autor: *Licenciada María Isabel Craig*

Director: *Dr. Fernando M. Fernández*

Lugar de trabajo: *Laboratorios de Vacunas Experimentales
Instituto de Virología
Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)
INTA, Castelar*



№3706

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Año 2004

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Fernando Fernández y María Barrandeguy por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio.

A la Dra. Kerstin Borchers, de la Freie Universität für Berlin- Alemania, por haber colaborado en la realización de este trabajo, por su estímulo desinteresado y por haber sido un referente importante en mi formación científica.

A Osvaldo Zabal y a su grupo de cultivo de tejidos, por su cariño y ayuda sin la cual no hubiese podido llevar adelante este trabajo de investigación.

Al Dr. Bolondi y su equipo, por su colaboración en la microscopía electrónica.

Al Dr. Zandomeni y particularmente a Nancy, por su ayuda en el secuenciamiento de las muestras.

Al Dr. Rubén Lombardo por su asesoramiento en la parte estadística.

A los haras participantes del *Convenio de Vinculación Tecnológica INTA Haras*, por haberme provisto de las muestras necesarias para la elaboración de este trabajo de investigación.

A mi marido Daniel y a mis padres, por haberme apoyado incondicionalmente y haber sido el motor más fuerte en la concreción de uno de mis objetivos mas importante a nivel científico.

A Fabián y Cecilia por ser los padrinos de mi formación científica, por su preocupación y aliento constante aún estando lejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Vacunas Experimentales, Vero, Viviana, Ana Paula, Paulita, Matilde y Antonio, por los momentos y mates compartidos.

A mis compañeros del Instituto de Virología, Lili, Sele, Leandro, Gaby, Mariana N., Mariana.A, Majo, Sabrina, Marina, Ariel, Patricia, Ale, Vale, Paula, Andy y Marina L, por su amistad y almuerzos compartidos. En particular quiero agradecerle a Diego su amistad y su ayuda incondicional y desinteresada, la cual me permitió aprender y a tener confianza en mi misma en los momentos difíciles.

A Karina, por sus consejos, por su elocuencia y su criterio. Por ser un modelo importante en mi formación a nivel científica y personal.

A mis amigos, Silvina, Ariel y Guido por sus consejos y por estimularme constantemente en la concreción de este trabajo. En particular, le agradezco a Silvi su amistad, su confianza y mi inicio en el mundo del clonado. A Guido y a Romina Piccinali, su ayuda en el análisis filogenético de las secuencias.

A todos los que de alguna forma contribuyeron en la realización de este trabajo de tesis.

A mis tres amores, Dani, Marco y María

A mis padres

Resumen

Summary

Abreviaturas

Prólogo

Importancia de la industria hípica en la Argentina

Página

Introducción

1. Aparato respiratorio. Generalidades.

1.1. Fisiología del aparato respiratorio y enfermedad respiratoria 1

1.2. Mecanismos defensivos del aparato respiratorio 1

1.2.1. Estornudo, tos y reflejo de broncoconstricción 2

1.2.2. Depuración mucociliar y fagocitosis 3

1.2.3. Defensa inmunológica específica. 4

1.3. Tracto respiratorio y flora microbiana. 4

1.4. Reacciones generales de la mucosa nasal y traqueobronquial. 5

2. Enfermedad respiratoria en el equino 6

2.1. Virus asociados a patologías respiratorias en el equino 8

2.1.1. Influenza equina 8

2.1.2. Adenovirus equino 8

2.1.3. Arteritis Viral equina (AVE) 9

2.1.4 Rhinovirus equino (RVE) 9

2.1.5. Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) o virus del aborto equino 10

	<i>Indice</i>
2.1.6. <i>Herpesvirus equino tipo 4 (HVE-4) o virus de la rinoneumonitis.</i>	11
3. Familia Herpesviridae	
3.1. <i>Componentes estructurales</i>	12
3.2. <i>Genoma viral</i>	14
3.3. <i>Clasificación de los herpesvirus.</i>	16
4. Herpesvirus equinos. Aspectos comparativos.	17
5. Herpesvirus equino tipo 2 (HVE.-2)	
5.1. <i>Características del virus</i>	21
5.2. <i>Epidemiología y Patogenia</i>	22
5.3. <i>Relación virus-enfermedad</i>	24
6. Interacción huésped-patógeno	
6.1. <i>Proteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmune</i>	26
6.2. <i>Proteínas presentes en el HVE-2</i>	28
6.3. <i>Interleuquina 10 (IL-10). Generalidades.</i>	29
6.4. <i>Proteína virales homólogas a la IL-10 celular.</i>	31
Objetivos	33
Materiales y métodos	
1. <i>Diseño experimental</i>	34
2. <i>Toma de muestras</i>	
2.1. <i>Sueros</i>	35
2.2. <i>Hisopados nasales</i>	35

	Indice
3. Líneas celulares	36
4. Virus	36
5. Preparación de stock viral	37
6. Titulación viral	
6.1. Método de Unidades Formadoras de Placa (UFP)	38
6.2. Método de Reed y Muench	39
7. Neutralización viral	39
8. Aislamiento viral en cultivo celular	
8.1. Aislamiento a partir de hisopado nasal	40
8.2. Linfocitos o co-cultivo	41
9. Identificación del agente viral	
9.1. Inmunofluorescencia indirecta	42
9.2. Microscopia electrónica	42
9.3. Curva de crecimiento viral	43
10. Amplificación del stock viral	43
11. Semipurificación viral	44
12. Extracción del ADN viral	44
13. Purificación del ADN viral	45
14. Análisis de restricción	46
15. Southern Blot	46
16. Extracción de linfocitos	47
17. Reacción en Cadena de la Polimerasa	
17.1. Extracción del ADN	48
17.2. Cuantificación del ADN extraído de linfocitos en espectrofotómetro	48

<i>17.3. Primers y ciclado utilizados</i>	49
<i>17.4 PCR anidada</i>	50
<i>17.5 Identificación del producto final de la PCR anidada.</i>	50
18. PCR de β-actina	51
19. Sensibilidad de la PCR anidada	52
20. Técnica de clonado empleada	
<i>20.1. Plásmido utilizado</i>	52
<i>20.2. Ligación</i>	53
<i>20.3. Transformación</i>	53
<i>20.4. Selección de clones</i>	54
21. Caracterización de los clones positivos	
<i>21.1. Extracción de ADN plasmídico</i>	55
<i>21.2. Mapeo por restricción</i>	55
<i>21.3. Purificación de ADN plasmídico</i>	56
22. Secuenciación	57
23. Análisis de las secuencias	57
24. Análisis Filogenético	57
25. Secuencias regulatorias de la transcripción	58
26. Análisis estadístico	59

Resultados**Capítulo I: Determinación de la circulación del HVE-2 en la Argentina**

I.1- Prevalencia serológica del HVE-2 en equinos deportivos.	60
I.2- Aislamiento viral	61
I.3- Caracterización del agente viral aislado	
I.3.1 - Curva de crecimiento	63
I.3.2- Inmunofluorescencia indirecta	64
I.3.3- Microscopía electrónica	65
I.3.4-Ensayo de restricción y southern blot	65

Capítulo II: Importancia del HVE-2 en la patología respiratoria de los equinos deportivos

II.1-Comparación entre las técnicas de aislamiento en cultivo y PCR anidada	69
II.2. Análisis de la sensibilidad de la PCR anidada en muestras de hisopada nasal	70
II.3. Detección de HVE-2 en muestras de hisopado nasal (HN).	73
II.4. Estudio de la relación entre presencia de HVE-2 y enfermedad respiratoria.	74

Capítulo III: estudio genómico de las cepas aisladas y su posible relación con la patogenicidad

III.1-Elección y análisis de la secuencia comprendida en el producto final de la PCR.	79
III.2. Posibles secuencias regulatorias de la transcripción presentes en la región comprendida entre la posición 160 y 490 pb.	84

Indice

Discusión

86

Bibliografía

99



RESUMEN

RESUMEN

EL Herpesvirus equino tipo 2 (HVE-2) es un virus que afecta al equino y cuyo rol patogénico es controvertido. Mientras algunos autores asocian su presencia a enfermedad respiratoria de vías altas, neumonía, faringitis, conjuntivitis, anorexia y linfadenopatía, otros reportaron su aislamiento a partir de animales clínicamente sanos.

Este virus se encuentra ampliamente distribuido en las poblaciones equinas del mundo; sin embargo, hasta el momento no existen reportes acerca de su circulación en nuestro país.

Este estudio se realizó con el objetivo de determinar la presencia de este virus en la República Argentina y estudiar la importancia del mismo en la patología respiratoria del equino deportivo Sangre Pura de Carrera (SPC).

Para ello, se realizó un estudio de prevalencia serológica, el cual permitió confirmar la existencia de un elevado índice de seroprevalencia alcanzando un valor del 80,5%. Sin embargo, al intentar su aislamiento en cultivo celular, a partir de muestras de hisopado nasal de animales clínicamente enfermos, solo en el 10% (2/22) de las mismas se observó la presencia de ECP.

La utilización de técnicas como la inmunofluorescencia indirecta, la microscopía electrónica, y de otros estudios como el de comportamiento cinético en cultivo, el análisis de restricción y el southern blot, permitieron identificar al agente aislado como HVE-2.

Al analizar la relación entre excreción viral y sintomatología clínica se observó que el porcentaje de individuos que excretaba virus era significativamente mayor en el grupo de animales asintomáticos. El análisis de excreción viral realizado a animales de diferentes edades mostró que, dentro del grupo de animales asintomáticos, el porcentaje de individuos que excretaba virus era significativamente mayor en los animales menores de 1 año respecto a los mayores. Sin embargo, no se observó esta diferencia en los animales con sintomatología clínica. Por el contrario, el análisis del título promedio de anticuerpos neutralizantes permitió detectar que en aquel grupo donde el porcentaje de individuos con excreción viral era alto, el título promedio de anticuerpos era bajo. Estos resultados señalarían la existencia de una

aparente relación inversa entre la excreción viral y el título promedio de anticuerpos neutralizantes.

La comparación de las secuencias nucleotídicas correspondiente a la región 5' flanqueante del gen de la interleuquina 10 viral (IL-10 v), permitió detectar algunas diferencias entre cepas aisladas de animales con y sin sintomatología clínica. Las diferencias encontradas se localizan dentro de una región que posee elementos repetitivos en tándem, los cuales varían en cuanto a su secuencia y frecuencia de repetición. Además, el análisis de esta misma región con el programa Signal Scan, permitió detectar la presencia de posibles secuencias regulatorias de la transcripción, que se encuentran presentes tanto en mamíferos como en otros virus.

SUMMARY

Equine Herpesvirus type 2 (EHV-2) is a virus that infects horses and whose pathogenic role remains controversial. While some authors associate the presence of this virus to an upper respiratory tract disease, pneumonia, pharyngitis, conjunctivitis, anorexia and lymphadenopathy, others report its isolation from healthy animals.

This virus is worldwide distributed, however there were no reports on its presence in our country.

The present study was performed with the objective of determining the presence of EHV-2 in Argentina, to study its role in respiratory pathology on Thoroughbred horses.

Firstly, a serologic study allowed us to confirm the circulation of this viral agent in a high seroprevalence level (80,5%). In spite of this result, EHV-2 was isolated only from 2 of 22 (10%) nasal swabs obtained from horses with clinical respiratory symptoms. The identity of the isolated virus was confirmed by indirect immunofluorescence, electron microscopy and other studies such as, kinetic growth curve, restriction assay and southern blot.

In the analysis of the relation between viral excretion and clinical symptoms, the percentage of healthy animals with viral excretion was significant. Furthermore, this percentage was higher for horses under 1 year old. This difference was absent in the group of animals with clinical signs of disease. Complementary, the mean titre of neutralizing antibodies was significantly lower in the group of animals with the higher percentage of viral excretion. All these results support the idea of an inverse relation between viral excretion and neutralizing antibodies.

Preliminary results were obtained from the analysis of the nucleotide sequence located in the non-coding region downstream the viral interleukin 10 (IL-10 v) gene. We could determine some differences in the sequence and repetition frequency between strains isolated from horses, with and without clinical signs. All these differences were located in a zone with in tandem repetitive elements.

The analysis on the same region with the *Signal Scan* program allowed detecting possible sequences present in mammals and other viruses, which could be involved in the regulation of the viral IL-10 expression.

In conclusion, in the present study we report the first isolation of EHV-2 in our country and confirm its wide distribution in the studied sport horses population. In spite of the lack of correlation between viral excretion and respiratory symptoms, we cannot rule out the participation of EHV-2 in the respiratory pathology. Other studies such as infection of gnotobiotics and foals deprived of colostrum feeding, should be performed to clarify its pathogenic role. Further studies on the activity and regulation of viral IL-10 should be performed to confirm its relation with clinical signs.



PROLOGO

Importancia de la industria hípica en la Argentina

Durante mucho años los caballos fueron utilizados solo para la realización de tareas agrícolas y de transporte. Con el transcurso del tiempo fueron apareciendo nuevas actividades ecuestres y hoy en día, las actividades hípicas que se desarrollan, conforman una verdadera industria convirtiéndose en un eje esencial dentro de la economía nacional.

La Argentina es el segundo exportador de carne fresca equina más importante a nivel mundial, después de los Estados Unidos y es uno de los criadores de caballos Pura Sangre de Carrera (SPC) más importante, ubicándose en el sexto lugar detrás de Estados Unidos, Australia, Japón, Nueva Zelanda e Irlanda. Así mismo, en los últimos años, la exportación de caballos de polo ha ido adquiriendo relevancia, al igual que la exportación de otros productos (cueros y vísceras) y subproductos biológicos derivados del equino. En este rubro se encuentra la gonadotrofina sérica de yeguas preñadas (PMSG), la cual se comercializa en la Comunidad Económica Europea, los Estados Unidos y Japón para ser utilizada en la industria farmacéutica.

El importante ingreso de divisas, relacionado con estas tareas y otras ligadas a la reproducción, entrenamiento, preparación deportiva, actividades en diversos escenarios competitivos, actividades productivas, comerciales y de servicio, relacionadas con la alimentación, y atención veterinaria, representa el 0,27% del Producto Bruto Interno total (PBI), el 5,27% del PBI agropecuario y el 13,17% del PBI pecuario*.

***Fuente:** Mora y Araujo ICASA Investigación y Consultora Agropecuaria. Diciembre 2000



INTRODUCCION

1- Aparato respiratorio. Generalidades.

1.1- Fisiología del aparato respiratorio y enfermedad respiratoria.

Los síntomas clínicos de enfermedad del aparato respiratorio varían en función de la zona o zonas afectadas, así como de la naturaleza, gravedad y duración del proceso patológico. Las lesiones a nivel del sistema conductor del gas (cavidad nasal, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos) pueden provocar síntomas clínicos importantes como estornudo violento, tos o disnea. Por el contrario, las lesiones en el pulmón pueden ocurrir sin que aparezcan signos de insuficiencia respiratoria hasta que dos tercios de éste se encuentren afectados.

No todas las enfermedades del aparato respiratorio producen síntomas clínicos visibles. Ejemplo de esto son los animales de granja, donde son frecuentes las bronconeumonías crónicas que se evidencian cuando al animal es sometido a ejercicio intenso o en caballos deportivos cuando son sometidos a ejercicios violentos (Robinson *et al.*, 1993).

1.2- Mecanismos defensivos del aparato respiratorio

El aparato respiratorio está constantemente expuesto a partículas vivas e inertes y por lo tanto, requiere de un mecanismo eficaz para eliminarlas. Este mecanismo esta constituido por tres componentes básicos:

- 1) Estornudo, tos y reflejo de broncoconstricción.

- 2) Depuración mucociliar y fagocitosis.
- 3) Sistema inmunológico específico

Cualquiera de las partes anatómicas que componen el aparato respiratorio, tienen al menos dos mecanismos defensivos que evitan o reducen los efectos nocivos de agentes físicos, químicos o infecciosos (Figura 1)

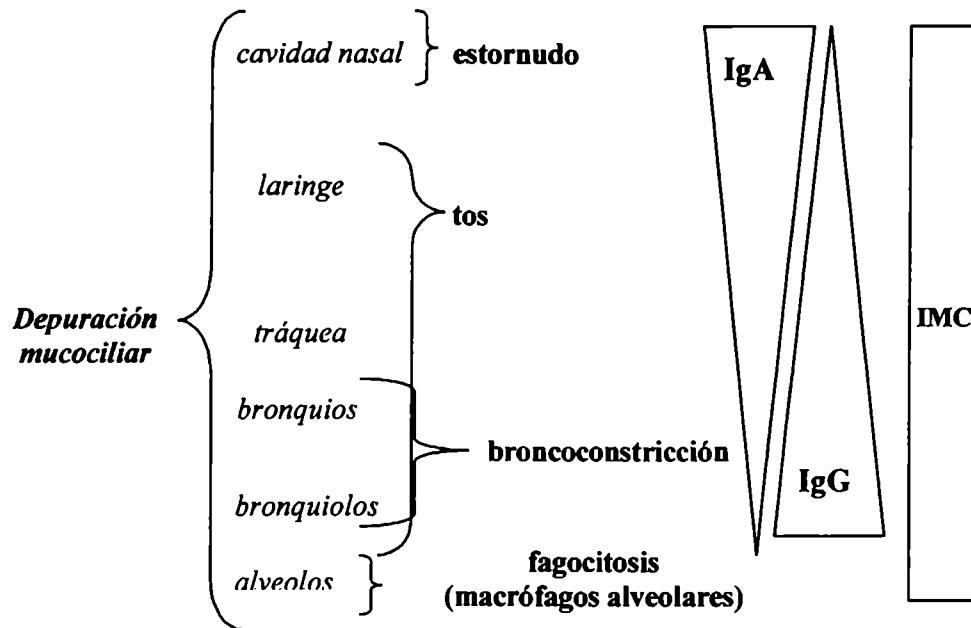


Figura 1: Mecanismos defensivos del aparato respiratorio. **IMC:** inmunidad mediada por células; **Ig:** inmunoglobulina.

1.2.1- Estornudo, tos y reflejo de broncoconstricción

Se producen por la acción de estímulos irritativos mecánicos o químicos. La tos es un mecanismo defensivo por el cual se eliminan las secreciones y los cuerpos extraños de la laringe, tráquea y bronquios.

El reflejo de broncoconstricción se caracteriza por un aumento en la resistencia de las vías aéreas, impidiendo la penetración de agentes irritantes mecánicos o químicos.

1.2.2- Depuración mucociliar y fagocitosis

El epitelio respiratorio es pseudoestratificado, ciliado, columnar y contiene células caliciformes. La superficie celular está cubierta por una capa fluida o manto mucociliar. En esta superficie, los cilios se mueven en forma sincronizada, desplazando la capa de moco en determinadas direcciones. Este proceso permite que el moco sea deglutido o expectorado.

Las partículas que penetran en la cavidad nasal pueden quedar atrapadas dependiendo de su tamaño. Aquellas que posean un diámetro mayor de 10 μm quedarán retenidas en el moco, en tanto que solo un 5% quedará retenido de aquellas que posean un diámetro menor a 2 μm . Las partículas depositadas por encima de los bronquios son eliminadas por el mecanismo de transporte mucociliar y pueden colaborar en la tos. En cambio, si se depositan por debajo de los bronquiolos serán fagocitadas por los macrófagos alveolares.

La defensa mucociliar, puede verse comprometida cuando actúan factores que alteran la composición y producción de moco o la actividad de los cilios. Se sabe que el aumento de la temperatura corporal, por encima de los 39° C, como las bajas temperaturas corporales disminuyen la actividad de los cilios (Robinson *et al.*, 1993).

1.2.3- Defensa inmunológica específica.

La importancia de los mecanismos de inmunidad específica se pone de manifiesto en la existencia de una elevada incidencia de enfermedades respiratorias en animales inmunodeprimidos.

En las secreciones del tracto respiratorio existen todas las clases de inmunoglobulinas, siendo la IgA la predominante en las vías respiratorias superiores. Su función principal radica en el bloqueo de la unión del antígeno a la superficie de las células epiteliales, actuando por exclusión inmune. Está presente en las secreciones fisiológicas, pero su concentración aumenta durante los procesos inflamatorios. La concentración de esta inmunoglobulina va disminuyendo hacia las vías respiratorias inferiores, con el concomitante aumento de la concentración de la IgG.

La inmunidad conferida por células también cumple con un papel importante. Existen linfocitos T y B en los agregados linfoides de la submucosa bronquial, semejantes a las placas de Peyer del intestino.

1.3- Tracto respiratorio y flora microbiana.

La cavidad nasal posee una flora microbiana característica que depende tanto de la especie animal como del medio ambiente.

Algunos microorganismos tienen la capacidad de colonizar la mucosa, a pesar de los mecanismos defensivos. Aquellos que son patógenos pueden provocar infección

por si mismos, o predisponer al animal a otras infecciones mediante la supresión de los mecanismos de depuración mucociliar.

Por lo general, los virus generan una infección inicial que muchas veces suprime los mecanismos defensivos del aparato respiratorio y favorece la aparición de infecciones bacterianas secundarias. Estas infecciones suelen aparecer entre los 5 a 7 días después de la infección viral inicial.

1.4- Reacciones generales de la mucosa nasal y traqueobronquial.

Existen agentes, que pueden tener o no una naturaleza infecciosa, capaces de producir cambios similares en la mucosa del tracto respiratorio superior. Estos agentes pueden ser de origen: físico (polvo), químico (anhídrido sulfuroso, amoníaco), virus (herpesvirus, adenovirus, calicivirus), bacterias, micoplasmas, hongos y parásitos.

En ciertos ambientes, los agentes físicos y químicos deprimen los mecanismos de depuración y actúan como factores predisponentes para el desarrollo de las infecciones microbianas respiratorias. Esto se observa con mucha frecuencia en equinos estabulados sobre cama de paja o viruta en ambientes poco ventilados.

La acción de un agente irritante genera cambios en la mucosa, como el descenso en el número de cilios y un aumento en el número y actividad de las células caliciformes; acompañado por una inflamación aguda de la lámina propia con congestión. Estas alteraciones suelen aparecer a los pocos días de producida una

infección viral, pero suele desarrollarse en semanas cuando el agente es un gas o sustancia irritante.

Las consecuencias funcionales asociadas a estas alteraciones de la mucosa generan una mayor secreción de moco, una disminución en la depuración y un incremento de la resistencia de la vía aérea por la excesiva producción de moco

Por otra parte, existen alteraciones respiratorias debido a alergias o hipersensibilidad de tipo I. Las manifestaciones clínicas de este tipo de hipersensibilidad están directamente asociadas con la liberación de sustancias vasoactivas. De esta manera, la gravedad de la reacción depende del número de mastocitos sensibilizados y la localización de los mismos. Por lo general, si la reacción ocurre en la mucosa respiratoria provocará estornudo y tos.

En los equinos puede darse la “enfermedad pulmonar obstructiva crónica”, la cual es causada por hipersensibilidad a alérgenos fúngicos, causando disnea respiratoria (Robinson *et al*, 1993).

2- Enfermedad respiratoria en el equino

Las afecciones respiratorias en nasofaringe, como en faringe, genera un estado de decaimiento general del animal con la consecuente pérdida de rendimiento.

Las enfermedades respiratorias pueden estar asociadas a la presencia de diversos agentes patógenos, como virus, bacterias, parásitos y hongos. Dichas enfermedades presentan síntomas similares, razón por la cual, resulta difícil arribar a un diagnóstico etiológico, exclusivamente a través de la observación clínica. Es de destacar que, en

la mayoría de los casos, estos cuadros clínicos permanecen sin un diagnóstico de etiología definida.

En un estudio de casuística realizado en el Instituto de Virología del INTA, se observó que solo en el 25% (70/281) de los hisopados nasales asociados a cuadros respiratorios, recibidos en el período 1998-2002, pudo identificarse el agente viral etiológico, mientras que el 75% (211/281) restante permaneció sin diagnóstico (Figura.2).

Las infecciones respiratorias de origen viral predisponen al animal a infecciones bacterianas secundarias o a la presencia de procesos inflamatorios crónicos que pueden desencadenar en cuadros clínicos más severos.

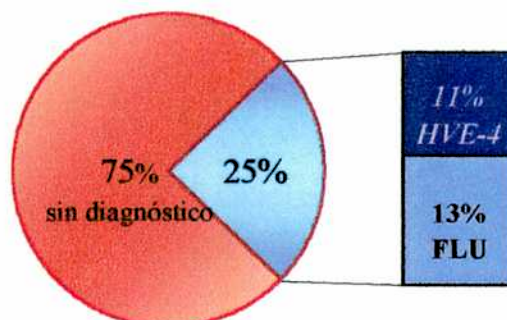


Figura 2: Distribución de las muestras de casos respiratorios durante el período 1998-2002. Los principales agentes virales asociados con esta patología fueron el Virus de la Influenza equina (FLU) y el Herpesvirus equino tipo 4 (HVE-4).

2.1- Virus asociados a patologías respiratorias en el equino

2.1.1- Virus de la Influenza equina

Este virus pertenece al género Influenza tipo A dentro de la familia *Orthomyxoviridae* y presenta dos subtipos antigénicos que afectan al equino, el tipo 1 (H7N7) y el tipo 2 (H3N8). Los prefijos H y N se refieren a la hemoaglutinina y la neuraminidasa, dos antígenos de superficie sujetos a variabilidad antigénica. El tipo 1 causa una enfermedad mas leve que el tipo 2, ya que este posee propiedades neumotrópicas acentuadas.

La sintomatología que acompaña la infección se manifiesta con la aparición de tos seca, fiebre, descarga nasal, e inapetencia, en aquellos casos en los que no se presenta otro tipo de complicación.

Su transmisión es horizontal a través de aerosoles, produciendo una infección de alta morbilidad. El tiempo de incubación es corto y generalmente se presenta como brotes epizooticos (Gerber *et al*, 1969) (Powell *et al*, 1992).

2.1.2- Adenovirus equino

La presencia de este agente es común en caballos, produciendo en general una infección subclínica en caballos adultos y presentando sintomatología clínica de la enfermedad respiratoria superior, particularmente en potrillos durante el primer año de vida (Studdert, 1974). Los mismos suelen infectarse a partir de la madre durante el período de amamantamiento.

El virus persiste en el tracto respiratorio superior de los equinos adultos, y de esta manera, cada animal puede actuar como portador y transmitir la infección horizontalmente por vía aerógena.

Los signos clínicos se presentan como tos, descarga nasal, respiración dificultosa, fiebre, conjuntivitis y, en ocasiones, puede aparecer materia fecal blanda (Powell *et al*, 1974b, Powell, 1992), la cual puede ser de valor al momento de la realización del diagnóstico.

2.1.3- Arteritis Viral equina (AVE)

El virus causal de esta patología es miembro de la familia *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997), y produce una enfermedad clínica aguda que se caracteriza por presentar fiebre, conjuntivitis, frecuencia respiratoria aumentada, depresión y problemas a nivel sistémico, generando vasculitis severa generalizada y edema.

La transmisión de la enfermedad puede ocurrir por la vía respiratoria y venérea.

Los abortos se producen en el 50% al 80% de los casos en las yeguas preñadas como resultado de la muerte fetal dentro del útero. (Doll *et al*, 1957; Jones *et al*, 1957; Powell, 1992)

2.1.4- Rhinovirus equino (RVE)

Los rinovirus equinos pertenecen a la familia *Picornaviridae*. Hasta el momento han sido descritos tres serotipos diferentes: Rhinovirus equino tipo 1, tipo 2 y tipo 3.

La transmisión de la infección es horizontal, por vía aerógena y la larga persistencia del virus en el tracto respiratorio, sugeriría la participación del caballo como portador.

El tipo 1 es el más común de los serotipos y pudo ser aislado a partir de animales con y sin sintomatología clínica de enfermedad respiratoria. Los signos clínicos asociados a la infección con este tipo varían desde una faringitis severa con descarga serosa o mucopurulenta, hasta fiebre transitoria sin otro signo.

La infección con RVE tipo 2 puede causar infecciones respiratorias con complicaciones bacterianas en potrillos, aunque también pudo ser aislado de animales clínicamente sanos (Powell, 1992). El tipo 3 fue aislado en Suiza y existen evidencias serológicas de su circulación en Inglaterra (Steck *et al*, 1976; Burrows, 1981).

2.1.5- Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) o virus del aborto equino

Es considerado el principal causante de abortos entre los equinos, sin embargo, también es responsable de algunas patologías nerviosas y problemas respiratorios.

Los estudios serológicos indican que es un virus altamente distribuido en la población equina (Matumoto *et al*, 1965); y que los individuos pueden experimentar varias recidivas durante el transcurso de su vida (Doll y Bryans, 1963; Burrows y Goodrige, 1973).

Los signos clínicos de la infección respiratoria se observan en caballos jóvenes, luego de su primera infección. Estos signos incluyen malestar general, temperatura (39-40° C) y descarga nasal, la cual suele ser mas intensa que la originada por

influenza y posee una mayor tendencia a transformarse en purulenta como resultado de una infección bacteriana secundaria. También puede observarse inflamación de los ganglios submandibulares y tos.

Aunque los potrillos suelen recibir Acs maternos colostrales, estos desaparecen de la circulación periférica aproximadamente a los 3 meses de edad (Bagust *et al*, 1972) y la reinfección suele ser subclínica debido a la reducida multiplicación del virus en el tracto respiratorio alto (Burrows y Goodridge, 1973).

2.1.6- Herpesvirus equino tipo 4 (HVE-4) o virus de la rinoneumonitis.

Es uno de los agentes causales de enfermedad respiratoria mas importante del equino joven. Comúnmente, provoca enfermedad respiratoria aguda en los potrillos mayores de 2 meses de edad.

Los síntomas más comunes son fiebre, anorexia y descarga nasal serosa a mucopurulenta. Pueden desarrollarse cuadros clínicos mas complicados e incluso llegar a la muerte cuando se suceden infecciones bacterianas secundarias. (Ferner *et al*, 1993).

Existen trabajos que describen diferentes posibles sitios de latencia para este virus, como ser los linfonódulos bronquiales, tonsilares, ganglio del V^{to} nervio craneal, linfocitos y ganglio trigémino (Welch *et al*, 1992; Borchers *et al*, 1999).

La reactivación del virus puede producir una excreción nasal prolongada con ausencia de sintomatología clínica (Browning *et al*, 1988).

3- Familia Herpesviridae

3.1- Componentes estructurales

Los herpesvirus se encuentran altamente diseminados en la naturaleza y la mayoría de las especies animales se encuentran afectadas por algunos de los miembros de esta familia (Tabla 1).

La inclusión de un nuevo virus dentro de la familia *Herpesviridae* depende de los componentes estructurales del mismo.

Tipo de hospedador	Virus	Subfamilia	Genoma	
			G+C (%)	Grupo
Humano	Herpes simplex 1	α	68,3	E
	Herpes simplex 2	α	69	E
	Varicella zoster	α	46	D
	Epstein Barr	γ	60	C
	Citomegalovirus	β	57	E
	Herpesvirus 6	β	42	A
	Herpesvirus 7	β	-	
<i>Otros mamíferos</i>				
Bovino	Herpes bovino 1	α	72	D
	Herpes bovino 2	α	64	E
	Herpes bovino 4	γ	50	B
	Herpes bovino 5	α	72	D
Ovino	Herpes ovino 1	-	-	D
	Herpes ovino 2	γ	-	B
Equino	Herpes equino 1	α	57	D
	<i>Herpes equino 2</i>	γ	57	A
	Herpes equino 3	α	66	D
	Herpes equino 4	α	56	D
	Herpes equino 5	γ	-	F

Porcino	Pseudo-rabia	α	74	D
Caprino	Herpes caprino 1	α	-	-
Murino	Herpes murino 1	β	59	F
	Herpes murino 2	β	47	-
	Herpes murino 4	γ	-	B
Aves				
Gallina	Herpes	α	46	D
Pavo	Herpesvirus de Pavo 1	γ	48	E

Tabla1: Algunos miembros de la familia *Herpesviridae* y su especie animal huésped (Roizman *et al*,1992).

La estructura típica de un herpesvirus consiste en a) un core, donde se encuentra el material genético viral, b) una cápside, de un diámetro de 100 a 110 nm, con una estructura icosaédrica que contiene 12 capsómeros pentaméricos y 150 hexaméricos, c) un tegumento, que consiste en un material amorfo localizado entre la cápside y la envoltura. Generalmente, este tegumento se encuentra distribuido en forma asimétrica en la partícula viral y su grosor depende de la localización del virión dentro de la célula y d) una envoltura, compuesta por una membrana lipídica con glicoproteínas proyectadas sobre su superficie (espículas) (Figura 3).

El tamaño final del virión es muy variable, alcanzando valores entre los 120 a 300 nm aproximadamente. Esta diferencia se debe en gran parte a la variabilidad que existe en el grosor del tegumento.

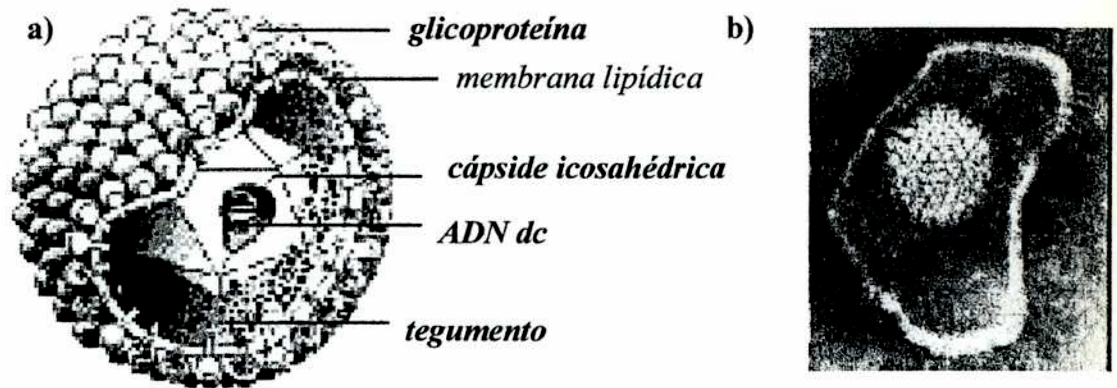


Figura 3: a) Esquema de los componentes estructurales del herpesvirus y b) Microscopía electrónica de un virión. (Fuente: www.virology.net)

3.2- Genoma viral

El genoma viral está conformado por una copia de ADN lineal, doble cadena, el cual se circulariza dentro del núcleo de las células infectadas una vez liberado de su cápside.

El ADN de los herpesvirus varía tanto en su peso molecular como en la composición de sus bases. Mientras el peso molecular varía entre 120 a 230 Kpb, la composición de G+C oscila entre el 32 % al 75% (**Tabla 1**).

Otra diferencia radica en la disposición de determinadas secuencias presentes en el genoma. En base a la presencia y localización de secuencias repetitivas, los genomas pueden dividirse en seis grupos designados con las letras A,B,C,D,E,y F (**Figura 4**).

Los virus que pertenecen al grupo A, poseen una secuencia repetitiva en forma directa en ambos extremos. En el grupo B, la secuencia se repite numerosas veces,

en ambos extremos, aunque el número de sus repeticiones puede ser diferente. Por su parte, el grupo C posee un menor número de repeticiones de las secuencias terminales, pero presenta otras secuencias directas no relacionadas y repetitivas, que fragmentan la secuencia única del genoma. El grupo D presenta la secuencia de uno de los extremos en orientación inversa y localizada internamente, en cambio el grupo E se caracteriza por tener ambas secuencias terminales en orientación inversa e internamente yuxtapuestas, dividiendo el genoma en dos partes, cada una de las cuales consiste en una secuencia única flanqueada por repeticiones invertidas. Por último, el grupo F presenta una secuencia única que carece de secuencias repetitivas tanto en forma directa como inversa (Roizman *et al.*, 1992, Roizman y Pellett, 2001).

Grupo Disposición de secuencias repetitivas

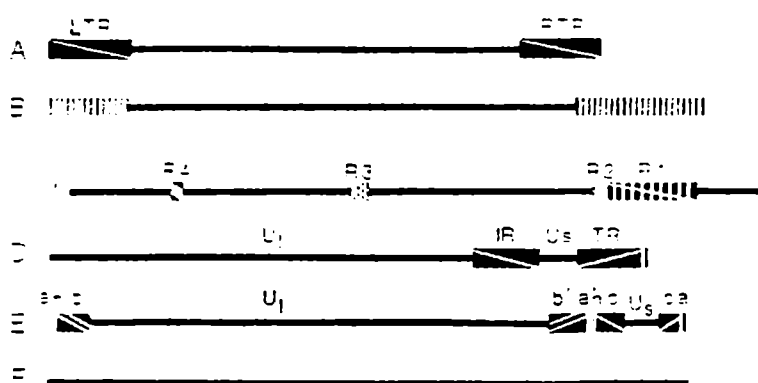


Figura 4: Diagrama esquemático de los 6 posibles arreglos de secuencias repetitivas presentes en el genoma de la familia *Herpesviridae*, donde las secuencias repetitivas se esquematizan como rectángulos negros.

LTR-RTR: secuencias repetitivas terminales izquierda y derecha, respectivamente, **R1 a R4:** secuencias repetitivas internas, **IR-TR:** repeticiones internas y terminales, **a, b y c:** secuencias repetidas directas, **a', b' y c'** secuencias en posición invertida respecto a **a, b y c**, **UI-US:** secuencia única larga ó corta, respectivamente (Roizman *et al.*, 1992).

3.3- Clasificación de los herpesvirus.

Los miembros de la familia *Herpesviridae* fueron clasificados en tres *subfamilias* denominadas *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamaherpesvirinae*, en base a sus propiedades biológicas y patogénicas. La homología en la secuencia del ADN, la similitud en la organización de genes y la presencia de importantes proteínas virales relacionadas, permitió clasificar a un número reducido de integrantes de esta familia, dentro de un determinado *género*.

Los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* se caracterizan por poseer un amplio rango de huésped, un ciclo de replicación corto y una diseminación rápida en cultivo, con la consecuente lisis celular. Además, son capaces de establecer latencia particularmente en ganglios sensoriales.

Esta subfamilia se divide en dos géneros principales denominados *Simplexvirus* y *Varicellovirus*, cuyos prototipos son el herpes simplex humano (HSV-1) y el herpes zoster (VZV), respectivamente.

Por su parte, los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* poseen un rango de huésped restringido, siendo su comportamiento especie específico tanto *in vivo* como *in vitro*. Su ciclo de replicación es largo, por lo cual, su crecimiento en cultivo es lento. El virus permanece altamente asociado a células y en general, puede observarse el agrandamiento de aquellas que se encuentran infectadas (citomegalia) y la presencia de cuerpos de inclusión.

Pueden establecer latencia en glándulas secretorias, células linfocíticas y riñón, entre otros tejidos.

Esta subfamilia está comprendida por los géneros *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* y *Roseolovirus*, cuyos prototipos son el citomegalovirus humano (HCMV), el citomegalovirus murino (MCMV) y el herpes humano tipo 6 (HHV-6), respectivamente.

Finalmente, la subfamilia *Gamaherpesvirinae* también posee un rango de huésped restringido que se limita a los individuos pertenecientes a la misma familia u orden al que corresponde su hospedador natural. Algunos miembros de esta subfamilia suelen producir enfermedades linfoproliferativas con crecimiento canceroso, aunque la mayoría de las infecciones no suelen ser tumorigénicas. La duración del ciclo de replicativo varía según la cepa de virus de que se trate. Aunque el genoma viral replica en células linfoblastoides, la infección no suele ser productiva en estas células. Sin embargo, los miembros de esta subfamilia son capaces de producir una infección lítica en células fibroblásticas y epiteliales. Frecuentemente establecen latencia en tejido linfoideo, siendo esta específica para los linfocitos B y T.

Los géneros *Lymphocryptovirus* y *Rhadinovirus* pertenecen a esta subfamilia y sus prototipos son el virus Epstein Barr y el Herpesvirus Saimiri, respectivamente (Roizman y Pellet, 2001; Agius y Studdert, 1994). **En esta subfamilia se encuentra incluido el HVE-2** (Telford *et al*, 1993).

4- Herpesvirus equinos. Aspectos comparativos

El equino es el huésped natural para 5 herpesvirus, conocidos como Herpesvirus equino tipo 1 (HVE-1) o virus del aborto equino, Herpesvirus equino tipo 2 (HVE-2),

Herpesvirus equino tipo 3 (HVE-3) o virus del exantema coital, Herpesvirus equino tipo 4 (HVE-4) o virus de la rinoneumonitis y Herpesvirus equino tipo 5 (HVE-5).

El HVE-1 pertenece a la subfamilia de los α -herpesvirus, con un genoma cuya estructura pertenece al grupo D. Posee un crecimiento rápido en cultivo y su ECP se caracteriza por presentar cuerpos de inclusión, redondeamiento y lisis acompañado de desprendimiento celular.

Se encuentra ampliamente distribuido en la población equina y se lo considera el principal causante de abortos, razón por la cual es considerado de gran importancia económica para la industria equina. (Allen y Bryans, 1986). Problemas respiratorios y disfunciones neurológicas, son otras de las patologías descritas para este virus (Chowdhury *et al*, 1986).

HVE-1 establece latencia en tejido linfóideo que drena el tracto respiratorio alto, ganglio trigémino, lóbulo olfatorio y linfocitos T y su principal vía de transmisión es la horizontal (Scott *et al*, 1983; Slater *et al*, 1994; Welch *et al*, 1992; Gibson *et al*, 1992).

Al igual que el HVE-1, HVE-4 pertenece a la subfamilia de los α -herpesvirus y presenta un genoma cuya estructura corresponde al grupo D. Se asocia principalmente, con problemas respiratorios (Studdert, 1983) y establece latencia en el ganglio trigémino, linfonódulos bronquiales, tonsilares, ganglio del V^{to} nervio craneal y linfocitos (Welch *et al*, 1992; Borchers *et al*, 1999). Ambos virus comparten la mayoría de sus componentes inmunogénicos, lo cual dificulta su diferenciación mediante técnicas serológicas convencionales (Thomson *et al*, 1976). Esta particularidad, llevó a considerar la existencia de dos subtipos de HVE-1, donde cada uno era responsable de una patología diferente: enfermedad respiratoria y

abortos. Estudios posteriores, demostraron que sus genomas presentaban una homología menor al 20% (Allen y Turtinen, 1982) y que poseían patrones de restricción diferenciales. Estos resultados permitieron separar taxonómicamente a ambos virus en HVE-1 y HVE-4 (Studdert *et al*, 1981).

El virus del exantema coital equino (ECE) o HVE-3 es otro miembro de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* y como tal, posee un rápido crecimiento en cultivo, aunque posee la particularidad de permanecer asociado a la célula. Su ECP presenta cuerpos de inclusión, redondeamiento, lisis celular y frecuentemente, la aparición de grandes sincicios. Es antigénicamente diferente a los dos herpesvirus equinos antes mencionados, dado que puede ser diferenciado mediante técnicas serológicas convencionales (Krogsrud *et al*, 1971).

La vía de infección es venérea, sin embargo no produce abortos ni infertilidad. Se caracteriza por producir lesiones pustulares y ulcerosas en la mucosa vaginal y vestibular, pene, prepucio, región perineal y ocasionalmente, en la boca y mucosa del tracto respiratorio alto (Studdert, 1974).

El HVE-2 y HVE-5 pertenecen a la subfamilia de los γ -herpesvirus (Telford *et al*, 1993), presentando crecimiento y ECP lento en cultivo, con una marcada tendencia a permanecer asociados a la célula. Esta característica requiere la realización de pasajes ciegos antes de la visualización del primer foco de infección. Algunos aislamientos presentan redondeamiento celular con incremento de su refractabilidad y posterior desprendimiento de la monocapa celular, mientras que otros producen redondeamiento celular con formación de sincicios y vacuolización (Wharton *et al*, 1981; Browning y Studdert, 1988).

En comparación a los herpesvirus equinos descritos, HVE-2 presenta placas de lisis de menor tamaño, sin embargo estas pueden variar entre los diferentes aislamientos (Plummer *et al*, 1969, 1973; Harden *et al*, 1974).

Tanto el HVE-5 como el HVE-2 pudieron ser aislados a partir de linfocitos, y de muestras de hisopado nasal provenientes de animales con enfermedad respiratoria.

El HVE-2 también fue aislado de muestras de hisopado ocular de animales con conjuntivitis y a partir de riñón, bazo y testículo, durante la obtención de cultivos celulares primarios. (Plummer *et al*, 1963; Kemeny y Pearson, 1970; Karpas, 1966; Browning y Studdert, 1987a). Su genoma de 192 kpb, pertenece al grupo A dado que en ambos extremos posee secuencias repetitivas directas y dos secuencias internas repetitivas indirectas (Browning y Studdert, 1989). Por su parte, el HVE-5 posee un genoma de 179 kpb que corresponde al grupo F, ya que no contiene secuencias repetitivas de ningún tipo (Agius y Studdert, 1994).

Existe una considerable heterogeneidad antigénica y genómica entre las diferentes cepas de HVE-2. En un ensayo de neutralización cruzada, se determinó que el título de Acs frente a las cepas heterólogas fue marcadamente menor que frente a la cepa homóloga (Plummer *et al*, 1973).

La comparación de los patrones de restricción, mostró homogeneidad entre las cepas del HVE-5, y la existencia de una gran heterogeneidad entre los diferentes aislamientos de HVE-2 (Browning y Studdert, 1987b). Si bien HVE-2 y HVE-5 comparten ciertas proteínas, poseen un perfil diferencial de sus glicoproteínas (Agius y Studdert, 1994). Agius y colaboradores (1994) realizaron un estudio comparativo en SDS-PAGE sobre la estructura de las diferentes proteínas y glicoproteínas de HVE-2 y HVE-5, donde observaron que el perfil de proteínas presentaba bandas de

similar peso molecular, mientras que el perfil de las 6 glicoproteínas presentes en estos virus mostraba un patrón diferencial.

Mientras que existen trabajos para HVE-2 que prueban el estado de latencia en linfocitos B, ganglio trigémino y tejido linfoide, como linfonódulos submandibulares, orofaríngeo, bronquiolares y mediastinal, hasta el momento no se ha podido determinar los sitios de latencia para el HVE-5 (Rizvi *et al*, 1997; Drummer *et al*, 1996; Dunowska *et al*, 1999).

5- Herpesvirus equino tipo 2 (HVE-2)

5.1- Características del virus

El HVE-2 es un virus ampliamente distribuido en la población equina. Existen reportes de su aislamiento en el Reino Unido, Japón, Suiza, Alemania, Estados Unidos, Sudáfrica, Australia, Canadá, Nueva Zelanda y Hungría (Plummer y Waterson, 1963; Kono y Kobayashi, 1964^a; Karpas, 1966; Petzoldt, 1967; Hsiung *et al*, 1969; Erasmus, 1970; Studdert *et al*, 1970; Sherman *et al*, 1977; Horner *et al*, 1976; Pálfi *et al*, 1978). Los estudios serológicos realizados muestran la existencia de una alta seroprevalencia en las poblaciones estudiadas, con valores que oscilan entre un 43% a un 83%, de acuerdo con la edad del animal (Bagust *et al*, 1972).

En un primer momento, este virus fue clasificado dentro de la familia *Betaherpesviridae* en base a sus propiedades biológicas. Posteriormente, mediante el análisis de secuencias en diferentes fragmentos de su genoma, se observó un bajo

contenido del dinucleótido CpG y una alta homología con genes que codifican para proteínas específicas de los γ -herpesvirus, particularmente del Epstein Barr (EBV) y Herpesvirus Saimiri (HVS). Algunas de estas proteínas son: la ADN polimerasa, la glicoproteína B, y la principal proteína de la cápside (Telford *et al*, 1993). Además, HVE-2 codifica para una proteína símil interleuquina 10, que también se encuentra presente en el EBV, como producto del gen *BCRF1* (Rode *et al*, 1993).

El estudio de la relación intertípica del HVE-2 con el resto de los herpesvirus equinos, demostró la ausencia de neutralización cruzada con los tres α -herpesvirus (HVE-1,4 y 3) (Plummer y Waterson, 1963; Plummer, 1964; Studdert *et al*, 1970). De la misma forma, un estudio posterior permitió confirmar el mismo resultado entre HVE-2 y HVE-5 (Plummer *et al*, 1973).

El estudio intratípico, mediante neutralización cruzada y digestión con enzimas de restricción, permitió demostrar la existencia de una alta heterogeneidad antigénica y genómica entre las diferentes cepas de HVE-2 aisladas (Turner y Studdert, 1970; Plummer *et al*, 1973; Harden *et al*, 1974). Si bien la importancia de esta heterogeneidad para la epidemiología y la patogenia no está del todo clara, es probable que esta característica esté relacionada con la existencia de infecciones simultáneas con virus genómicamente diferentes (Browning y Studdert, 1987a).

5.2- Epidemiología y Patogenia

Los potrillos nacen serológicamente negativos y adquieren los Acs pasivamente a través del calostro. Aunque se ha observado que la aplicación de suero hiperinmune

por vía subcutánea, protege temporariamente a los potrillos frente a la infección, la incorporación natural de esta inmunidad no evita totalmente que el animal se infecte (Bagust *et al*, 1972; Wilks y Studdert, 1974; Belak *et al*, 1980).

La infección se adquiere regularmente por vía horizontal a partir de su madre o de otro animal (Browning y Studdert, 1987a). Esta sería la principal vía de transmisión, ya que hasta el momento no hay evidencias de la existencia de una vía vertical. La ausencia de virus en hisopado nasal y linfocitos en potrillos al momento de su nacimiento, y su posterior aislamiento alrededor de los 30 días de edad, sostiene la idea de la adquisición de la infección en el período pos natal (Wilks y Studdert, 1974; Harden *et al*, 1974; Studdert, 1974).

El virus se excreta por nariz y nasofaringe, presentando similitud epidemiológica con HVE-1 y HVE-4 (Plummer y Waterson, 1963; Bagust *et al*, 1972; Sherman *et al*, 1977).

HVE-2 fue aislado de diferentes tejidos, como riñón, conjuntiva, médula ósea, bazo, glándula mamaria, glándulas salivales y vagina; sin embargo, no fue posible aislarlo de calostro (Karpas, 1966; Gleeson y Studdert, 1977; Kono y Kobayashi, 1964a; Dutta *et al*, 1978; Harden *et al*, 1974; Murray *et al*, 1996; Studdert, 1974).

Browning y Studdert (1987) probaron que el HVE-2 puede generar una infección persistente con excreción viral constante; e incluso el animal puede reinfectarse con cepas genómicamente diferentes.

Otros trabajos demostraron que la forma en que el virus persiste en su hospedador es mediante el establecimiento de un estado de latencia en linfocitos B, ganglio trigémino y tejido linfoide del tracto respiratorio alto (Rizvi *et al*, 1997; Drummer *et al*, 1996).

5.3- Relación virus-enfermedad

El papel del HVE-2 como agente causal de enfermedad en el equino es incierto, debido a que se encuentra ampliamente distribuido en la población equina y es frecuente su aislamiento a partir de animales clínicamente sanos.

En un estudio realizado sobre 16 yeguas y sus potrillos, sin sintomatología clínica, se logró aislar el virus a partir de hisopados vaginales, nasales y oculares (Harden *et al*, 1974). La inoculación experimental de HVE-2 en potrillos presentó un aumento de los Acs neutralizantes, sin embargo no se evidenciaron signos clínicos de ningún tipo. El virus logró aislarse de uno de los potrillos en muestras previas al comienzo de la experiencia y en ausencia de sintomatología clínica (Wilks y Studdert, 1974). Por otro lado, en una inoculación experimental por vía intra uterina, se logró aislar el virus de un potrillo recién nacido, el cual mostró signos muy débiles de infección (Gleeson y Studdert, 1977).

En muchos casos la presencia del HVE-2 se asocia con enfermedad de las vías respiratorias altas, neumonía, faringitis, conjuntivitis, fiebre, inflamación de los nódulos linfáticos y anorexia (Browning y Studdert, 1987a; Browning y Studdert, 1988; Agius y Studdert, 1994).

Ya en 1971, Studdert reporta el aislamiento de HVE-1 y un HVE no tipo 1, de crecimiento lento, a partir de potrillos con problemas respiratorios y conjuntivitis.

Schlocker y colaboradores (1995) reportaron la presencia de HVE-2, como único agente viral, en macrófagos pulmonares de animales que presentaban un cuadro de enfermedad pulmonar crónica. En un estudio realizado sobre potrillos con enfermedad respiratoria de las vías bajas, se observó que la presencia del HVE-2 en

aspirado traqueal era significativamente mayor que en los animales clínicamente sanos (Murray *et al*, 1996). De la misma manera, la detección de antígeno viral en material obtenido del raspado de epitelio nasal y cortes de secciones de pulmón, fue asociado con un cuadro de neumonía con presencia del HVE-2 (Ames *et al*, 1986).

La serología positiva y el aislamiento del HVE-2, a partir de muestras de hisopado nasal provenientes de 10 potrillos con signos de enfermedad respiratoria, le permitieron a Fu y colaboradores (1986) postularon a este virus como agente iniciador de la enfermedad. En un trabajo realizado sobre potrillos con historia de neumonía por *Rhodococcus equi*, se propone como un factor predisponente para la invasión secundaria de la bacteria a los pulmones, la participación del HVE-2 en una primera fase de la enfermedad (Nordengrahn *et al*, 1996).

Durante una infección experimental con HVE-2, realizada sobre dos animales tratados con dexametasona, se observó la presencia de un cuadro clínico de enfermedad caracterizado por conjuntivitis, linfadenopatías y tos, al mismo tiempo en que el virus era aislado de hisopado nasal, ocular y linfocitos. Ante una segunda dosis con dexametasona a los 92 días post infección, los animales volvieron a excretar virus pero en ausencia de sintomatología clínica (Borchers *et al*, 1998).

Collinson y colaboradores (1994) reportaron el aislamiento de HVE-2 a partir de muestras de hisopado ocular, provenientes de 5 potrillos con queratoconjuntivitis. Por su parte, en un trabajo posterior, Kershaw demostró la existencia de una asociación entre animales con queratoconjuntivitis y la presencia de HVE-2 (Kershaw *et al*, 2001).

6- Interacción huésped-patógeno.

6.1- Proteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmune

Los virus que poseen la capacidad de establecer infecciones latentes y/o persistentes, permanecen durante largos períodos de tiempo en su hospedador; lo cual implica la existencia de mecanismos que facilitan la evasión del sistema inmune. Algunos de estos mecanismos se relacionan con: síntesis de proteínas homólogas a componentes del complemento; proteínas que secuestran con alta especificidad inmunoglobulinas por su porción Fc, interviniendo en el proceso de fagocitosis mediada por receptor; síntesis de receptores solubles para citoquinas y quimoquinas, que interfieren en la unión ligando receptor celular; síntesis de proteínas homólogas a citoquinas; inhibidores de proteasas y péptidos que inhiben la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o interfieren en la transducción de señales. De este modo, estos mecanismos son capaces de modificar tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Gooding, 1992). En la tabla 2, se muestran ejemplos de proteínas virales homólogas a componentes del sistema inmune. Es importante destacar que, hasta el momento solo en algunos casos se ha comprobado la interferencia de estas proteínas con la respuesta inmune del hospedador.

<i>Virus</i>	<i>Proteína viral</i>	<i>Acción</i>
<i>Adenovirus</i>	VA RNA E3-gp19K E3-14.7K E3-10.4/14.5K E1B-19K	Interfiere en la respuesta a INF (α/β) Evita la traslocación del CMH I a membrana Protegen a la célula de la acción del TNF
<i>Poxvirus</i>	T2 VCP B15R crmA	Se une a TNF Se une a C4b Se une a IL-1 Inhibe la activación de la IL-1
<i>Herpesvirus</i>	EBER RNA BCRF1 UL18 gC-1 gE-gI CCPH US28, UL33 US27,yUL78 U83 M131 VMIP-I,II, y III ORF74 ECRF3 ORF E1 y E6	Interfiere en la respuesta a INF (α/β) Homóloga a IL-10 Inhibe la expresión de CMH I Se une a C3b Unen Ig por porción Fc Se une a C4b Receptor de quimoquinas Homólogo de quimoquina Homólogo de quimoquina Homólogo de quimoquina Receptor de quimoquinas
<i>Retrovirus</i>	P15E TAR	Inhibe trasducción de señal vía PK C Interfiere en la respuesta a INF (α/β)

Tabla2: Proteínas virales con efecto modulador sobre la respuesta inmune e inflamatoria (Gooding, 1992; Seow, 1998))

6.2- Proteínas presentes en el HVE-2

El HVE-2 posee 4 proteínas con una posible implicancia en la modulación de la respuesta inmune. Estas son tres proteínas G acopladas a receptor (GPCR) putativas, producto de los marcos abiertos de lectura 74, E6 y E1, y una proteína homóloga a IL-10 (Telford *et al*, 1995).

Dos de las tres GPCRs, tienen su contraparte en otros herpesvirus y conservan una importante homología con receptores celulares de citoquinas, como el receptor de IL-8 y el receptor de β -quimoquinas, denominado CKR1. El tercero de los GPCRs, producto del gen E6, posee secuencias motivo y una estructura protéica característica de los GPCRs (Camarda *et al*, 1999).

Dentro del fragmento N del genoma viral, generado por el corte con la enzima de restricción *Eco RI*, se hallaron 19 marcos de lectura abiertos (ORFs) distribuidos en las dos cadenas, 11 al lo largo de una de ellas y 8 en la complementaria. Además, se hallaron dos grupos de secuencias repetitivas con una probable participación en la regulación de funciones importantes como replicación, encapsidación y patogénesis viral.

Dentro de los 19 marcos abiertos de lectura del HVE-2, se observó que el ORF 10 codificaba para una proteína con una alta homología con la IL-10 equina (84%), humana (76%), murina (68%) y con el producto del gen BCRF1 del EBV (70%) (Figura 4).

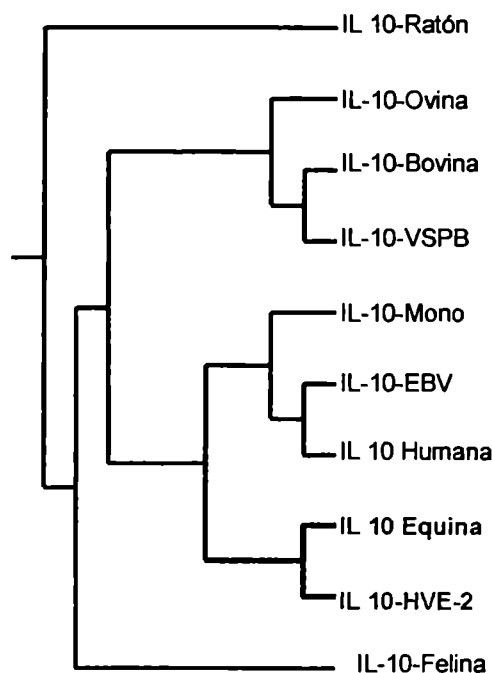


Figura 4: Árbol filogenético de distancias (método de Neighbour Joining) donde se muestra la relación entre algunas IL-10 de mamíferos y virales, incluyendo las proteínas BCRF1 del Epstein Barr, E10 del HVE-2 y la del virus de la Estomatitis Pustular Bovina (VSPB).

El análisis de las secuencias dentro del ORF 10 permitió detectar la presencia de secuencias asociadas con la iniciación de la transcripción, poliadenilación y una secuencia hidrofóbica hacia el extremo N terminal de la proteína, relacionada con la secreción de la misma (Rode *et al*, 1993; 1994).

6.3- Interleuquina 10 (IL-10). Generalidades

La IL-10 es una glicoproteína de 18 kDa producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T y células no linfoides como queratinocitos. Esta citoquina tiene como función principal el control de la respuesta inmune, particularmente de la respuesta

inflamatoria, inhibiendo la secreción de IL-2, INF- γ y otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12. La IL-10 también actúa como factor quimiotáctico sobre linfocitos T (CD8+), suprime la migración de los linfocitos T (CD4+) en respuesta a IL-8, inhibe la expresión del CMH II en monocitos, alterando la proliferación de los linfocitos T activados, y estimula la proliferación de linfocitos B “in vitro” (Jinquan *et al*, 1993; de Waal Malefyt *et al*, 1991; Viera *et al*, 1991; Rousset *et al*, 1992).

Cabe destacar, que al intervenir en la regulación de la respuesta inmune, cualquier modificación en su nivel de expresión podría alterar el equilibrio que existe entre protección y patología. Estudios realizados en el modelo ratón permitieron demostrar que, tanto la respuesta innata como la adaptativa, podían ser exacerbadas o deprimidas al disminuir o elevar experimentalmente los niveles de IL-10 (Lin *et al*, 1998; van Den Broek *et al*, 2000).

A pesar de tener un papel preponderante en el control de la respuesta inmune, existen pocos trabajos acerca de los mecanismos implicados en la regulación de su expresión.

Durante un estudio realizado sobre la región 5´flanqueante del gen de IL-10, se identificaron dos regiones relacionadas con la presencia de elementos de regulación positiva y negativa para este gen (Kube *et al*, 1995). En trabajos más recientes se demostró que, Sp1 y Sp3 serían dos de los factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de la IL-10 humana (Tone *et al*, 2000; Ma *et al*, 2001).

6.4- Proteínas virales homólogas a la IL-10 celular

Como en el caso de HVE-2, tanto el EBV como el Orf virus (OV) codifican para una proteína similar IL-10, denominada BCRF1 y OV NZ2-IL-10, respectivamente. Estas proteínas virales conservan algunas de las funciones descritas para esta citoquina, y poseen una alta homología respecto a la de su hospedador natural.

Teniendo en cuenta que el orf virus es un parapoxvirus que infecta ovejas y al hombre, la comparación de la secuencia aminoacídica entre la proteína viral y la de sus hospedadores presenta valores altos. Dicha homología alcanza valores del 80% y 67% para la oveja y el humano, respectivamente (Fleming *et al*, 1997). Por su parte, la homología entre la IL-10 del EBV y la del hombre es de un 84% (Moore *et al*, 2001).

Dentro del marco funcional, tanto la BCRF1 como la OV NZ2-IL-10, conservan algunas de las funciones descritas para la IL-10 celular. Para BCRF1 se describe una actividad inhibitoria sobre la producción de IL-2, la proliferación de los linfocitos T, en respuesta a un antígeno o mitógeno, la síntesis de INF- γ y la disminución en la producción de citoquinas, liberadas como consecuencia de la activación monocitos. Para OV NZ2-IL-10 se observó la presencia de actividad inhibitoria sobre la síntesis de citoquinas por parte de macrófagos activados, monocitos periféricos y queratinocitos, y una función estimuladora para la proliferación de timocitos de ratón. Además, se observó que durante la infección experimental de una oveja con una mutante deletada en este gen, los niveles de INF- γ en el tejido infectado, eran mayores respecto a los del control con el virus tipo salvaje (Moore *et al*, 2001; Fleming *et al*, 2000).

La existencia de actividad biológica por parte de estas proteínas sugiere un rol de las mismas en diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune con la consecuente contribución a la patogénesis del virus.

En un trabajo realizado por Kanegane y colaboradores (1997), se analizó la presencia de IL-10 total (viral y celular) y de IL-10 viral (vIL-10) en suero de pacientes sanos y con infección crónica activa por EBV (CAEBV). Como resultado se observó que los niveles de IL-10 total y vIL-10 se encontraban significativamente aumentados en el caso de los pacientes con CAEBV respecto a los pacientes sanos. Estudios realizados por Taga y colaboradores (1995) confirmaron la presencia de altos niveles de IL-10 total (celular y viral), circulante en pacientes con mononucleosis infecciosa por EBV.

Estudios realizados en personas con linfoma nasal asociado a EBV, permitieron detectar la expresión de la vIL-10, cuya función sería la de facilitar el crecimiento del tumor (Xu *et al*, 2001).

Contrariamente a lo descrito para el EBV, no existen reportes sobre la actividad funcional de la IL-10 del HVE-2. Sin embargo, la presencia de esta proteína en el genoma viral y su alta homología con la IL-10 equina, sugiere algún papel inmunomodulador de la misma para evadir la respuesta inmune.



OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis tiene como objetivos:

1- Determinar la presencia de HVE-2 en equinos deportivos de la República Argentina.

2- Estudiar el papel y la significancia de este virus en la patología respiratoria.

3- Analizar la existencia de diferencias genómicas como posibles marcadoras de patogenicidad



MATERIALES Y METODOS

1- Diseño experimental

Con el objeto de determinar la presencia de HVE-2 en nuestro país, en primer lugar, se realizó un estudio de prevalencia serológica sobre un total de 153 muestras de sueros, pertenecientes a una población de equinos deportivos SPC de la Provincia de Buenos Aires, con edades que oscilan entre los 5 meses a los 2 años. Para llevar a cabo dicho estudio se utilizó la técnica de neutralización viral descripta por Nordengrahn y colaboradores (2001), con modificaciones. En segundo lugar, y con el fin de aislar el virus en cultivo celular, se analizaron muestras clínicas de HN, previamente analizadas y que habían resultado negativas para los virus respiratorios comúnmente evaluados en la rutina del laboratorio de diagnóstico del Instituto de Virología del INTA. La identificación del virus aislado se efectuó mediante la utilización de técnicas como inmunofluorescencia indirecta, microscopía electrónica, ensayo de restricción y southern blot.

Con el fin de evaluar el papel y la importancia del HVE-2 en la patología respiratoria, se analizó la prevalencia de infección sobre 66 animales con sintomatología respiratoria y 87 clínicamente sanos mediante la utilización de la técnica de PCR anidada descripta por Borchers y colaboradores (1997), con algunas modificaciones.

La existencia de diferencias genotípicas entre cepas presentes en la secreción nasal de animales clínicamente enfermos y asintomáticos, se estudió mediante la utilización de técnicas de clonado y secuenciación. Este análisis se realizó sobre la secuencia genómica correspondiente al producto final de la PCR anidada, debido a

que posee secuencias regulatorias y promotoras putativas de la interleuquina 10 viral (IL-10v), además de presentar diferencias en su tamaño.

2- Toma de muestras

2.1- Sueros:

Para la recolección de las muestras de suero, se extrajeron mediante punción yugular, 10 ml de sangre en ausencia de anticoagulante. El suero se separó por centrifugación en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.2- Hisopados nasales.

Los hisopados nasales (HN) se realizaron mediante la utilización de un hisopo por animal, tomándose muestras de ambas fosas nasales. Completado este procedimiento, el hisopo se escurrió en 3 ml de medio de transporte (Medio Esencial Mínimo Eagle, MEM-E Gibco) suplementado con 2% de SFB (Bioser) y antibiótico (10 UI/ml de penicilina, 66 ug/ml de estreptomina y 50 ug/ml de sulfato de gentamicina). Cada suspensión se clarificó mediante centrifugación durante 15 minutos a $3000 \times g$ y el sobrenadante resultante se separó en alícuotas de 1 ml, conservándose a -70°C , hasta el momento de su utilización.

3- Líneas celulares

Se emplearon células de riñón de conejo (RK-13) (ATCC-CCL37) crecidas a 37°C en Medio Esencial Mínimo modificado de Dulbecco (MEM-D) (Gibco), suplementado 10% de SFB y antibiótico (**medio de crecimiento**). El mantenimiento de las líneas celulares se realizó a igual temperatura en MEM-D suplementado con 5% de SFB y similares concentraciones de glutamina y antibiótico a las utilizadas en el medio de crecimiento (**medio de mantenimiento**)

4- Virus

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron como controles las siguientes cepas de referencia de Herpesvirus equino tipo 2 (HVE-2) y Herpesvirus equino tipo 5 (HVE-5):

Virus	Cepa	Procedencia	Título (UFP/ml)
HVE-2	<i>LK</i>	ATCC 701	7×10^5
	<i>H40</i>	NVSL Ames, Iowa	$4,8 \times 10^6$
	<i>T400*</i>	Freie Universität Berlin, Alemania	$2,1 \times 10^7$
HVE-5	<i>P48*</i>	Freie Universität Berlin, Alemania	$7,3 \times 10^6$

* Gentilmente cedidos por la Dra. Borchers del Institut für Virologie, FU, Alemania .

5- Preparación de stock viral

Monocapas de células RK-13 se crecieron en frascos plásticos T25 (NUNC™) y se infectaron con 200 µl de la suspensión viral. El inóculo se adsorbió durante 1 hora a 37°C, agitando el inóculo cada 15 minutos. Finalizado este tiempo se descartó el inóculo y se cubrieron las células con medio de mantenimiento permaneciendo a 37°C durante 72 a 96 hs. Al cabo de este período se observaron las monocapas para identificar la presencia de efecto citopático (ECP). En aquellas monocapas que no presentaban un ECP generalizado se realizó un pasaje ciego. Para ello, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de tripsina para lavar la monocapa y se dejó durante unos minutos a 37°C hasta el levantamiento de la monocapa celular. Posteriormente, se agregó 10 ml de medio de mantenimiento y se homogeneizó la suspensión con ayuda de pipeta de vidrio. Finalmente se sembraron 5 ml de dicha suspensión en un nuevo frasco.

En aquellas monocapas que presentaban ECP total se cosechó el sobrenadante y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm para bajar restos celulares. El sobrenadante resultante se fraccionó en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -70°C hasta el momento de su utilización.

6- Titulación viral

6.1- Método de Unidades Formadoras de Placa (UFP)

A partir de un cultivo celular en monocapa, se realizó una suspensión de $2,5 \times 10^5$ células /ml en medio de mantenimiento y se sembró una microplaca de 24 pocillos (NUNC™), utilizando un volumen de 200 μ l/ pocillo. Paralelamente, se prepararon diluciones seriadas al décimo del stock viral en MEM-D sin SFB, agregándose en cada pocillo 200 μ l de cada dilución por duplicado. Luego de incubar durante 1h a 37°C, se agregaron en cada uno de los pocillos, 400 μ l de medio conteniendo 1,6% de Carboxi Metil Celulosa (CMC) (Fluka) en MEM-D suplementado con 2% de SFB. Las monocapas así tratadas, se incubaron a 37°C durante 7 días, se fijaron en formol al 3% durante 30 min. y se tiñeron con una solución de giemsa diluida 1/30 en PBS durante 30 min. Finalmente se contaron las placas de lisis.

El título viral se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UFP/ml)} = n/v \times d$$

Donde:

n= promedio del número de placas contadas.

v= volumen del inóculo.

d= dilución viral.

6.2- Método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938)

En una microplaca de 96 pocillos se agregaron 50 µl de medio de mantenimiento y posteriormente se añadieron por cuadruplicado, 50 µl de diluciones seriadas al décimo realizadas a partir de un stock viral. Paralelamente, se realizó una suspensión de células RK-13 conteniendo 2×10^5 células /ml y se adicionaron 50 µl de dicha suspensión a cada uno de los pocillos. Finalmente, la placa se incubó a 37°C durante 7 días y al cabo de este período, se determinó el título viral en relación con la siguiente fórmula:

$$- \text{Log DICT50/ml} = [\log A + (\log B \times \log C) / \text{volumen de inóculo}]$$

Donde:

A= Log de la dilución anterior al 50%

B= Log de la distancia relativa entre las diluciones que contienen el 50%, calculada como: $[(\% \text{ positivo anterior al } 50\% - 50\%) / (\% \text{ positivo anterior al } 50\% - \% \text{ positivo posterior al } 50\%)]$

C= Log del factor de dilución

7- Neutralización viral

Para calcular el título de Acs neutralizantes contra HVE-2, se utilizó la técnica de neutralización viral (NV) de virus fijo-suero variable, descrita por Nordengrahn y colaboradores (2001), con algunas modificaciones.

En una primera etapa, los sueros problema se inactivaron a 56° C durante 30 min. y luego se realizaron diluciones seriadas en base 4 en MEM-D. Un volumen de cada dilución se sembró en una microplaca de 96 pocillos por cuadruplicado y se agregó a cada pocillo un volumen similar de una suspensión viral conteniendo 100 DICT₅₀/50µl. Luego de una incubación a 37° C durante 4 hs, se agregó en cada uno de los pocillos, una suspensión de células RK-13 (10⁴ células /50 µl) y se incubó nuevamente a 37°C durante 7 días. Como control positivo se utilizó un suero de referencia cedido gentilmente por la Dra. Borchers del Institut für Virologie-FU, Alemania.

El título neutralizante se determinó en la última dilución de suero que protegió la monocapa, y su valor se calculó de acuerdo con la fórmula de Reed y Muench.

Para el estudio de seroprevalencia se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron un título neutralizante (TN) mayor o igual a 1,1.

8- Aislamiento viral en cultivo celular

8.1- Aislamiento a partir de hisopado nasal

Un volumen de 0,5 ml del material obtenido a partir del hisopado nasal, se sembró sobre una monocapa de células RK-13 preformada en frasco plástico T25. Una vez adsorbido el inóculo a 37° C durante 1 h, se cubrió la monocapa con 10 ml de medio de mantenimiento. Las monocapas se incubaron a 37° C durante 7 días, observándose diariamente la aparición de ECP. En aquellas monocapas que no presentaron ECP

evidente se realizó un pasaje ciego, para lo cual la misma se expuso a tres ciclos de congelado y descongelado. Finalizado este paso, se tomaron 0,5 ml del sobrenadante de cultivo para infectar una nueva monocapa. SE consideraron negativas las muestras que al 4^{to} pasaje ciego no presentaron ECP.

8.2- Aislamiento a partir de linfocitos o co-cultivo

Para este estudio se siguió el protocolo descrito por Borchers y colaboradores (1997) con modificaciones. Brevemente, una suspensión de linfocitos se sembró sobre una monocapa de células RK-13 en una relación 1:2 linfocito/célula (Borchers *et al.*, 1997). Previa incubación durante 1h a 37°C, se cubrió cuidadosamente la monocapa con medio de mantenimiento y se incubó a 37°C durante 7 días hasta la aparición de ECP.

A los co-cultivos que no presentaron ECP se les realizó hasta 4 pasajes ciegos de 7 días cada uno. Cada pasaje ciego consistió en 3 ciclos de congelado y descongelado como se describió en el punto anterior. Se consideró negativa a la muestra que no presentó ECP después del 4^{to} pasaje.

9- Identificación del agente viral

9.1- Inmunofluorescencia indirecta

En aquellos cultivos que presentaron entre un 70-80% de ECP, las células se tripsinaron y se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en PBS, y 10 µl de esta suspensión celular se sembró por cuadruplicado en un portaobjetos para su observación por inmunofluorescencia. Luego del secado, el portaobjetos se fijó en acetona durante 15 min. a -20° C y previo lavado con agua destilada y PBS, se añadió un antisuero policlonal específico para HVE-2 producido en conejo (341 EDV 8301, NVSL Ames -Iowa), y se incubó a 37° C durante 1 h en cámara húmeda. La reacción Ag-Ac se reveló mediante la utilización de un antisuero producido en cabra, anti conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (KPL). Como control positivo se utilizó un cultivo en monocapa de células RK-13 infectado con la cepa de referencia LK.

9.2- Microscopía electrónica.

Para este estudio se seleccionaron las monocapas de células que presentaron ECP. Las mismas fueron expuestas a tres ciclos de congelado y descongelado, y sonicadas en un SONICATOR XL (Hert System) durante 30 seg de manera de asegurar la ruptura total de la membrana celular. Posteriormente, se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 3000 x g durante 10 min. y se concentraron las

partículas virales por centrifugación a 14000 x g durante 1h y 30 min. El pellet resultante se resuspendió en 20 µl de PBS y se tiñó con ácido fosfotúngstico al 2%.

El material se observó en el microscopio electrónico Jeol 1200 EX II cpm, con magnificaciones de 50.000 y 100.000 aumentos electrónicos.

9.3- Curva de crecimiento viral

Microplacas de 24 pocillos conteniendo células RK-13 se infectaron con un stock del virus aislado por duplicado, con una multiplicidad de infección (mi) de 1 UFP/ célula. Luego de 1 h de adsorción a 37°C se descartó el inóculo y se lavaron las monocapas con MEM-D sin SFB. Finalmente, las células se cubrieron con 1 ml de medio de mantenimiento y cada 24 horas, durante un período de 7 días, se cosechó el sobrenadante y las células por separado. Cada alícuota cosechada se guardó a -70° C hasta su utilización.

Previa titulación, las alícuotas conteniendo la fracción celular, fueron sonicadas durante 15 segundos con el fin de liberar el virus intracelular. Todas las fracciones fueron tituladas por el método de UFP.

10- Amplificación del stock viral

Para este fin, células RK-13 crecidas en placas de petri de 145 cm² (Nunc™) se infectaron con una dilución 1:4 de las diferentes cepas de referencia, descritas en el punto 4 de esta misma sección. El inóculo se dejó adsorber a 37° C durante 1 hora

con agitación cada 10 minutos, luego se lavaron las monocapas con PBS y se cubrieron con 20 ml de medio de mantenimiento. Las placas se incubaron a 37° C hasta producirse la visualización de ECP. Al cabo de este tiempo, con el fin de amplificar el virus, se realizó un pasaje 1:2 de cada placa. Cuando el ECP alcanzó el 100% se cosechó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos para bajar los restos celulares. Finalmente se realizó un pool de los sobrenadantes (volumen final: 200 ml), y se los almacenó a -70° C hasta su utilización.

11- Semipurificación viral

Los sobrenadantes descritos en el punto anterior se sembraron sobre colchón de sacarosa al 30%, y se centrifugaron durante 1 h 30 min a 24000 x g. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y con el fin de resuspender el pellet, se agregaron 100µl de ADN buffer (10mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂; 200 mM Tris pH: 7,4) y se guardaron a 4°C durante 20 horas.

12- Extracción del ADN viral

Los pellets resuspendidos como se describió en el punto anterior, se trasvasaron a un nuevo tubo. Para eliminar los restos de ácido nucleico celular contaminante, se trató con 5 µl de ARNasa (10 mg/ ml) y 5 µl de ADNasa I (2mg/360 µl),

incubándose a 37°C durante 1 hora. Finalizado este tiempo, se inactivaron las enzimas y se degradaron las partículas virales mediante el agregado de 250 µl de EDTA (0,2 M), 10 µl de SDS (10%) y 100 µl Proteinasa K (10 mg/ ml), incubándose a 37° C durante toda la noche.

13- Purificación del ADN viral

La purificación del ADN viral se realizó a partir del material obtenido en el punto anterior, mediante el uso de columnas con resina de intercambio aniónico, Genomic-tip 20/G. (QIAGEN).

Brevemente, se agregó 1 ml del buffer de equilibrio (QBT) (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% etanol, 0,15% Triton X-100, pH 7) al tubo conteniendo el ADN viral y se sembró la columna. Posteriormente se lavó la resina con buffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% etanol, pH 7) y se eluyó el ADN con 2 ml de buffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% etanol, pH 8,5), recolectándose en alícuotas de 1 ml. Finalmente, se agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se centriugó a 10000 rpm durante 15 minutos. El pellet resultante se lavó con etanol frío al 70% y luego del secado, se lo resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

14- Análisis de restricción

El ADN viral obtenido en el punto anterior, se digirió con las enzimas de restricción *Hind. III* y *Eco RI* a 37°C durante toda la noche, en un volumen final de 40 µl. En este volumen reaccionaron 6 µl de ADN (100 a 200 ng, aproximadamente) con 10 U de la enzima, en buffer adecuado.

La restricción enzimática fue analizada en un gel de agarosa al 1% en solución TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA), teñido con bromuro de etidio.

15- Southern Blot

Los fragmentos generados por la restricción enzimática fueron corridos en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (0,1 M ácido bórico; 0,1 M Tris-HCl pH 8,2; 2 mM EDTA). Con el fin de fragmentar el ADN se incubó durante 20 min con una solución de HCl (0,25 M), mientras que la desnaturalización del material genético se realizó mediante el uso de una solución de NaOH (0,4 N)- NaCl (0,6 M) que posteriormente fue neutralizada con una solución de NaCl (1,5 M)-Tris HCl (0,5 M), pH 7,5.

La transferencia a una membrana de nylon (Gene Screen PLUS (NEN DuPont)) se realizó por capilaridad durante toda la noche en una solución SSC 10X. Al cabo de este tiempo, se realizaron los lavados correspondientes con NaOH (0,4 N) y SSC 2X (17,53 g/l NaCl, 8,82 g/l citrato de sodio, pH 7) y se bloqueó a 42°C durante 1 h

con una solución de hibridación (SSC 6X; 0,5% SDS; 100 µg/ml ADN de esperma de salmón; 50% formamida).

Como sonda se utilizó ADN genómico completo de HVE-2 marcado con dioxigenina (50 ng/ml), para lo cual se utilizó el kit *DIG DNA Labeling and Detection* (Boehringer Mannheim). La sonda fue calentada durante 5 min. a 100°C, y enfriada en hielo rápidamente para su desnaturalización. Finalmente, la membrana fue hibridada a 42° C durante 20 horas y el revelado colorimétrico se realizó mediante el uso de los sustratos NBT y BCIP (Boehringer Mannheim), según las recomendaciones del fabricante.

16- Extracción de linfocitos

Se extrajeron muestras de 10 ml de sangre con anticoagulante (EDTA al 0,2 M) y se diluyeron 1:2 con NaCl 0,9%. Se tomaron 10 ml de esta dilución, se sembraron por duplicado en tubos cónicos de 15 ml en una proporción 2 a 1 sobre un colchón de lynchoprep™ (NYCOMED) y se centrifugaron a 2000 x g durante 15 min. a 20°C para favorecer la separación de los linfocitos. Finalizada esta etapa, se cosecharon conjuntamente las bandas blanquecinas de los tubos duplicados y se realizaron dos lavados con NaCl al 0,9%. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de MEM-E.

Una parte de este material se almacenó a -70°C hasta el momento de su utilización.

17- Reacción en Cadena de la Polimerasa

17.1- Extracción del ADN

Las muestras de hisopado nasal y linfocitos, descritas en el punto 2.2 y 16 respectivamente, fueron descongeladas y centrifugadas a 14000 rpm durante 30 minutos. Una vez descartados los sobrenadantes, se les agregó a los pellets resultantes 50 µl de buffer de digestión (50 mM Tris pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,5% Tween 20) y 1,5 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Luego de un período de incubación a 56° C durante 3 horas, se calentaron a 95° C durante 15 minutos con el fin de desnaturalizar la enzima. Los sobrenadantes resultantes se congelaron a -20° C hasta el momento de su utilización.

17.2- Cuantificación del ADN extraído de linfocitos, por espectrofotómetro

Para calcular la cantidad de ADN extraído de los linfocitos, para ser utilizado en la PCR, se cuantificó su concentración mediante el uso de espectrofotómetro. Una vez extraído el ADN se realizó una dilución 1/50 del mismo en H₂O_d y se midió su absorbancia a 260 nm. El valor de la concentración se calculó mediante la utilización de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml} = \text{Abs}_{260} \times k$$

Donde ($k = 2500$) es una constante que contempla el factor de dilución y el factor de conversión, de manera de expresar la concentración final en $\mu\text{g/ml}$

17.3- Primers y ciclado utilizados

Con el fin de detectar la presencia de HVE-2 con una alta especificidad y sensibilidad, se utilizó la técnica de PCR anidada descrita por Borchers y col, 1997, con modificaciones. Mediante el uso de esta técnica se amplificó una secuencia ubicada río arriba (región 5' no codificante) del marco de lectura abierto **E10 (ORF E10)** que codifica para un producto homólogo a la interleuquina 10 equina (IL-10). Dicho marco de lectura se encuentra presente en el fragmento N-*Eco* RI del genoma viral.

Los primers utilizados se describen en la Tabla 1.

<i>Primer</i>	<i>Posición</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Largo del producto</i>
HVE-2 (P1)	externo	5'-GGCACTGAAACCCCATACTG-3'	1237 pb
HVE-2 (P2)	externo	5'-AAAACCATCCTGTCCAACCA-3'	
HVE-2 (P3)	interno	5'-CCACTAACCCCCAACCTT-3'	621 pb
HVE-2 (P4)	interno	5'-CCTCTATCCTCACAACAG-3'	

Tabla 1: Primers utilizados en la técnica de PCR anidada

17.4- PCR anidada

Durante la primera ronda de amplificación se utilizaron 0,2 mM dNTPs, 0,4 uM primers P1 y P2, 1,5U Taq Polimerasa (QIAGEN), ADN (10 µl) y MgCl₂ a una concentración final de 1,5 mM. En la segunda ronda se utilizaron 3 µl de ADN provenientes de la primera ronda, los primers P3 y P4, mientras que las concentraciones de los dNTPs, Taq Polimerasa y MgCl₂ permanecieron iguales.

Cada una de las rondas de amplificación consistió en 35 ciclos, conformados por 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 30 segundos de anillado a 60°C y 1 min de extensión a 72° C.

La presencia del producto final se analizó en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE teñido con bromuro de etidio.

Como control positivo de la reacción se utilizó la cepa T400 de HVE-2.

17.5- Identificación del producto final de la PCR anidada

Para confirmar la identidad del producto final de la PCR anidada (621 pb), se digirió al mismo con la enzima de restricción *Dra* I, la cual posee un sitio de corte generando dos fragmentos de aproximadamente 400 y 200 pb.

El volumen final de la reacción fue de 10 µl, en los que se incluyó agua destilada (5 µl), buffer específico (1 µl), la enzima (1 µl) y ADN correspondiente a la segunda ronda de la PCR (3 µl).

El volumen total de reacción se incubó a 37° C durante 3 hs y el resultado de la digestión parcial se observó sobre gel de agarosa al 2% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio.

18- PCR de β -actina

Para determinar la integridad del ADN extraído de las muestras de linfocitos se realizó una PCR de actina. Al igual que en el caso de la PCR anidada, la reacción se realizó en 50 μ l finales y para este volumen se utilizaron las mismas concentraciones finales de dNTP, MgCl₂ y enzima Taq polimerasa que las descritas en el punto 17.3 de esta misma sección. La concentración de ADN utilizada se calculó en base a la concentración de ADN presente en las muestras de linfocitos, calculada según se describe en el punto 17.2 de esta sección.

Para esta reacción se utilizaron los primers 5'GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC3' (cadena de superior) y 5'GCGCTCGTCGTCGACAACGG3' (cadena inferior), en una concentración final de 0,6 μ M.

La amplificación consistió en 40 ciclos, conformados por 1 min. de desnaturalización a 94°C, 1 min de anillado a 56°C y 1 min de extensión a 72°C.

19- Sensibilidad de la PCR anidada

Con el fin de determinar la sensibilidad de la técnica, se realizaron diluciones seriadas al décimo, en medio de transporte, a partir de un stock viral de la cepa T400 de título conocido ($2,1 \times 10^7$ UFP/ml). Cada una de las diluciones fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 30 min y tratadas con buffer de digestión y proteinasa K, como se detalla en el punto 17.1. Los sobrenadantes resultantes se utilizaron para la detección del agente viral, según la técnica descrita en el punto 17.3 de esta sección.

20- Técnica de clonado empleada

20.1- Plásmido utilizado

La ligación de los productos finales de la PCR anidada se realizó en el vector **pGEM-T Easy** (Promega). Este vector permite el clonado directo de los productos de PCR, ya que en ambos extremos 3' del sitio de inserción se le han adicionado timidinas (**figura 1**). La presencia del gen de resistencia a la ampicilina y el sitio de clonado del plásmido, que se encuentra dentro de la región codificante del α -péptido de la enzima β -galactosidasa, permite una selección rápida de los clones recombinantes.

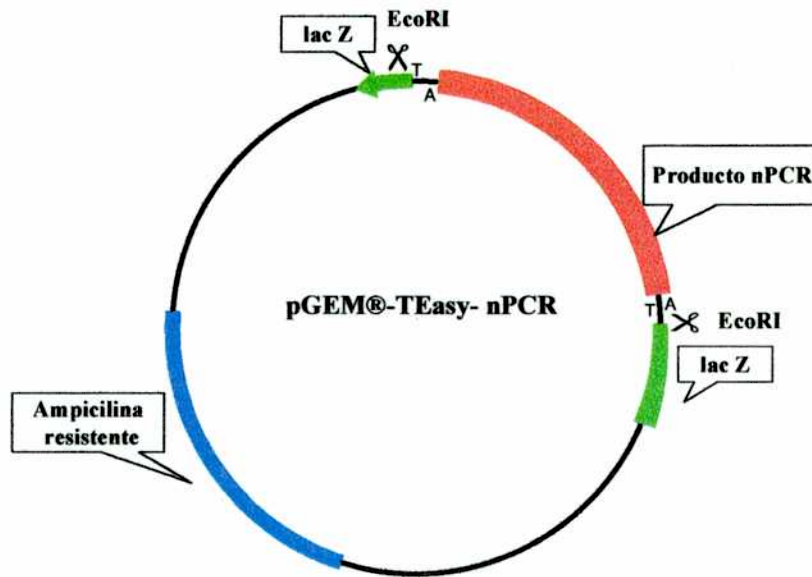


Figura 1: Ligación del producto de la PCR anidada en el vector pGEM-T Easy.

20.2- Ligación

Las ligaciones se realizaron a 4° C durante 20 hs en un volumen final de 10 µl donde reaccionaron: 5 µl de buffer de ligación (60 mM Tris pH 7,8; 20 mM Cl₂Mg; 20 mM ditiotreitól; 1 mM ATP; 10% polietilenglicol (PEG); 3 U T4 ADN Ligasa (Promega) y cantidades adecuadas de agua, inserto y vector, para cada caso.

20.3- Transformación

Para las transformaciones de *E. Coli* realizadas en este trabajo, se utilizaron bacterias de la cepa DH5α, las cuales fueron hechas competentes empleando el método de Cloruro de calcio (Sambrook *et al*, 1989).

Las bacterias competentes fueron transformadas con los distintos productos de ligación utilizando el método de shock térmico. Para ello, se incubaron en hielo 50 μ l de las bacterias competentes (10^8 bacterias transformantes / μ g de ADN súper enrollado) con 5 μ l de la reacción de ligación durante 30 min. Posteriormente, se incubó la reacción en un baño de agua a 42° C durante 90 seg y se enfrió en hielo durante 2 min.

Las bacterias transformadas se recuperaron en 200 μ l de medio líquido YT (bacto-triptona 8gr /l, bacto extracto de levadura 5 gr /l, NaCl 5 gr /l, pH 7) durante 1 hora a 37° C, con agitación y se sembraron en placas de Petri con medio YT agar (YT con 15 gr /l bactoagar), suplementadas con IPTG (0,5 mM), X-Gal (80 μ g /ml) y ampicilina (50 μ g /ml). Las placas se incubaron a 37° C durante toda la noche.

20.4- Selección de clones

La presencia del inserto en el vector se evidenció a través de la presencia de colonias blancas. Se seleccionaron algunas de estas colonias y se crecieron en 3 ml de medio YT con ampicilina a 37° C durante toda la noche con agitación constante.

21- Caracterización de los clones positivos

21.1- Extracción de ADN plasmídico

A partir de los cultivos crecidos se realizaron mini preparaciones de ADN plasmídico, empleando el método de lisis por hervido. Para ello, se centrifugó 1 ml del cultivo a 10000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. El pellet resultante se resuspendió en 400 µl de una solución STET-Sacarosa (8% sacarosa, 5% Tritón X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 50 mM EDTA, pH 8) con el agregado de lisozima (1ug /ml). Se hirvió durante 1 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó mediante el agregado de un volumen igual de isopropanol y centrifugación a 10000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El pellet de ADN se secó por centrifugación en vacío y se resuspendió en 20 µl de solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

21.2- Mapeo por restricción

La confirmación de la presencia del inserto en el vector recombinante se realizó digiriendo los ADN obtenidos con la enzima *Eco RI*. Para ello, las digestiones enzimáticas se realizaron a 37° C durante toda la noche, en un volumen final de 10µl donde se hicieron reaccionar 4 µl de ADN de la mini preparación con 5 U de la enzima en buffer adecuado.

La reacción enzimática fue analizada en un gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) teñido con bromuro de etidio.

El tamaño esperado del inserto se confirmó mediante la comparación con un marcador de peso molecular.

21.3- Purificación de ADN plasmídico

La purificación del ADN plasmídico se realizó mediante el uso del kit Wizard Plus SV minipreps (Promega). Brevemente, 2 ml del crecimiento bacteriano se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. El pellet resultante se resuspendió con 250 μ l de la solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 μ g/ml ARNasa A). Posteriormente, se agregaron 250 μ l de una solución de lisis (0,2 M NaOH; 1% SDS) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.

Con el fin de inactivar endonucleasas liberadas durante la lisis, se agregaron 10 μ l de una solución de proteasa alcalina y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 350 μ l de una solución de neutralización (1,32 M acetato de potasio pH 4,8) y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante, conteniendo el DNA plasmídico, se sembró en las columnas de purificación, se realizaron dos lavados con la solución correspondiente (80 mM acetato de potasio; 8,3 mM Tris-HCl pH 7,5; 40 μ M EDTA; 55% etanol 95%), se eluyó el ADN con 50 μ l de agua libre de nucleasas y se guardó a -20° C hasta el momento de su utilización.

22- Secuenciación

Los productos clonados y purificados se secuenciaron automáticamente en un *ABI PRISM 377 DNA Sequencer*.

Para este fin se utilizaron los primers P3 y P4 (descritos en el punto 17.3) y se utilizó un programa de amplificación que constó en 45 ciclos, con el siguiente esquema: desnaturalización a 94° C durante 10 seg, anillado a 50° C durante 15 seg y extensión a 64° C durante 45 seg.

23- Análisis de las secuencias

La compaginación de las secuencias así como los alineamientos primarios se hicieron con el programa CLUSTAL W (Multiple Sequence Alignment Program) dentro del programa BIOEDIT v5.0.9 (c) Tom Hall, North Carolina State University, 1997 – 2001.

24- Análisis Filogenético

Para la creación del árbol basado en la secuencia de aminoácidos de la IL-10, presente en la sección Introducción, se utilizó el método de distancia. El análisis se realizó con el programa NEIGHBOR del paquete de programas PHYLIP© (Phylogeny Inference Package) versión 3.5c © (Joseph Felsenstein and the

University of Washington, 1993), que utiliza el método Neighbour- Joining para calcular el mejor árbol, utilizándose los parámetros por defecto excepto por la entrada en orden al azar de las secuencias. Para la generación de las matrices de distancias se utilizó el algoritmo de Kimura (1980) del programa DNADIST, con una tasa de transición/ transversión de 2.

Para la creación del árbol basado en la secuencia de nucleótidos repetitiva ubicada en la región 5' flanqueante del gen que codifica para la IL-10 viral, se utilizó el programa PAUP 4.0b10 para Windows. La metodología de búsqueda de árboles de máxima parsimonia fue el "branch-and-bound" (método exhaustivo), donde se consideraron las deleciones como nuevo estado y otorgó a los indels (inserciones/deleciones) igual peso que al resto de los cambios.

25- Secuencias regulatorias de la transcripción

La búsqueda de secuencias regulatorias de la transcripción en las secuencias de interés se realizó mediante el programa Signal Scan 4.0 (Prestridge, 1996), que utiliza el programa SIGSCAN Versión 4.05. Se utilizaron como parámetros de búsqueda secuencias presentes tanto en mamíferos como en virus.

26- Análisis estadístico

Los porcentajes de animales con excreción viral en secreción nasal, presentes en los distintos grupos estudiados, se analizaron mediante el Test de comparación de proporciones exacto de Fisher, presente en el programa STATISTIX (analytical software, Tallahassee-USA). Los títulos de los sueros en animales mayores y menores de 1 año con y sin sintomatología respiratoria se analizaron mediante un ANOVA de dos factores (edad y síntomas), realizando comparaciones planeadas a posteriori, con el programa STATISTICA (Copyright[©].StatSoft, Inc. 1993).

Para todos los casos se fijó el nivel de significancia en un 5%.



RESULTADOS

CAPITULO I: DETERMINACION DE LA CIRCULACIÓN DEL HVE-2 EN LA ARGENTINA.

1- Prevalencia serológica del HVE-2 en equinos deportivos.

Con el objetivo de estudiar la circulación de HVE-2 en nuestro país, se tomaron muestras de suero a partir de 153 equinos deportivos SPC de la Provincia de Buenos Aires, cuyas edades oscilaban entre los 5 meses y los 2 años. Las muestras fueron analizadas por la técnica de neutralización viral, descrita en el punto 7 de la sección materiales y métodos.

Teniendo en cuenta la falta de neutralización cruzada entre el HVE-2 y el resto de los herpesvirus equinos, dicha técnica permitió detectar en forma específica la presencia de Acs contra HVE-2. Como se muestra en la figura 1, se determinó que 123/153 animales eran seropositivos, alcanzándose de este modo un porcentaje de seroprevalencia del 80,5% en la población muestreada.

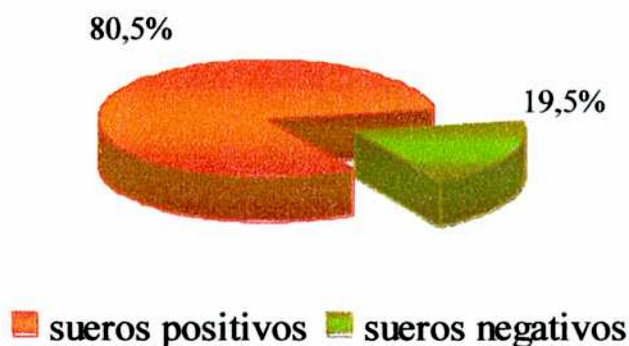


Figura 1: Porcentaje de animales seropositivos para HVE-2

2- Aislamiento viral

A partir de la alta prevalencia serológica detectada se planteó en segunda instancia, la necesidad de lograr el aislamiento del virus. Para ello, se seleccionaron muestras de HN almacenadas en el laboratorio de diagnóstico del Instituto de Virología del INTA, Castelar. Dichas muestras, provenientes de animales con sintomatología respiratoria, presentaban como característica común el haber resultado negativas para los virus respiratorios comúnmente analizados en la rutina de diagnóstico del laboratorio.

El aislamiento en cultivo celular se realizó según lo descrito en el punto 8.1 de la sección materiales y métodos.

Solo 2 de las 22 muestras analizadas, pertenecientes a dos equinos de 6 meses de edad, presentaron alteraciones de la monocapa durante el 3^{er} y 4^{to} pasaje ciego evidenciándose la presencia de un agente viral de crecimiento lento.

El ECP presente en las monocapas fue similar para ambos casos, presentando algunos de los efectos típicos descritos para otros herpesvirus, como redondeamiento celular y aparición de sincicios. Sin embargo, también se observaron otras alteraciones como la formación de grandes agregados de células con una aparente fusión parcial de sus membranas. En estas estructuras se destacaron límites bien definidos y predominio de vacuolización en su interior. Cabe destacar que a diferencia de otros herpesvirus, la disrupción de la monocapa fue parcial ya que pequeñas porciones de la misma aparecieron intactas (**Figura 2**).

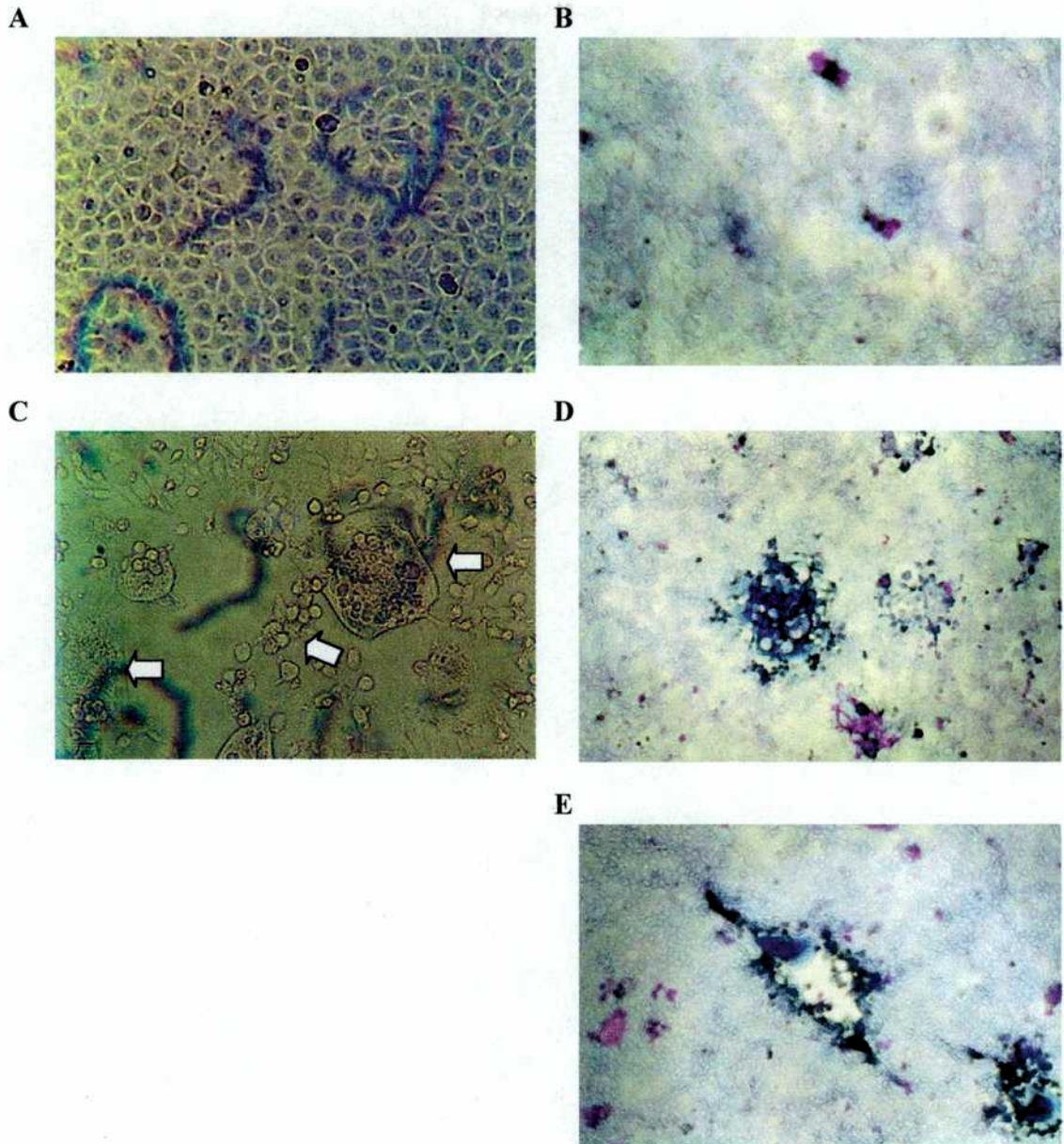


Figura 2: Efecto citopático de los aislamientos sobre monocapas de células RK-13 cubiertas con: (A y C) MEM D y 5% SFB, (B, D y E) metil celulosa y teñidos con giemsa.

Las figuras A y C muestran una monocapa control y el efecto citopático de uno de los aislamientos virales observado luego del 3^{er} pasaje ciego, respectivamente. Las flechas blancas muestran la presencia de sincicio, redondeamiento celular característico y agregado de células con vacuolización (aumento 400x). En las figuras B, D se observa la morfología de una monocapa control y una placa de lisis generada por el mismo aislamiento sobre un cultivo de células cubierto con metil celulosa y teñido con giemsa. En E se muestra la morfología de una placa de lisis producida por la cepa de referencia LK (aumento 100x).

3- Caracterización del agente viral aislado

3.1- Curva de crecimiento

Dada la lenta aparición de ECP observada durante el aislamiento en cultivo, se estudió el comportamiento del agente viral a través de una curva de crecimiento.

Como se muestra en la **figura 3**, en las curvas obtenidas se evidencia una importante asociación del virus a la célula. Se puede observar que a partir de las 24 hpi el título de la fracción celular comienza a aumentar respecto al del sobrenadante, alcanzándose una diferencia de 2 y 1 logaritmos entre las 48 y 72 hpi e igualándose a tiempos más tardíos.

Tanto en el sobrenadante como en la fracción celular, el título máximo se alcanzó alrededor de las 72 hpi y el mismo se mantuvo relativamente constante hasta el final de la experiencia. Cabe destacar que hasta las 168 hpi el ECP observado sobre la monocapa celular no alcanzó el 100%, ya que algunas porciones de la misma permanecían intactas.

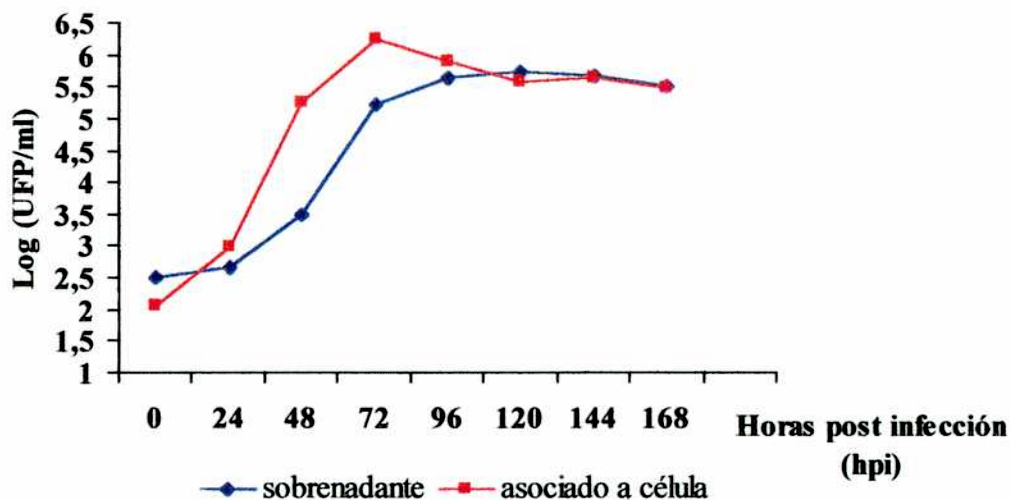


Figura 3: Curva de crecimiento del virus aislado en cultivo celular.

Monocapas de RK-13 se infectaron con una m.i de 1 UFP/cel. A los tiempos indicados (hpi) se recolectaron los sobrenadantes y las fracciones celulares. El título viral de cada fracción se obtuvo mediante la técnica de UFP.

3.2- Inmunofluorescencia indirecta

Con el fin de identificar el agente viral aislado, se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Esta técnica se realizó sobre las células de los cultivos afectados, una vez que el ECP observado alcanzó entre un 70% y un 80% de la monocapa celular.

En ambos aislamientos se observó la presencia de células fluorescentes de similar intensidad a la presentada por el control positivo (**Figura 4**).

3.3- Microscopía electrónica

La técnica de microscopía electrónica se utilizó con el objeto de analizar la morfología del agente viral aislado. Con tal fin, ambos aislamientos se trataron como se describe en el punto 9.2 de materiales y métodos.

La observación en el microscopio electrónico permitió detectar la presencia de partículas virales, cuya morfología coincidía con lo descrito para los herpesvirus en general. Particularmente, en la **figura 5** se observa la presencia de una nucleocápside con un diámetro aproximado a 100 nm, dimensión que concuerda con lo descrito por otros autores para los miembros de esta familia.

3.4- Análisis de restricción y southern blot

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que el agente presente en los aislamientos era HVE-2, se procedió a comparar el patrón de restricción de los mismos con el de cepas de referencia para HVE-2 y HVE-5, con el fin de descartar la presencia de éste último virus en el material analizado. Para ello se purificó el ADN de los aislamientos y las cepas de referencia y se procedió según se describe en el punto 14 de materiales y métodos.

Como se observa en la **figura 6 (A)**, los perfiles de restricción de ambos aislamientos, generados con *Hind* III y con *Eco* RI, fueron similares entre sí. Esto mismo se observó cuando se compararon dichos patrones con el de la cepa de referencia de HVE-2, H40. Sin embargo para el caso de LK, se observó un perfil

similar en el corte con *Hind* III, pero diferencial para *Eco* RI. Para T400, ambas enzimas presentaron diferencias en el patrón de corte respecto al de los aislamientos.

Por su parte, la cepa de referencia de HVE-5 (P48) presentó patrones de restricción claramente diferentes a los presentados por las distintas cepas de HVE-2.

La **figura 6 (B)** muestra el southern blot obtenido al hibridar los fragmentos generados con las enzimas de restricción, con una sonda de DNA total de HVE-2 marcado con dioxigenina. En la misma se puso de manifiesto la existencia de una hibridación clara con las tres cepas de referencia de HVE-2 y los aislamientos. Por el contrario, no se observa marca asociada con las calles correspondientes al HVE-5 y con el marcador de peso molecular.

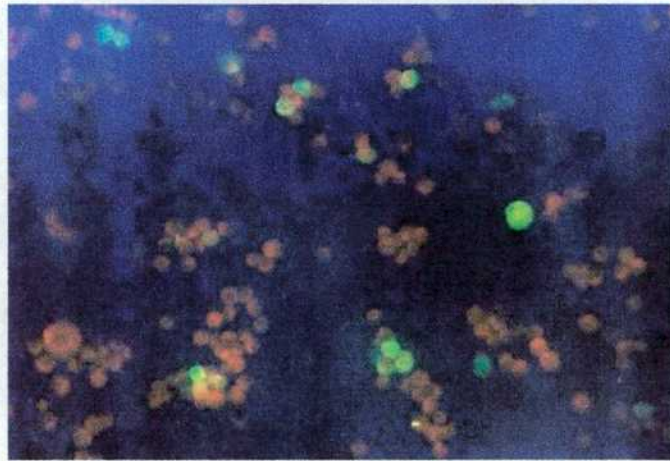


Figura 4: Inmunofluorescencia indirecta sobre aislamiento viral.

La reacción se realizó utilizando como 1^{er} Ac un suero policlonal contra HVE-2 hecho en conejo y se reveló mediante la utilización de un 2^{do} Ac conjugado con isotiocianato de fluoresceína producido en cabra. Las células positivas se observan en color verde fluorescentes y las negativas en color rojo.

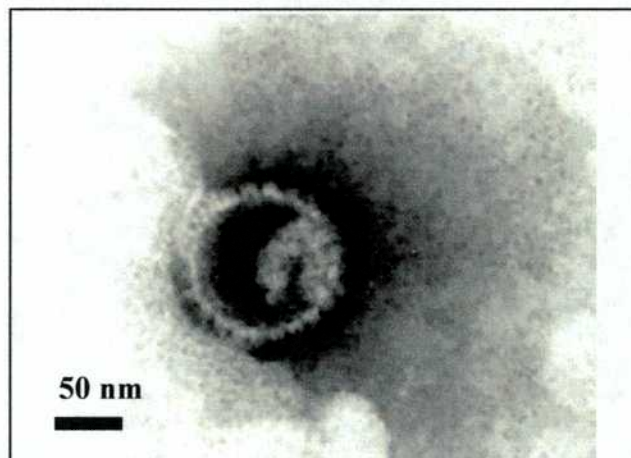


Figura 5: Microscopía electrónica del aislamiento .

La figura muestra la presencia de una partícula viral (cápside) con morfología y tamaño conforme a lo descrito para los herpesvirus. (aumentado 100.000 x)

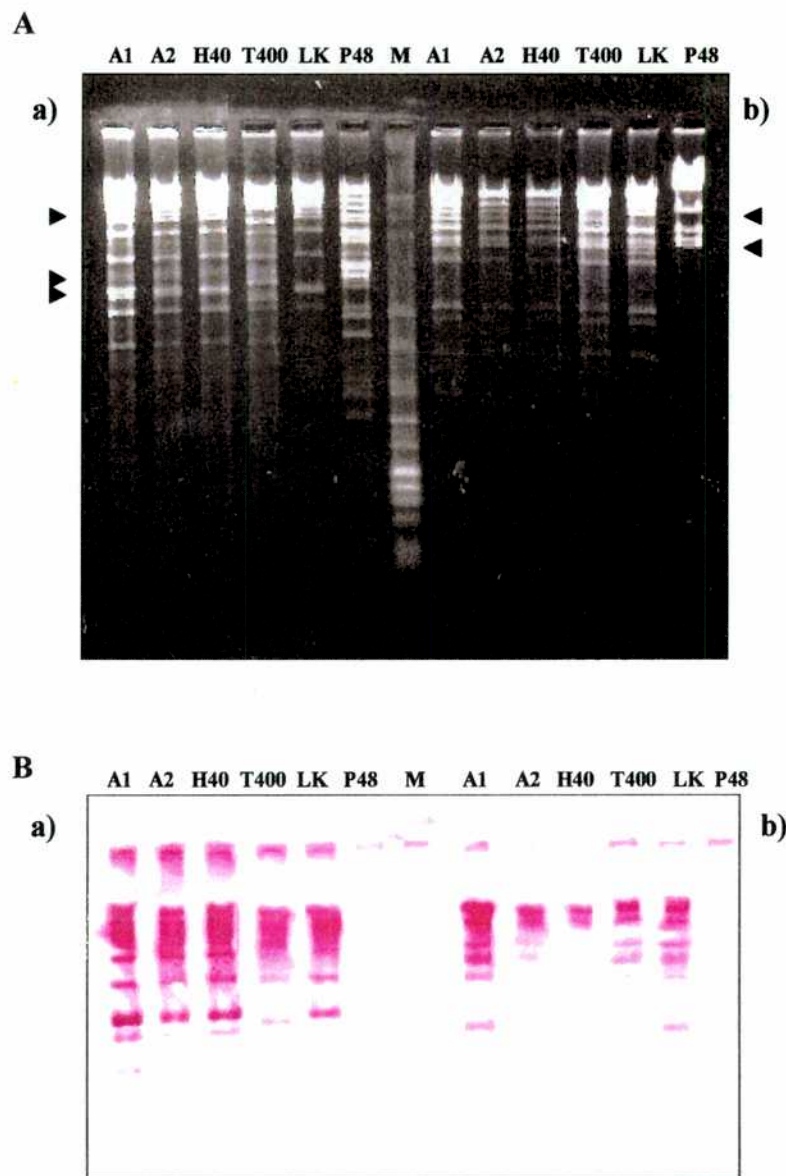


Figura 6: Ensayo de restricción (A) y southern blot (B) sobre los aislamientos y cepas de referencia para HVE-2 (H40, T400 y LK) y HVE-5 (P48).

Muestras de ADN proveniente de los aislamientos (A1 y A2) así como de las cepas de referencia H40, T400, LK y P48, fueron digeridas con Hind III (a) y Eco RI (b).

En **A** se muestran los patrones de restricción correspondientes a las distintas cepas virales utilizadas. Las flechas indican las posiciones donde se encuentran diferencias entre los aislamientos y las cepas de referencia de HVE-2. En **B** solo se observan los patrones de los ADN pertenecientes a HVE-2, que hibridaron con ADN total de HVE-2 marcado con dioxigenina, utilizado como sonda.

CAPITULO II: IMPORTANCIA DEL HVE-2 EN LA PATOLOGIA RESPIRATORIA DE LOS EQUINOS DEPORTIVOS.***1- Comparación entre las técnicas de aislamiento en cultivo y PCR anidada***

La existencia de un alto índice de animales seropositivos y la baja proporción de aislamientos logrados en cultivo celular, a partir de muestras de hisopado nasal descrita en el capítulo anterior, cuestionó fuertemente la eficacia de esta técnica para la detección de HVE-2. Para tratar de resolver este inconveniente, se planteó la necesidad de incorporar una técnica alternativa más sensible que permitiera detectar con mayor rapidez y eficacia el virus en las muestras a analizar, disminuyendo de este modo el número de probables falsos negativos.

Con este fin, se comparó la técnica de aislamiento en cultivo y la técnica de PCR anidada descrita por Borchers y colaboradores (1997). Para ello, y teniendo en cuenta que el linfocito B es uno de los sitios de latencia descritos para HVE-2, se tomaron muestras de sangre entera de dos animales seropositivos (E1 y E2) con un título mayor a 1,1.

Para lograr el aislamiento del virus a partir de los linfocitos, se procedió según lo indicado en los puntos 16 y 8.2 de la sección materiales y métodos. Paralelamente, una alícuota de la suspensión de linfocitos se procesó según lo descrito en los puntos 17 y 18 de la misma sección. Previo ajuste de las condiciones de ciclado, se utilizó como control positivo ADN de la cepa de referencia T400 de HVE-2.

Ninguno de los dos co-cultivos de linfocitos presentaron ECP durante la primer semana, ni después de los tres pasajes ciegos realizados, sin embargo, la PCR anidada resultó positiva en ambos casos.

En ambas muestras (E1 y E2), se observó una banda de aproximadamente 600 pb, la cual coincidía con el producto final esperado de la PCR anidada específica para HVE-2 (**Figura 7 A**). Para confirmar la identidad de estas bandas, se realizó una digestión parcial de las mismas con la enzima *Dra I*. Esta enzima posee un sitio de corte en el producto final de la PCR, generando dos bandas de un tamaño aproximado de 400 y 200 pb.

El resultado de la digestión parcial del fragmento se muestra en la **figura 7 (B)**, donde se observa la presencia de las tres bandas (600, 400 y 200 pb), correspondientes al fragmento sin digerir y a los dos productos esperados de la digestión. De este modo se confirmó la presencia del HVE-2, en los linfocitos provenientes de los dos animales muestreados.

2- Análisis de la sensibilidad de la PCR anidada en muestras de hisopado nasal

En base a los resultados obtenidos en el punto anterior, se resolvió en adelante utilizar la PCR anidada para la detección de HVE-2. Para tal fin, se resolvió determinar la sensibilidad de esta técnica sobre muestras de HN. Para ello, se realizaron diluciones seriadas al décimo de un stock viral de título conocido. Las diluciones se realizaron tomando 50 µl del stock original diluido en el mismo medio

de transporte utilizado para la recolección de los hisopados nasales. Posteriormente, cada dilución fue tratada como se describe en los puntos 17.1 y 17.3 de la sección materiales y métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 8**, donde se observa la presencia del producto final de la PCR hasta la dilución 1/10.000.000 (-7) del stock viral original.

Teniendo en cuenta el volumen utilizado para la realización de la PCR, se determinó el límite de sensibilidad de la misma en 0,2 UFP.

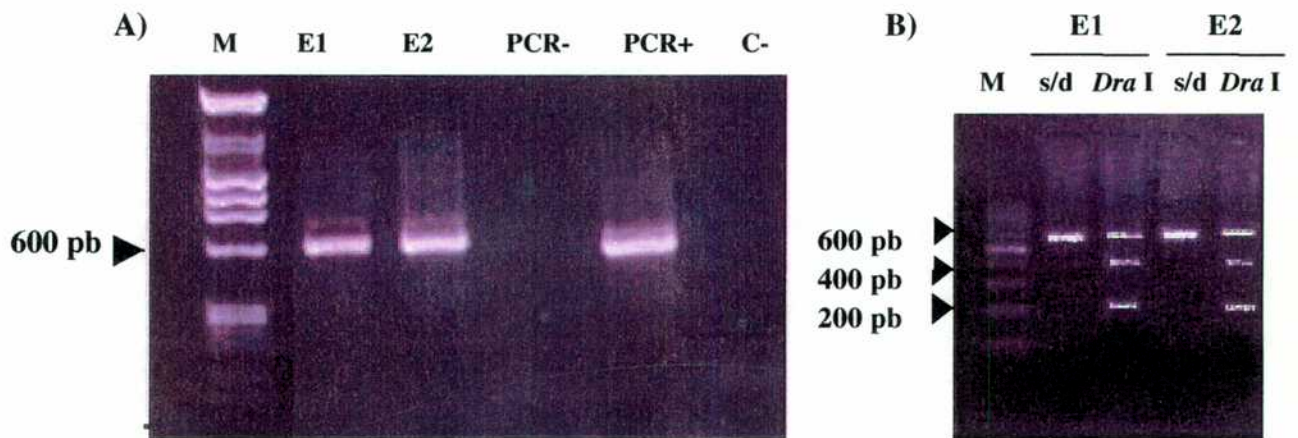


Figura 7: PCR anidada sobre linfocitos (A) y digestión parcial con la enzima de restricción *Dra* I (B).

A) Se observan 2 bandas de igual tamaño (621 pb) correspondientes al producto final de la PCR anidada, realizada sobre linfocitos de los equinos E1 y E2. Como marcador de peso molecular (M) se utilizó ϕ X-174 *Hae* III y λ -RF/*Hind* III. Como control positivo (PCR+) de la técnica se utilizó la cepa de referencia T400 de HVE-2. Los términos (PCR-) y (C-) indican los controles de PCR negativo y de extracción, respectivamente.

B) Se observa el producto final de la PCR anidada de E1 y E2 sin digerir (s/d) y digeridas parcialmente con *Dra* I. Como M se utilizó un marcador de 100 pb (Promega).

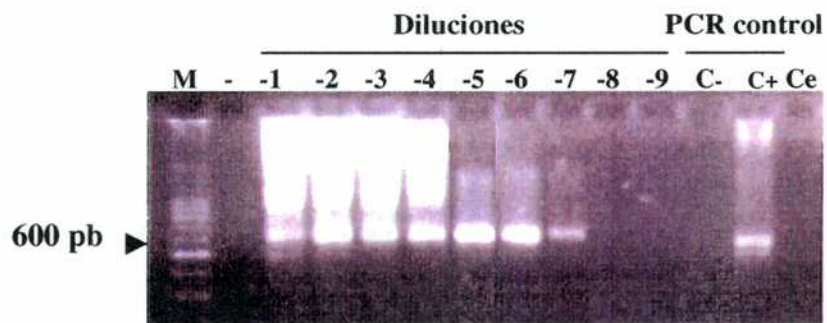


Figura 8: Sensibilidad de la PCR anidada.

Las calles identificadas como -1 a-9 indican las diluciones seriadas al décimo desde 1/10 hasta 1/10⁹, respectivamente. El producto final de la PCR (621 pb) se observa hasta la dilución 1/10⁷ (-7). Como control positivo (C+) se utilizó la cepa de referencia T400 de HVE-2. Los controles de la técnica C- y Ce corresponden al control negativo de la reacción y al control de extracción, respectivamente. La calle (M) corresponde al marcador de 100 pb (Promega).

3- Detección de HVE-2 en muestras de hisopado nasal (HN)

Muestras de HN provenientes de animales con sintomatología respiratoria, que previamente habían resultado negativas para los agentes virales comúnmente investigados en la rutina de diagnóstico, fueron analizadas por la técnica de PCR anidada con el objetivo de detectar la posible presencia de HVE-2.

Como se ilustra en la **figura 9**, de un total de 65 muestras analizadas 48 resultaron positivas para HVE-2 (74 %), mientras las 17 restantes fueron negativas (26%). De este modo, este resultado indicaría que el 74% de los animales muestreados se encontraba eliminando virus a través de su secreción nasal.

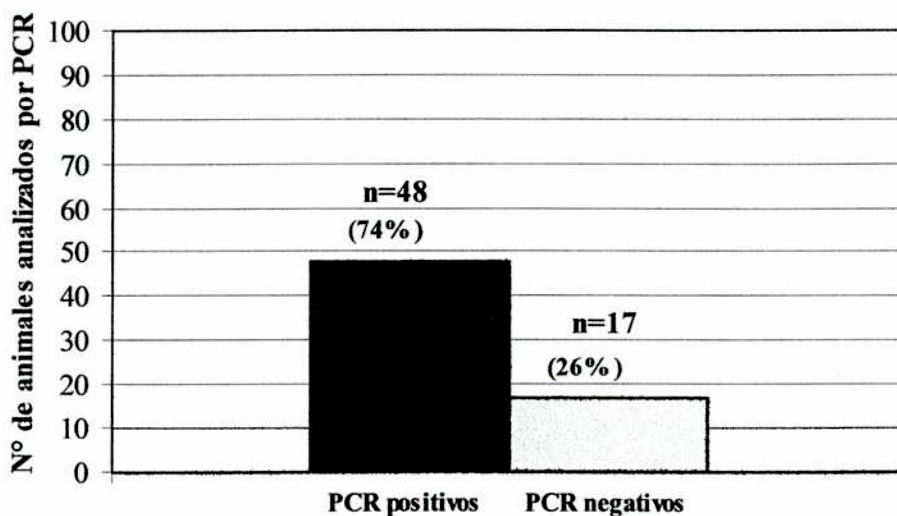


Figura 9: Porcentaje de animales con excreción viral

La figura muestra el número de animales con síntomas respiratorios positivos y negativos para HVE-2, analizados por la técnica de PCR anidada

4- Estudio de la relación entre presencia de HVE-2 y enfermedad respiratoria.

Teniendo en cuenta la presencia de HVE-2 en un importante número de HN provenientes de casos respiratorios, se decidió estudiar la relación entre la presencia de este agente y enfermedad respiratoria. Para ello, se tomaron muestras de suero e HN de 66 animales con sintomatología respiratoria y de 87 animales clínicamente sanos.

Considerando que a partir del año de edad el animal sufre cambios importantes en cuanto a su manejo, previo inicio de su vida deportiva (destete y separación de la madre, doma y ejercicios), se procuró que cada grupo, definido en base a la presencia o ausencia de sintomatología clínica, estuviera representado aproximadamente por la mitad de animales mayores y menores de 1 año de edad.

Paralelamente se determinó en todos los casos, el título de Acs neutralizantes mediante la técnica de neutralización viral, y se calculó el promedio del título para cada categoría de edad, tanto para el grupo clínicamente sano, como los que presentaban sintomatología respiratoria.

Al utilizar la técnica de PCR anidada para la detección de HVE-2 en las muestras de HN se observó que el porcentaje de animales con excreción viral fue significativamente mayor en el grupo de animales asintomáticos (80%), respecto al grupo de los animales clínicamente enfermos (51%) (**Tabla 1**).

Contrariamente, al analizar los promedios de los títulos de Acs neutralizantes para cada grupo, se observó que los animales asintomáticos poseían un título medio

significativamente menor (1,049) que la de los animales que presentaban sintomatología respiratoria (1,279) (Tabla 1).

	<i>Con síntomas resp.</i> (n=66)	<i>Asintomáticos</i> (n=87)
<i>Excreción (%)^a</i>	51	80 *
<i>Título medio de Acs^b</i>	1,279 ± 0.639 *	1,049 ± 0.658

Tabla 1: Porcentaje de excreción y título de Acs de animales con y sin sintomatología respiratoria.

^a Determinado por la técnica de PCR anidada

^b Determinado mediante la técnica de neutralización viral. El valor corresponde al promedio de los títulos de Acs neutralizantes de los equinos en cada grupo ± SD

* Indica *diferencias significativas* ($p < 0,05$).

Conforme a estos resultados, se procedió a analizar y relacionar la excreción viral y la media del título de Acs por separado en los animales mayores y menores de 1 año de edad. El objetivo de este análisis, fue determinar el comportamiento de la excreción y de la media del título de Acs para cada subgrupo etario, dentro de los grupos con y sin sintomatología respiratoria, y determinar la existencia de una posible correlación entre ambos parámetros.

Al analizar el porcentaje de animales con excreción viral para cada subgrupo etario, se observó que la proporción de animales positivos para HVE-2 era mayor dentro del grupo de animales asintomáticos. Los valores obtenidos fueron del 90% vs. 58% para los animales menores de 1 año, y 68% vs. 45%, para los mayores (Figura 10). El análisis estadístico de estas proporciones permitió determinar que la

proporción de animales asintomáticos menores de 1 año era significativamente ($p < 0,05$) mayor respecto al grupo de animales clínicamente enfermos de la misma edad. Por el contrario, la diferencia de excreción entre los animales mayores de 1 año no fue significativa ($p > 0,05$).

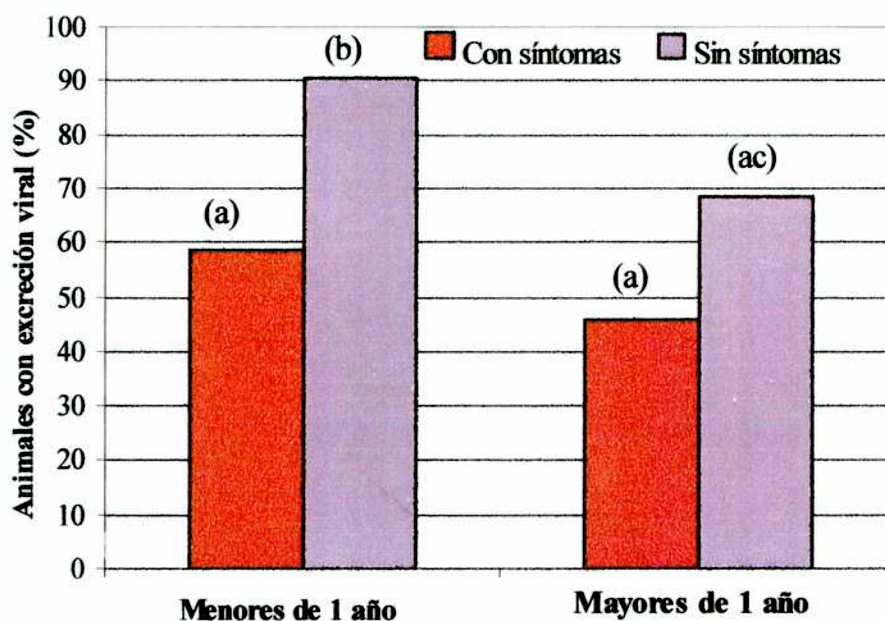


Figura 10: Porcentaje de animales menores y mayores de 1 año de edad, con excreción viral.

Mediante la técnica de PCR anidada se analizaron muestras de HN provenientes de animales con y sin sintomatología respiratoria. Cada barra representa la proporción de animales menores y mayores de 1 año de edad, con excreción viral.

Las letras sobre las barras indican la significancia entre las mismas según el Test de proporciones exacto de Fisher. Diferente letra indica *diferencia significativa* ($p < 0,05$).

Al calcular los títulos promedio de Acs entre los mismos subgrupos etarios, se observó que dichos valores eran superiores en los animales mayores de 1 año, siendo su valor levemente mayor en el caso de los animales con síntomas ($1,34 > 1,22$). Esto mismo se observó entre los animales menores de 1 año de edad, siendo la media de 1,19 para el grupo con síntomas y 0,85 para el sin síntomas (**Figura 11**).

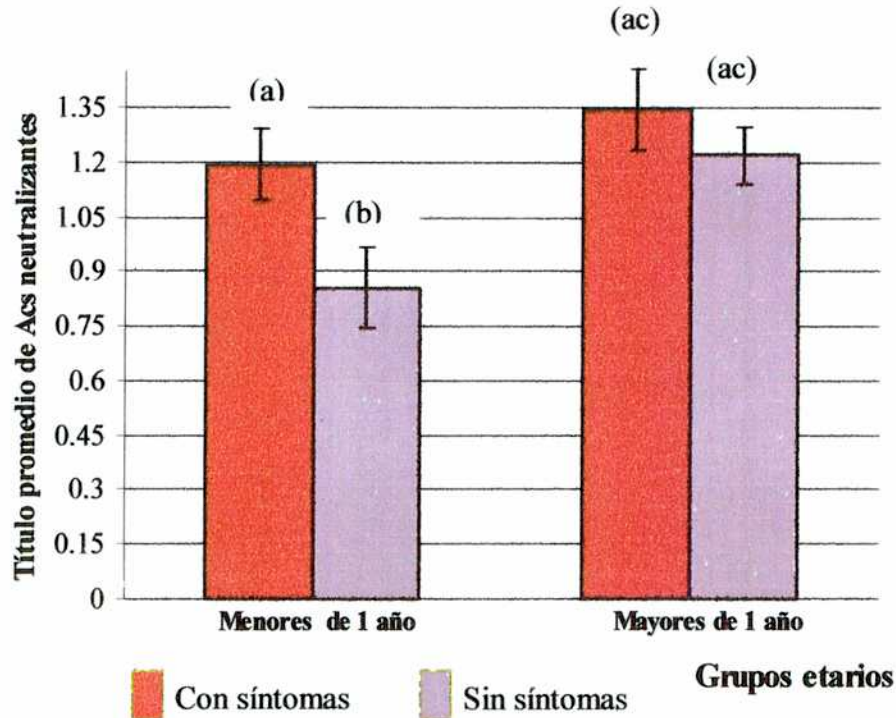


Figura 11: Título promedio de Acs neutralizantes en animales mayores y menores de 1 año de edad.

Muestras de suero provenientes de animales con y sin sintomatología respiratoria fueron analizados por la técnica de neutralización viral. Las barras muestran el título medio de los Acs neutralizantes para cada grupo. Las barras de error representan el error estándar (ES) en cada subgrupo etario analizado.

El análisis estadístico de estos valores permitió determinar que las medias de los títulos de Acs entre los animales mayores de 1 año no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$); sin embargo, la diferencia fue significativa ($p < 0,05$) cuando se compararon las medias de los animales menores de 1 año. También se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medias de los animales asintomáticos, mayores y menores de 1 año.

Cuando se analizaron en forma conjunta los resultados anteriores, se observó una cierta correlación inversa entre la excreción viral y el valor medio en el título de Acs. Este comportamiento inverso entre ambos parámetros permitió notar que cuanto mayor es el título promedio de Acs, menor es la proporción de animales que excreta

virus. Esta tendencia se observó tanto entre animales de una misma edad, como al comparar entre las diferentes edades en el grupo de animales asintomáticos.

CAPITULO III: ESTUDIO GENOMICO DE LAS CEPAS AISLADAS Y SU POSIBLE RELACION CON LA PATOGENICIDAD

1- Elección y análisis de la secuencia comprendida en el producto final de la PCR.

Conforme a la falta de correlación esperada, entre los resultados de expresión viral y presencia de sintomatología clínica, se decidió estudiar las cepas virales presentes en las secreción nasal, con el objetivo de determinar la presencia de diferencias genómicas con una posible implicancia en la patogenicidad. La secuencia seleccionada para este estudio corresponde al producto final de la PCR anidada descrita en el capítulo anterior. El fundamento de esta elección radica en que al estar ubicada hacia el extremo 5' de la proteína homóloga a la IL-10 (**Figura 12**), comprende una región potencialmente regulatoria de la expresión de este gen y contiene una secuencia motivo repetida en tándem, de funcionalidad desconocida y responsable de pequeñas diferencias en el tamaño del fragmento.

Para este estudio, se tomaron 4 muestras de hisopado nasal provenientes de animales clínicamente sanos y 4 de animales con sintomatología respiratoria, positivos para HVE-2. Previa obtención del fragmento de interés mediante la técnica de PCR descrita anteriormente, se clonaron los fragmentos según lo descrito en los puntos 20 y 21 de materiales y métodos.

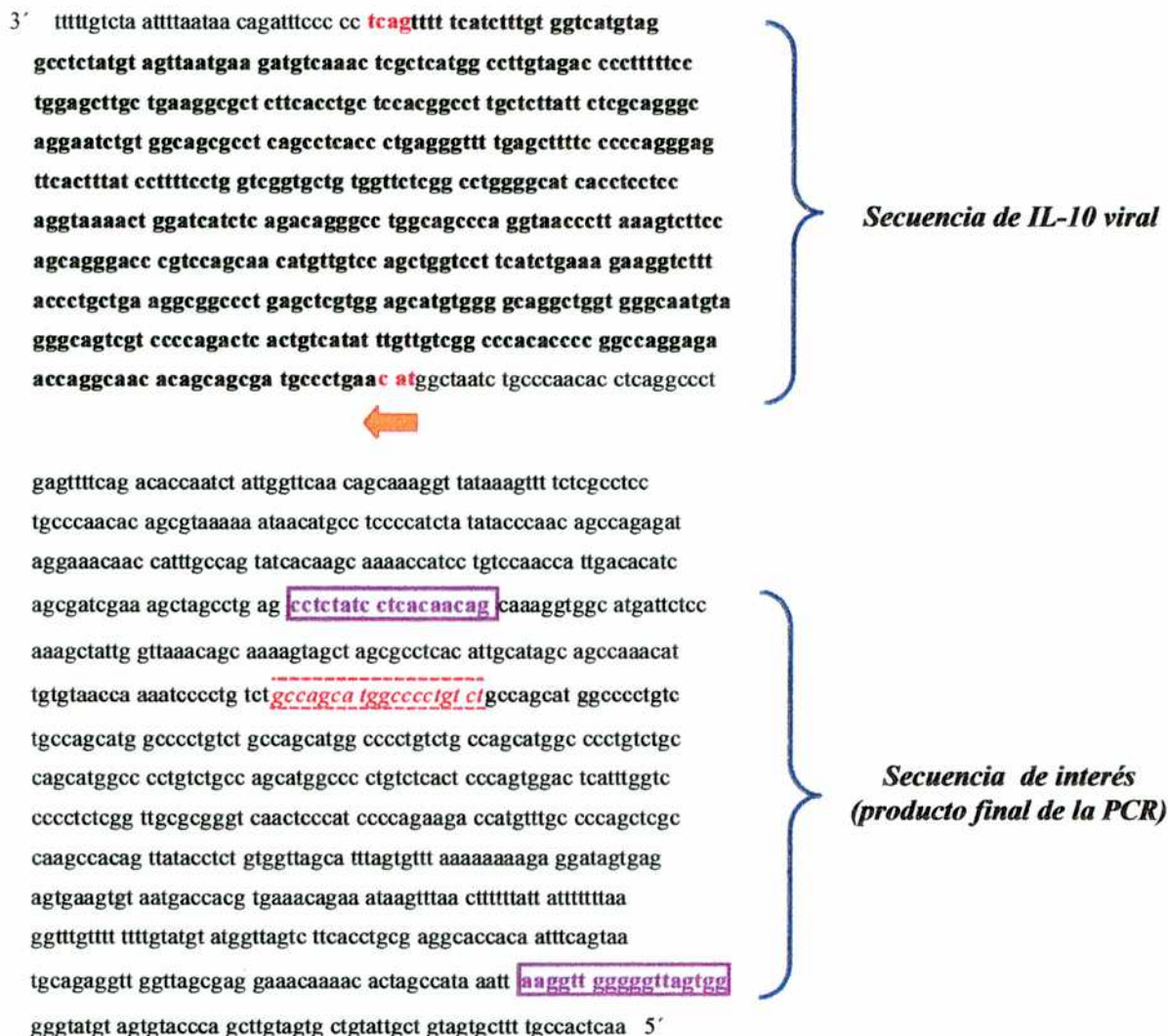


Figura 12: Localización de la secuencia de interés respecto a la IL-10v.

La figura muestra la posición (3' → 5') de la secuencia de interés respecto a la secuencia que codifica para la proteína homóloga a la IL-10. En esta última, se señalan (en rojo) el primer y último codón codificante.

En la secuencia de interés se encuentran recuadrados la posición de los cebadores utilizados en la PCR (□) y la secuencia repetitiva (□).

Luego de confirmada la presencia del fragmento de interés, se purificó el ADN plasmídico y una alícuota del mismo fue utilizada para su secuenciación (Figura 13).

	10 20 30 40 50 60
CS1.	AATTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCT-AAAA
CS2.	AATTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA
CS3.	AACTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA
CS4.	AATTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA
SS1.	AATCGTGGTG CCTCACAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA
SS2.	AATTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA
SS3.	AATTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA
SS4.	AATTGTGGTG CCTCGCAGGT GAAGACTAAC CATAACATACA AAAAA---CA AACCTTAAAA

	70 80 90 100 110 120
CS1.	AAAATAATAA AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TTACTCTTCA
CS2.	AAAATAATAN AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TTACTCTTCA
CS3.	AAA-TAATAA AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT CCACTCTTCA
CS4.	AAA-TAATAA AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TCACTCT-CA
SS1.	AAA-TAATAA AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TCACTCT-CA
SS2.	AAAATAATAA AAA-GTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TCACTCT-CA
SS3.	AAAATAATAA AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TCACTCTTCA
SS4.	AAAATAATAA AAAAGTTAAA CTTATTCTG TTTACGTGG TCATTACACT TCACTCT-CA

	130 140 150 160 170 180
CS1.	CTATCCTCTT TTTTAAAA-C ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
CS2.	CTATCCTCTT TTTTAAAA-C ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
CS3.	CTATCCTCTT TTCTTAAAAC ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
CS4.	CTATCCTCTT TTCTTAAAAC ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
SS1.	CTATCCTCTT TTTTAAAAC ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
SS2.	CTATCCTCTT TTTTAAAAC ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
SS3.	CTATCCTCTT TTCTTAAAAC ACTAA----- -ATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT
SS4.	CTATCCTCTT TTCTTAAAAC ACTAACACTA AATGCTAAC ACAGAGGGAT AACTGTGGCT

	190 200 210 220 230 240
CS1.	TGGCGAGCTG GGGCAAACAT GGTTTTCTGG GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGAGAGG
CS2.	TGGCGAGCTG GGACAAACAT GGTTTTCTGG GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGAGAGG
CS3.	TGGCGAGCTG GGGCAAACAT GGTTTTCTGG GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGACAGT
CS4.	TGGCGAGCTG GGGCAAACAT GGTTTTCTGG GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGACAGG
SS1.	TGGCGAGCTG GGGCAAACAT GGTTTTCTGG GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGACAGG
SS2.	TGGCGAGCTG GGGCAAACAT GGTTTTCTGG GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGACAGG
SS3.	TGGCGAGCTG GGACAAACAT GGTTTTCTGA GGATGGGAGT TGACCCGCGC AACCGAGAGG
SS4.	TGGCGAGCTG GGGCAAACAT GGTTTTCTGG GGATGAGAGT TGACCCGCGC AACCGACATG

	250 260 270 280 290 300
CS1.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGTGCCATG CTGGCAGACA GGTGCCATGC
CS2.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGTGCCATG CTGGCAGACA GGTGCCATGC
CS3.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGGGCCATG CTGGCAGACA GGGGCCATGC
CS4.	GGGACCAAAT GAGTCCGCTG GGAGTGAGAG AGGAGCCATG CTGGCAGACA GGGGCCATGC
SS1.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGGGCCATG CTGGCAGACA GGGGCCATGC
SS2.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGGGCCATG CTGGCAGACA GGGGCCATGC
SS3.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGGGCCATG CTGGCAGACA GGGGCCATGC
SS4.	GGGACCAAAT GAGTCCACTG GGAGTGAGAC AGGGGCCATG CTGGCAGGCA GGGGCCATGC

	310 320 330 340 350 360
CS1.	TGGCAGACAG GTGCCATGCT GGCAGACAGG TGCCATGCTG GCAGACAGGT GCCATGCTGG
CS2.	TGGCAGACAG GTGCCATGCT GGCAGACAGG TGCCATGCTG GCAGACAGGT GCCATGCTGG
CS3.	TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG GCCATGCTGG
CS4.	TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG GCCATGCTGG
SS1.	TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG GCCATGCTGG
SS2.	TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG GCCATGCTGG
SS3.	TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG GCCATGCTGG
SS4.	TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG GCCATGCTGG

	370 380 390 400 410 420
CS1.	CAGACAGGTG CCATGCTGGC AGACAGGTGC CATGCTGGCA GACAGGTGCC ATGCTGGCAG
CS2.	CAGACAGGTG CCATGCTGGC AGACAGGTGC CATGCTGGCA GACAGGTGCC ATGCTGGCAG
CS3.	CAGACAGGGG CCATGCTGGC AGACAGGGG-----
CS4.	CAGACAGGGG CCATGCTGGC AGACAGGGG-----
SS1.	CAGACAGGGG CCATGCTGGC AGACAGGGG CATGCTGGCA GACAGGGGCC ATGCTGGCAG
SS2.	CAGACAGGGG CCATGCTGGC AGACAGGGG CATGCTGGCA GACAGGGGCC ATGCTGGCAG
SS3.	CAGACAGGGG CCATGCTGGC AGACAGGGG CATGCTGGCA GACAGGGGCC ATGCTGGCAG
SS4.	CAGACAGGGG CCATGCTGGC AGACAGGGG CATGCTGGCA GACAGGGGCC ATGCTGGCAG

	430 440 450 460 470 480
CS1.	AC-----G
CS2.	ACAGGTGCCA TGCTGGCAGA CAGGTGCCAT GCTGGCAGAC AGGTGCCATG CTGGCAGACG
CS3.	-----ATTTT
CS4.	-----ATTTT
SS1.	ACAGGGG-----ATTTT
SS2.	AC-----A
SS3.	ACGGGG-----ATTTT
SS4.	ACAGGG-----ATTTT


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490      500      510      520      530      540
CS1.  GGTGCCATGC TGGCAGACAG GTGCCATGCT GGCAGACAGG TGCCATGCTG GCAGACAGGT
CS2.  GGTGCCATGC TGGCAGACAG GTGCCATGCT GGCAGACAGG TGCCATGCTG GCAGACAGGT
CS3.  GGTTACACAA TGTTTGGC-- -TGCTATGCA ATGTGA--GG CGCTAAAC-- ACCTTT-GCT
CS4.  GGTTACACAA TGTTTGGC-- -TGCTATGCA ATGTGA--GG CGCTAGAC-- ACTTTT-GCT
SS1.  GGTTTCACAA TGTTTGGC-- -TGCTATGCA ATGTGA--GG CGCTAGAC-- ACTTTT-GCT
SS2.  GGGGCCATGC TGGCAGACAG GGGCCATGCT GGCAGACAGG GGCCATGCTG GCAGACAGGG
SS3.  GGTTTCACAA TGTTTGGC-- -TGCTATGCA ATGTGA--GG CGCTAGAC-- ACTTTT-GCT
SS4.  GGTTACTCAA TGTTTGGC-- -TGCTATGCA ATGTGA--GG CGCTAGAC-- ACTTTTGGCT
.....|.....|
      550
CS1.  GCCATGCTGG C
CS2.  GCCATGCTGG C
CS3.  GTTTAACCAA T
CS4.  GTTTAACCAA T
SS1.  GTTTAAC-- -
SS2.  GCCATGCTGG C
SS3.  GTTTAACCAA T
SS4.  GTTTAACCAA T

```

Figura 13: Secuencia nucleotídica correspondiente al producto final de la PCR anidada.

Alineamiento de las secuencias del producto final de la PCR anidada, provenientes de animales con (CS 1-4) y sin (SS 1-4) síntomas respiratorios.

Al analizar las secuencias de las cepas detectadas en los animales con síntomas (CS) y sin síntomas (SS) respiratorios, se observó que las mismas poseían un patrón marcadamente conservado. Sin embargo, al analizar la zona repetitiva comprendida entre la posición 268 y 430 (**Figura 13**), se observaron diferencias tanto en la frecuencia de aparición de la unidad repetitiva como en su secuencia.

Al contabilizar el número de veces en el que aparecía la unidad repetitiva para cada una de las cepas, se observó que en los animales sin síntomas respiratorios (SS1/4) la frecuencia de repetición era de 8 o más veces. Sin embargo, esta misma secuencia aparecía repetida 6 veces en el caso de CS3 y CS4 y 12 y 15 veces en los casos de CS1 y CS2, respectivamente. En cuanto a la secuencia, se advirtió que, si bien en la mayoría aparece la unidad repetitiva “ACAGGGGCCATGCTGGC”, en CS1 y CS2 dicha secuencia presentaba una transversión en la posición 8, encontrándose una T en lugar de una G.

Finalmente, en la **figura 14** se muestra el resultado del análisis filogenético por el método de parsimonia, realizado en base a las diferencias observadas en las 8 secuencias analizadas. El objetivo de este análisis fue el de mostrar gráficamente mediante la topología, la separación entre las secuencias provenientes de los animales con y sin sintomatología clínica.

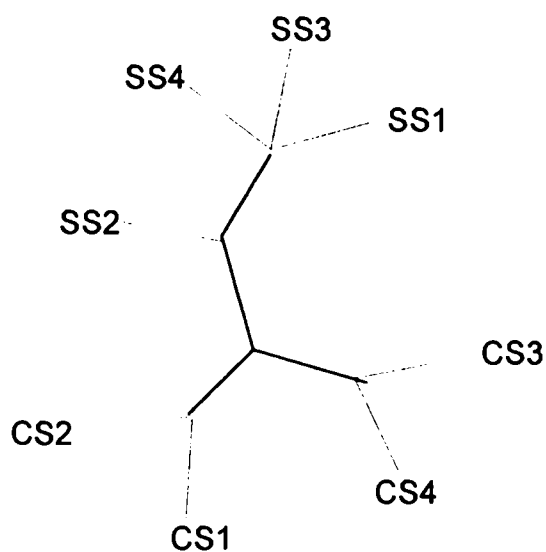


Figura 14: Árbol filogenético realizado por el método de parsimonia, basado en la zona de la secuencia repetitiva.

El árbol presenta una topología donde es posible diferenciar el grupo de animales con sintomatología respiratoria de los clínicamente sanos

2- Posibles secuencias regulatorias de la transcripción presentes en la región comprendida entre la posición 160 y 490 pb.

En base a las diferencias encontradas en la región de la zona repetitiva entre las cepas provenientes de animales con y sin sintomatología clínica, se decidió analizar la presencia de posibles secuencias regulatorias de la transcripción en dicha zona.

Para ello se seleccionó, para cada una de las secuencias, la zona determinada entre las posiciones 160 a 490 (Figura 13), que comprende la secuencia repetitiva de interés. Dicha secuencia se analizó con el programa *Signal Scan*, seleccionando como parámetro de búsqueda, secuencias regulatorias de la transcripción de mamíferos como virales (Tabla 2).

Sec regulatoria para el fac. de transcr..	Cepas							
	Con Síntomas				Sin Síntomas			
	CS1	CS2	CS3	CS4	SS1	SS2	SS3	SS4
<i>API</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>AP2</i>	1	1	1	1	1	1	-	2
<i>B enhancer (v)</i>	2	2	1	2	1	1	2	1
<i>CELF</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>GR</i>	3	3	1	1	1	1	2	1
<i>H4TF-2</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>LF-A1</i>	-	-	1	1	1	1	-	1
<i>NF-1</i>	13	14	8	6	9	13	9	9
<i>NF-1/L</i>	11	15	6	6	8	11	8	8
<i>NF-E</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pit-1</i>	2	2	2	1	1	1	1	1
<i>PTF1-beta</i>	1	1	1	1	1	1	1	-
<i>SPI</i>	-	-	6	5	8	12	8	8
<i>TC-II; L strand (v)</i>	3	3	3	3	3	3	2	3
<i>TBP</i>	2	2	2	2	2	1	2	2

Tabla 2: Secuencias regulatorias de la transcripción, presentes en la zona repetitiva.

La tabla muestra la lista de los factores de transcripción (descritos en mamíferos y en virus (v)) con una posible implicancia en la regulación de la expresión de la IL-10v, y el número de veces que aparece representada cada secuencia.

El resultado de la búsqueda se muestra en la tabla 2, donde se detallan las posibles secuencias regulatorias presentes y el número de veces en el que cada una de ellas aparece representada en la región analizada. Se observó que la mayoría de las posibles secuencias regulatorias, se encontraban presentes en todas las cepas analizadas y el número de veces en el que se encontraban representadas en cada cepa, era similar. Sin embargo, otras secuencias como las que corresponden a los factores de transcripción NF-1, NF-1/L y SP1, aparecieron representadas en forma más heterogénea.

Mientras las secuencias regulatorias para NF-1 y NF-1/L no presentaron un patrón diferencial de aparición entre las cepas provenientes de animales con y sin sintomatología clínica, SP1 mostró alguna diferencia. En las secuencias correspondientes a los animales con sintomatología respiratoria, esta secuencia se encontró ausente o repetida un menor número de veces respecto a las cepas aisladas de animales clínicamente sanos.

Cabe destacar que, esta misma diferencia aparece en dos cepas de referencia del HVE-2 (LK y 86/67) provenientes de animales con sintomatología clínica. En el caso de la cepa LK, la secuencia regulatoria para SP1 se encuentra ausente, mientras que para la cepa 86/67 aparece en una frecuencia menor a 8 (Borchers *et al.*, 1997).

También se pudo observar, la presencia de zonas que presentaron una alta homología con secuencias regulatorias de la transcripción presente en Polyomavirus.



DISCUSSION

El aislamiento de HVE-2 en distintos países de Europa, África, Asia, América del Norte y Oceanía, y los datos serológicos obtenidos mediante la utilización de diferentes técnicas indican la amplia distribución de este agente en la población equina del mundo (Kono y Kobayashi, 1964^a; Karpas, 1966; Thein, 1978; Kemeny y Pearson, 1970; Erasmus, 1970; Studdert, 1971; Turner y Studdert, 1970; Horner *et al*, 1976; Sherman *et al*, 1977). Sin embargo, no existían hasta el momento trabajos que reporten la presencia de este virus en la República Argentina. Este hecho, sumado a la gran proporción de casos de enfermedad respiratoria que permanecen sin diagnóstico etiológico, dio origen al presente trabajo.

Como primer objetivo nos propusimos a través de un estudio de seroprevalencia, determinar el grado de circulación de HVE-2 en una población de equinos SPC de nuestro país mediante el empleo de la técnica de neutralización viral. El fundamento para esta elección radica en que esta técnica no presenta reacción cruzada entre el HVE-2 y HVE-1, 3 y 4 (Plummer *et al*, 1973; Plummer y Waterson, 1963; Kemeny y Pearson, 1970; Studdert *et al*, 1970), y aunque el HVE-5 y el HVE-2 comparten determinantes antigénicos, esta técnica garantiza la identificación de Acs específicos contra HVE-2. En un estudio realizado por Agius y Studdert (1994^a), los antisueros contra HVE-2 y HVE-5 presentaron reacción cruzada en las técnicas de Elisa, western blot y radioinmunoensayo; por el contrario, la técnica de neutralización viral no presentó este inconveniente. De este modo, el empleo de esta técnica nos permitió detectar la presencia de Acs específicos contra HVE-2 y confirmar la existencia de una elevada seroprevalencia (80,5%) de este agente viral en la población incluída en este estudio (Figura 1).

Este resultado coincide con lo esperado, ya que como ocurre con la mayor parte de las infecciones producidas por herpesvirus, la seroprevalencia alcanza regularmente niveles altos en las poblaciones susceptibles. Según trabajos previos, los valores de seroprevalencia reportados para HVE-2 oscilan entre el 55% y el 100%, dependiendo de la raza del animal, la edad y la técnica serológica utilizada (Bagust *et al*, 1972; Mc Guire *et al*, 1974).

Los resultados aquí obtenidos sugieren que el HVE-2 se encuentra ampliamente distribuido en la población equina deportiva de la República Argentina, siendo ésta la primera comunicación sobre este tema en nuestra región.

El verdadero rol patogénico de este agente es controvertido debido a que existen trabajos que reportan su aislamiento a partir de animales clínicamente sanos, mientras que otros asocian su presencia con cuadros respiratorios, linfadenopatías, conjuntivitis, malestar general, anorexia y baja performance (Pálfi *et al*, 1978; Bélak *et al*, 1980; Browning y Studdert, 1988; Kemeny y Pearson, 1970). De hecho, existen trabajos en los que HVE-2 fue aislado como único agente relacionado a la patología respiratoria (Schlocker *et al*, 1995; Murria *et al*, 1996, Borchers *et al*, 1998). Sobre la base de estos antecedentes, el segundo objetivo de este trabajo consistió en estudiar la relación entre la presencia de HVE-2 y su posible participación en los cuadros respiratorios en equinos deportivos. Para ello se analizaron, mediante la técnica de aislamiento en cultivo celular, muestras de HN que previamente habían resultado negativas para los virus respiratorios convencionales en el servicio de diagnóstico del Instituto de Virología, INTA-Castelar.

Sólo 2 de las 22 muestras analizadas por este método presentaron en el 3^{er} y 4^{to} pasaje ciego un ECP característico, coincidente con lo descripto para HVE-2 por

Roeder y Scott (1975) (Figura 2). La presencia de este hallazgo solamente en el 10% de las muestras analizadas resultó sorprendente, ya que teniendo en cuenta la alta seroprevalencia detectada, era de esperar un número mayor de aislamientos positivos.

La baja eficiencia de aislamiento podría deberse en primer lugar, a los repetidos ciclos de congelado y descongelado sufridos por las monocapas durante la realización de los pasajes ciegos. Se sabe que la curva de crecimiento en un ensayo de 1 ciclo de replicación, posee un período de eclipse de 18 hs y que el nivel máximo de virus asociados a célula se alcanza a las 96 hs. En base a este dato, Studdert (1974) sostiene que dada la necesidad de subpasajes hasta la visualización de ECP, los mismos serían más eficientes si se lo realiza pasando células viables, en lugar de sobrenadante de cultivo o de células lisadas. Por último, el alto número de pasaje celular utilizado para el aislamiento podría estar afectando la susceptibilidad de las células a la infección. En general se observa que en aquellos trabajos donde logran un eficiente aislamiento en cultivo celular, utilizan cultivos primarios de riñón fetal equino (EFK) o de línea (RK-13 y Vero) con bajo número de pasajes (Wilks y Studdert, 1974; Roberts *et al.*, 1974; Harden *et al.*, 1974). De todas formas resulta claro que para este virus en particular, el aislamiento viral presenta serias dificultades para ser incorporado como una herramienta práctica en el diagnóstico de rutina.

A partir de los aislamientos mencionados, se procedió a la identificación y confirmación de la presencia de HVE-2 utilizando diferentes técnicas virológicas. Inicialmente, la microscopía electrónica permitió determinar que la morfología del agente coincidía con lo descripto para los miembros de la familia *Herpesviridae* (Figura 5). Complementariamente y en forma coincidente a lo descripto por

Collinson y colaboradores (1994), el estudio cinético de los aislamientos en cultivo celular permitió confirmar que el virus permanecía altamente asociado a célula y que la progresión hacia un ECP total no se alcanzaba hasta pasados los 7 días de incubación (Figura 3). Además, el estudio de cinética mostró que el título máximo virus en la fracción soluble, como en la celular, se alcanzó alrededor de las 72 hs; dato que se confirma con la cinética realizada por Plummer y colaboradores (1969). Estas evidencias, sumadas a la presencia de fluorescencia positiva mediante la utilización de un Ac policlonal específico para este agente viral (Figura 4), coincidían en señalar que se trataba de HVE-2; sin embargo, estas técnicas no permitían descartar totalmente la posible presencia de HVE-5 en las muestras analizadas.

Cabe destacar que, como ya se describió anteriormente, el HVE-5 pertenece a la misma subfamilia que el HVE-2 y como tal, posee también un crecimiento lento en cultivo celular, además de compartir, como ya se mencionó, algunos determinantes antigénicos. A tal efecto y para confirmar la identidad del virus aislado, se resolvió comparar los patrones de restricción de los aislamientos con cepas de referencia de HVE-2 y HVE-5, y realizar un southern blot utilizando como sonda ADN completo de HVE-2 marcado con dioxigenina.

Los resultados de estos estudios permitieron confirmar definitivamente que el agente aislado era HVE-2, y demostrar la presencia única de este virus en las muestras analizadas (Figura 6). Si bien ambos aislamientos de HVE-2 mostraron un patrón de restricción idéntico, no podría asegurarse que se tratara de la misma cepa viral ya que éstas presentaron diferencias importantes en la zona repetitiva

secuenciada (Figura 13). Posiblemente, esta u otras diferencias se podrían haber evidenciado si se hubiesen utilizado otras enzimas en el estudio de restricción.

Sobre la base de estos resultados, reportamos en este trabajo el primer aislamiento de HVE-2 en equinos de la República Argentina a partir de HN.

Teniendo en cuenta la baja sensibilidad encontrada por nosotros en la técnica de aislamiento en cultivo celular aplicada a la detección de HVE-2 en muestras de HN, y con el fin de profundizar sobre la implicancia de este agente en los cuadros respiratorios de equinos SPC, fue necesario incorporar en este estudio una técnica más sensible de manera de reducir al máximo el número de falsos negativos. Es importante destacar además, que para el caso particular de HVE-2, la mayor desventaja que presenta el aislamiento en cultivo es el largo tiempo que se requiere hasta lograr su diagnóstico. Por lo tanto, en este caso resulta crítico disponer de una técnica alternativa que permita ser incorporada como herramienta factible en la rutina de diagnóstico virológico. Estudios realizados por Reubel y colaboradores (1995), reportaron que el uso de una PCR multiplex para el diagnóstico de HVE-2 y HVE-5 en muestras de HN presentaba una sensibilidad de detección mayor que el aislamiento en cultivo celular.

En nuestro caso se utilizó una PCR anidada, descrita por Borchers y colaboradores (1997), la cual amplifica un fragmento ubicado en el extremo 5' flanqueante del gen que codifica para la IL-10 viral. En primer lugar, se comparó la sensibilidad de esta técnica y el aislamiento en cultivo celular (co cultivo) en la detección de HVE-2 presente en linfocitos, en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio. El resultado obtenido mostró que la técnica de PCR fue altamente sensible, ya que las muestras resultaron positivas por PCR mientras que los co-

cultivos permanecieron negativos aún después de realizados los tres pasajes ciegos (Figura 7 A). Este resultado coincide con lo reportado por Borchers, donde observó que el cocultivo de linfocitos detectaba el virus en un 20% menos de muestras respecto a la PCR. La identificación de la banda mediante el corte con la enzima *Dra I*, (Figura 7 B), y la sensibilidad de detección de la técnica en las condiciones ensayadas (Figura 8), permitieron seleccionar a la PCR como herramienta útil para llevar a adelante este estudio.

En un primer análisis realizado con dicha técnica, se observó que el HVE-2 se encontraba presente en la secreción nasal de una alta proporción de animales con sintomatología respiratoria (Figura 9). Este resultado nos condujo a estudiar en forma comparativa la presencia de este virus tanto en muestras de animales asintomáticos como clínicamente enfermos, observándose que la proporción de animales con excreción viral fue significativamente mayor en el grupo de los asintomáticos. Al analizar si dicha diferencia estaba relacionada con la edad del animal, se observó que en el caso de los animales con sintomatología clínica, la excreción viral no difirió significativamente entre ambos grupos etáricos (Figura 10). Sobre la base de este resultado, podría suponerse que ni la diferencia de edad, ni el manejo diferencial de los animales de ambos grupos etáricos serían factores condicionantes de enfermedad. Sin embargo, al analizar el grupo de asintomáticos la proporción de animales menores de 1 año que excretaba virus, fue significativamente mayor respecto a los mayores de 1 año. Si bien la falta de correlación entre excreción viral y patología respiratoria parecerían indicar que el HVE-2 no sería el responsable de la misma, no podríamos descartar su participación en estos cuadros clínicos dado que la presencia o ausencia de sintomatología podría estar relacionada con el grado de multiplicación

de este virus en la mucosa respiratoria, y en este estudio en particular la técnica de PCR utilizada no permite cuantificar la cantidad de ADN detectado.

Consideramos que estudios posteriores que incorporen técnicas que permitan realizar la cuantificación viral y principalmente, estudios realizados con potrillos descalostrados o gnotobióticos serían necesarios para determinar la verdadera participación de HVE-2 en la enfermedad respiratoria.

Con el fin de profundizar este estudio, se determinó el título de Acs neutralizantes promedio para cada grupo etario, tanto en los equinos asintomáticos como en los que presentaban sintomatología respiratoria. Los resultados indicaron que el título promedio en los animales asintomáticos menores de 1 año de edad era significativamente menor que en el resto de los animales (Figura 11) También se observó que los títulos promedio entre mayores y menores de 1 año con sintomatología clínica no diferían significativamente. El análisis en forma conjunta de la excreción viral y el título promedio para cada grupo, permitió observar una correspondencia inversamente proporcional entre ambos datos. Aquel grupo que presentó un porcentaje de excreción viral alto poseía un título promedio de Acs bajo, y a medida que éste aumenta, disminuía la proporción de animales que excreta virus. Esto llevaría a pensar que el nivel de Acs neutralizantes de una población podría estar regulando la proporción de animales con excreción viral en su secreción nasal, dado que el porcentaje de animales con excreción viral tiende a disminuir ante un incremento en el título de Acs.

Existen trabajos cuyos resultados concuerdan con esta observación; Nordengrahn y colaboradores (1996), estudiaron la protección conferida por una vacuna de complejos inmunoestimuladores (ISCOMS) conteniendo glicoproteínas de

membrana del virus, frente a una enfermedad respiratoria en la que participaban HVE-2 y *Rhodococcus equi*. En ese trabajo, observaron que HVE-2 era aislado a partir de HN de todos los animales no vacunados; a medida que se aumentaba la dosis de la vacunación se elevaba el título de Acs neutralizantes y disminuía el aislamiento del virus de la secreción nasal. En un estudio similar, Belák y colaboradores (1980) estudiaron la cinética de excreción viral en 16 potrillos recién nacidos, a los que se les administró en forma subcutánea suero hiperinmune. Luego de esta administración observaron que, durante la 1^{ra} semana de edad se alcanzaba rápidamente un alto título de Acs neutralizantes, los cuales descendían a las 6 semanas. Durante este período ninguno de los potrillos tratados excretó virus ni mostró sintomatología clínica alguna; sin embargo, a partir de la 6^{ta} semana comenzó a aislarse el virus en secreción nasal y se evidenciaron algunos síntomas respiratorios.

Por su parte, Wilks y Studdert (1974), estudiando la epizootiología del HVE-2 en potrillos desde su nacimiento hasta los 180 días de edad observaron que a partir de los tres días de edad los potrillos poseían el mismo nivel de Acs neutralizantes que las madres y que dicho nivel se mantenía hasta los 90 días, momento a partir del cual comenzaba a descender. Durante el transcurso de este tiempo no lograron detectar HVE-2 en la secreción nasal de ninguno de los potrillos; sin embargo, a partir del día 90 comenzó a aislarse el virus.

De acuerdo a nuestros resultados y en concordancia con lo expuesto por estos autores, este estudio sugiere que podría existir un mecanismo por el cual el título medio de Acs neutralizantes regulara el porcentaje de animales que excreta HVE-2 en su secreción nasal. Ciertamente, este no sería el único mecanismo involucrado en

este proceso, ya que es de esperar como ya ha sido descrito para otros herpesvirus, que la inmunidad celular y la respuesta a nivel de mucosas también participen regulando este fenómeno. Estudios complementarios como medición de la replicación viral e infecciones experimentales y serían importantes al momento de confirmar esta hipótesis.

El EBV codifica para una proteína (BCRF1) que posee una alta homología con la IL-10 humana (Moore *et al*, 1990); incluso se ha demostrado que dicha proteína conserva algunas funciones inmunomoduladoras y que participa en ciertas patologías asociadas con este virus (Kanegane *et al*, 1997; Hayes *et al*, 1999; Xu (*et al* 2001). Hsu y colaboradores (1990) demostraron que la expresión de dicha proteína “in vitro” era capaz de inhibir la síntesis de INF- γ a partir de células linfoides activadas como linfocitos T y NK. Por su parte, de Waal Malefyt y colaboradores (1991) observaron que la IL-10 v reducía la proliferación de los linfocitos T activados; tal efecto se debía a que la proteína viral afectaba la capacidad de presentación antigénica de los monocitos, regulando negativamente la expresión de el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). En otro estudio realizado por Niiro y colaboradores (1992) se demostró que la IL-10v inhibía la producción del anión superóxido en las células mononucleares, particularmente en los monocitos. De este modo, la presencia de esta actividad inmunomoduladora por parte de la proteína BCRF1 del EBV sugiere que la misma podría estar implicada en algún mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador, favoreciendo la replicación del virus.

Para el caso particular de HVE-2, se conoce que su genoma posee una secuencia que se encuentra comprendida entre las posiciones -220 y -820 pb

(extremo 5') respecto al sitio de inicio de la transcripción de la IL-10 viral (Rode *et al*, 1994), la cual contiene elementos repetitivos en tándem. Dichos elementos presentan polimorfismos entre las cepas, generando diferencias en el tamaño de la banda del producto final de la PCR anidada utilizada en este trabajo (Borchers *et al*, 1997). Teniendo en cuenta que la ausencia de sintomatología clínica depende de la magnitud del daño tisular y que las secuencias repetitivas pueden estar asociadas con funciones regulatorias importantes durante la replicación viral, encapsidación del ADN y la patogénesis (Lalioi *et al*, 1999; Fojtik y Vorlíková, 2001), surgió como hipótesis si la ausencia de sintomatología en presencia de multiplicación viral podría estar relacionada con una transcripción diferencial del gen de la IL-10v del HVE-2.

Para estudiar la factibilidad de esta hipótesis se realizó un estudio orientado a la búsqueda de diferencias genotípicas entre las cepas virales de la secreción nasal de animales con y sin sintomatología clínica. Para ello, se clonaron y secuenciaron los productos finales de la PCR anidada de 4 cepas detectadas en animales con sintomatología clínica y 4 de animales asintomáticos. Los resultados preliminares obtenidos permitieron observar que aunque la secuencia analizada se encuentra marcadamente conservada, existen algunas diferencias entre ellas. Las secuencias provenientes de los animales asintomáticos presentaban el elemento "ACAGGGGCCATGCTGGC" repetido mas de 8 veces; en cambio, para el caso de los animales con sintomatología clínica, la misma secuencia se repetía menos de 8 veces o presentaba una mutación (transversión) en la posición 8, donde aparece una T en lugar de G (Figura 13). De este modo, la diferencia en el número de copias del elemento repetitivo podría estar implicado en el control de la expresión de la IL-10v, de forma tal que al aumentar el número de copias disminuye la expresión del gen.

Este mecanismo ya ha sido reportado por otros autores como Bailly y colaboradores (1996), quienes observaron que el gen de la IL-1 α posee hacia el extremo 5' una secuencia de 46 pb repetida en tándem. Se encontró que el número de repeticiones podía variar de 5 a 18 veces en la población y sugirieron la existencia de una relación inversa entre el número de repeticiones y la expresión de la IL-1 α . De la misma manera, Lalioti y colaboradores (1999) observaron que la expansión de la secuencia CCCC GCCCGCG, en el extremo 5' del gen que codifica para la cistatina B (CSTB), disminuye la transcripción de este gen. En ese estudio proponen que el mecanismo implicado en la reducción de la expresión, se debe al espacio generado entre los factores de transcripción involucrados en dicha expresión. Gebhardt y colaboradores (1999) estudiaron el efecto del dinucleótido (CA) en la modulación de la expresión del gen para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este dinucleótido se encuentra a más de 1000 pb río arriba respecto al promotor del gen de EGFR y puede encontrarse repetido entre 14 y 21 veces en la población. En este estudio se demostró que la transcripción del gen se encontraba inhibida en un 80% en aquellos alelos que presentaban al dinucleótido CA repetido 21 veces. Además, observaron que la actividad transcripcional disminuía con el incremento en el número de repeticiones de dicho dinucleótido.

En el presente trabajo también se observó que en CS1 y CS2 el elemento repetitivo aparece más de 8 veces; sin embargo, la secuencia en ambos casos difiere de las observadas en CS3 y CS4, ya que presentan una transversión en la posición 8. Esta diferencia podría ser importante al momento de analizar la expresión del gen. Se sabe que en el genoma humano existen secuencias repetitivas capaces de generar diferentes estructuras en las cadenas del ADN; algunas veces, dichas estructuras

pueden alterar la replicación del ADN o favorecer la transcripción de ciertos genes (Rasmussen *et al*, 1996; Hanke *et al*, 1995; McAllister y Achberger, 1989; Nishikawa *et al*, 2003). Recientemente, se demostró la presencia de dichas estructuras en el ADN viral. En un estudio realizado en Herpes Simplex se observó que la doble cadena de ADN, ubicada en el sitio de origen de la replicación (oriS y ori L), posee secuencias palindrómicas que permiten a la molécula adquirir una conformación secundaria con una alta afinidad por la proteína OBP (origin binding protein) (Hammarsten y Elias, 1997). Al igual que lo que sucede en el humano, dentro del genoma viral podrían existir secuencias repetitivas capaces de adquirir una conformación tal, que pudiese favorecer la transcripción de ciertos genes.

En vista de las diferencias encontradas entre las secuencias virales provenientes de animales con sintomatología respiratoria y asintomáticos, se analizó si existían posibles secuencias regulatorias de la expresión y si había diferencias entre las cepas. Los resultados obtenidos mostraron que, en general, todas las cepas analizadas poseían las mismas secuencias regulatorias putativas. Estas secuencias correspondían a factores de transcripción presentes tanto en mamíferos como en virus. Se observó que solo la secuencia correspondiente al factor SP1 presentaba alguna diferencia entre las cepas. La misma se encontraba ausente o aparecía representada menos de 8 veces en las cepas provenientes de animales con síntomas respiratorios y más de 8 veces en los asintomáticos. Este hecho estaría directamente relacionado con que la secuencia de reconocimiento de este factor de transcripción es GGGGCC, dicha secuencia forma parte del elemento repetitivo que se encuentra presente en todas las cepas, excepto en CS1 y CS2.

Aunque los resultados obtenidos son preliminares y sería arriesgado discutir acerca de la funcionalidad de estas secuencias en el control de la regulación de la IL-10 v del HVE-2, es interesante notar que entre las posibles secuencias regulatorias se encuentran secuencias de unión a glucocorticoides y secuencias de enhancers presentes en otros virus como el Poliomavirus. El hecho de que SP1 pudiera ser una de las secuencias regulatorias implicada en el control de la transcripción de la IL-10v también resulta interesante, ya que dicho factor se encuentra ampliamente distribuido en distintos tipos celulares y se sabe que participa en la transcripción de la IL-10 , IL-2 y la subunidad α del receptor de la IL-3 en el humano y en la transcripción de la IL-6 en el ratón (Tone *et al*, 2000; Skerka *et al*, 1995; Akagawa *et al*, 2003; Kang *et al*, 1996).

En conclusión, si bien la seroprevalencia sería elevada, la importancia del HVE-2 como agente patógeno en equinos aún no puede ser bien establecida. Aunque confirmamos que puede ser aislado de animales asintomáticos y que probablemente actúe como agente patogénico débil en equinos, sigue siendo importante determinar su grado de patogenicidad, particularmente para aquellas ramas de la industria hípica donde la pérdida de performance y de días de entrenamiento generan pérdidas económicas de gran magnitud.

Por otro lado, sería interesante determinar la funcionalidad de la IL-10v y las posibles diferencias en su expresión, de manera de lograr un mejor entendimiento del comportamiento del virus con su hospedador. Este aspecto quedaría pendiente para su realización en estudio futuros.






BIBLIOGRAFIA

Agius, C.T; Crabb, B.S; Telford, E.A.R; Davison, A.J; Studdert, M.J (1994). Comparative studies of the structural proteins and glycoproteins of equine herpesviruses 2 and 5. *Journal of General Virology* 75: 2707-2717.

Agius, C.T; Studdert, M.J (1994). Equine Herpesviruses type 2 and 5: Comparisons with other members of the subfamily Gammaherpesvirinae. *Advances in Virus research* 44: 357-379.

Akagawa, E; Muto, A; Arai, K; Watanabe, S (2003). Analysis of the 5' promoters for human IL-3 and GM-CSF receptor α genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 600-608.

Allen, G.P; Bryans, J.T (1986) Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 2: 78-144.

Allen, G.P; Turtinen, L.W (1982). Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1. *Journal of Virology* 44: 249-255.

Ames, T.R; O'Leary, T:P; Jhonston, G.R (1986). Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals with respiratory disease. *Compendium Equine* 8 (9): 664-668.

Bagust, T.J; Pascoe, R.R; Harden, T.J (1972). Studies on equine herpesviruses. 3. The incidence in Queensland of three different equine herpesvirus infections. Australian Veterinary Journal 48: 47-53.

Bailly, S; Israel, N; Fay, M; Gougerot-Pocidallo, M.A; Duff, G (1996). An intronic polymorphic repeat sequence modulates interleukin-1 alpha gene regulation. Molecular Immunology 33 (11/12): 999-1006.

Belak, S; Palfi, V; Tuboly, S; Bartha, L. (1980). Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2. Zentralblatt für Veterinärmedizin B 27: 826-830.

Borchers, K.; Wolfinger, U.; Goltz, M.; Broll, H.; Ludwig, H. (1997). Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. Archives of Virology 142: 917-928.

Borchers, K; Wolfinger, U; Ludwig, H (1999). Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. Journal of General Virology 80: 2165-2171.

Borchers, K; Wolfinger, U; Ludwig, H; Thein, P; Baxi, S; Field, H; Slater, J.D (1998).
Virological and molecular biological investigations into equine herpes virus type 2
(EHV-2) experimental infections. *Virus Research* 55. 101-106.

Browning, G.F; Bulach, D.M; Ficorilli, N; Roy, E.A; Thorp, B.H; Studdert, M.J (1988).
Latency of equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus). *Veterinary Record*
123: 518-519.

Browning, G.F; Studdert, M.J (1987a). Epidemiology and pathogenesis of equine
herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Journal of Clinical Microbiology* 25: 13-16.

Browning, G.F; Studdert, M.J (1987b). Genomic heterogeneity of equine
betaherpesviruses. *Journal of General Virology* 68: 1441-1447.

Browning, G.F; Studdert, M.J (1988). Equine Herpesvirus 2 (Equine Cytomegalovirus).
Veterinary Bulletin 58, n°10: 775-790.

Browning, G.F; Studdert, M.J (1989). Physical mapping of a genome of equine
herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Archives of Virology* 104: 77-86.

Burrows, R (1981): Equine rhinovirus and adenovirus infections. Proceedings of 24th
annual convention of American Association. *Equine Practitioner*, 299-306.

Burrows, R; Goodridge, D (1973). Proceedings of 3rd international Conference of Equine Infectious Disease, Paris . 306-.

Camarda, G; Spinetti, G; Bernardini, G; Mair, C; Poynter, N.D; Capogrossi, M.C; Napolitano, M (1999). The equine herpesvirus 2 E1 open reading frame encodes a functional chemokine receptor. *Virology* 73: 9843-9848.

Chowdhury, S.I; Kubin, G; Ludwig, H (1986). Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in a Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses. *Archives of Virology* 90: 273-288.

Collinson, P.N; O'Reilly, J.L; Ficorilli, N; Studdert, M.J (1994). Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 205: 329-331.

de Waal Malefyt, R; Haanen, J; Spits, H; Roncaloro, M.G; te Velde, A; Figdor, C; Jonson, K; Kastelein, R; Yssel, H; de Vries J.E (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 174: 915-924.

Doll, E.R; Bryans, J.T (1963). Epizootiology of equine viral rhinopneumonitis. Journal of American Veterinary Medicine Association 142: 31-37.

Doll, E.R; Bryans, J.T; Mc Collum, W.H; Crowe, M.E.W (1957). Isolation of a filtrable agent causing Arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (Influenza) Virus. Cornell Veterinarian. 47: 4-41.

Drummer, H.E; Reubel, G.H; Studdert, M.J (1996). Equine gammaherpesvirus 2 (EHV-2) is latent in B lymphocytes. Archives of Virology 141: 495-504.

Dunowska, M; Meers, J; Wilks, C.R (1999). Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zeland. New Zeland Veterinary Journal 47: 44-46.

Dutta, S.K; Campbell, D.L (1978). Pathogenicity of equine herpesvirus: In vivo persistence in equine tissue macrophages of herpesvirus type 2 detected in monolayer macrophage cell culture. American Journal of Veterinary Research 39 (9): 1422-1427.

Erasmus, B.J (1970). Equine cytomegaloviruses. In Equine infectious diseases II. Proceedings of the 2nd international conference on equine diseases. Ed. by J.T Bryans and H. Gerber. Karger, Basel .46-55.

Ferner, F; Gibbs, P; Murphy, F; Rott, R; Studdert, M.J; White, D (1993). Herpesviridae en Veterinary Virology. Academic Press. Inc. Second edition.

Fleming, S.B; Haig, D.M; Nettleton, P; Reid, H.W; Mc Caughan, C.A; Wise, L.M; Mercer, A.A (2000). Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes* 21: 85-95.

Fleming, S.B; Mc Caughan, C.A; Andrews, A.E; Nash, A.D; Mercer, A.A (1997). A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of Virology* 71 (6): 4857-4861.

Fojtik, P; Vorlicová, M (2001). The fragile X chromosome (GCC) repeat folds into a DNA tetraplex at neutral pH. *Nucleic Acids Research* 29 (22): 4684-4690.

Fu, Z.F; Robinson, A.J; Horner, G.W; Dickinson, L.G; Grimmett, J.B; Marshall, R.B (1986). Respiratory disease in foals and epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection. *New Zealand Veterinary Journal* 34: 152-155.

Gebhardt, F; Zanker, K.S; Brandt, B (1999). Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (19): 13176-13180.

Gerber, H.(1969). Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. Proceedings of 2nd international conference of Equine Infectious Disease, Paris . 63-80.

Gibson, J.S; Slater, J.D; Awan, A.R; Field, H.J (1992) Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen free foals: primary and secondary infections and reactivation. Archives of Virology 123: 351-366.

Gleeson, L.J; Studdert, M.J (1977). Equine herpesviruses. Experimental infection of a foetus with type 2. Australian Veterinary Journal 53: 360-362.

Gooding, L (1992). Virus proteins that counteract host immune defenses. Cell 71: 5.7.

Hammarsten, O; Elias, P (1997). Herpes Simplex Virus: selections of origins of replications. Nucleic Acids Research 9: 1753-1760

Hanke, J.H; Hambor, J.E; Kavathas, P (1995). Repetitive Alu elements form a cruciform structure that regulates the function of human CD8 alpha T cell-specific enhancer. Journal of Molecular Biology 246 (1): 63-73.

Harden, T.J; Bagust, T.J; Pascoe, R.R; Spradbrow, P.B (1974). Studies on equine herpesviruses 5. Isolation and characterisation of slowly cytopathic equine herpesviruses in Queensland. Australian Veterinary Journal 50: 483-488.

Horner, G.W; Hunter, R; O'Flaherty, J.D; Dickinson, L.G (1976). Isolation of equine herpesviruses from horses with respiratory disease. *New Zealand Veterinary Journal* 24: 171-176.

Hsiung, G.D; Fischman, H.R; Fong, C.K.Y; Green, R.H (1969). Characterisation of a cytomegalo like virus isolated from spontaneously degenerated equine kidney cell culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 130: 80-84.

Hsu, D.H; de Waal Malefyt, R; Fiorentino, D.F; Dang, M.N; Vieira, P; deVries, J; Spits, H; Mosmann, T.R; Moore, K.W (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein Barr virus protein BCRF1. *Science* 250: 830-832.

Jinquan, T; Larsen, C.G; Gesser, B; Matsushima, K; Thestrup Pedersen, K (1993). Human IL-10 is a chemoattractant for CD8⁺ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4⁺ T lymphocyte migration. *Journal of Immunology* 151: 4545-4551.

Jones, T.C; Doll, E.R; Bryans, J.B (1957). The lesions of equine viral Arteritis. *Cornell Veterinarian*. 47: 52-68.

Kanegane, H; Wakiguchi, H; Kanegane, Ch; Kurashide, T; Tosato, G (1997). Viral interleukin-10 in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Journal of Infectious Disease* 176: 254-257.

Kang, S.H; Brown, D.A; Kitajima, I; Xu, X; Heindenreich, O; Gryaznov, S; Neremberg, M (1996). Binding and functional effects of transcriptional factor SP1 on murine interleukin 6 promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (13): 7330-7335.

Karpas, A (1966). Characterisation of a new herpes like virus isolated from foal kidney. *Annals de l'Institut Pasteur, Paris* 110: 688-696.

Kemeny, L; Pearson, J.E (1970). Isolation of herpesvirus from equine leukocytes: Comparison with equine rhinopneumonitis virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 34: 59-65.

Kershaw, O; von Oppen, T; Glitz, F; Deegen, E; Ludwig, H; Borchers, K (2001). Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus Research* 80: 93-99.

Kono, Y; Kobayashi, K (1964a) Cytopathogenic equine orphan (CEO) virus in horse kidney cell culture I. Isolation and properties. *National Institute of Animal Health Quarterly, Japan* 4: 10-20.

Krogstad, J; Onstad, O (1971). Equine coital exanthema: Isolation of a virus and transmission experiments. *Acta of Veterinary Scandinavica* 12: 1-14

Kube, D; Platzer, C; von Knethen, A; Straub, H; Bohlen, H; Hafner, M; Tesch, H (1995). Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 7 (1): 1-7.

Lalioti, M.D; Scott, H.S; Antonarakis, S.E (1999). Altered spacing of promoter elements due to the dodecamer repeat expansion contributes to reduced expression of the cystatin B gene in EPM1. *Human Molecular Genetics* 8 (9): 1791-1798.

Lin, M.T; Hinton, D.R; Parra, B; Stholman, S.A; van der Veen, R.C (1998). The role of IL-10 in mouse hepatitis virus induced demyelinating encephalomyelitis. *Virology* 245: 270-280.

Ma, W; Lim, W; Gee, K; Aucoin, S; Nandan, D; Kozlowski, M; Diaz Mitoma, F; Kumar, A (2001). The p38 mitogen activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide stimulated human macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 276 (17): 13664-13674.

Matumoto, M; Ishizaki, R; Shimizu, T (1965). Serologic survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in various countries. *Archives Gesamte Virusforsch* 15: 609.-

Mc Guire, T.C; Crawford, T.B; Henson, J.B (1974). Prevalence of antibodies to herpesvirus types 1 and 2, arteritis and infectious anemia viral antigens in equine serum. *American Journal of Veterinary Research* 35: 181-185.

McAllister, C.F; Achberger, E.C (1989). Rotational orientation of upstream curved DNA affects promoter function in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 264 (18): 10451-10456.

Moore, K.W; de Waal Malefyt, R; Coffman, R.L; O'Garra, A (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19: 683-765.

Moore, K.W; Vieira, P; Fiorentino, D.F; Trounstein, M.L; Khan, T.A; Mosmann, T.R (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248: 1230-1234.

Murray, M.J; Eichorn, E.S; Dubovi, E.J; Ley, W.B; Cavey, D.M (1996). Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. *Equine Veterinary Journal* 28 (6): 432-436.

Nihiro, H; Otsuka, T; Abe, M; Satoh, H; Ogo, T; Nakano, T; Furukawa, Y; Niho, Y (1992). Epstein Barr virus BCRF1 gene product (viral interleukin 10) inhibits

superoxide anion production by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Research* 11 (5): 209-214.

Nishikawa, J; Amano, M; Fukue, Y; Tanaka, S; Kishi, H; Hirota, Y; Yoda, K; Ohyama, T (2003). Left-handedly curved DNA regulates accessibility to cis-DNA elements in chromatin. *Nucleic Acids Research* 31 (22): 6651-6662.

Nordengrahn, A; Kingeborn, B; Lindholm, A; Merza, M. (2001). The use of neutralizing monoclonal antibody to detect infections of equine herpesvirus type 2 (EHV-2). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13: 389 – 393.

Nordengrahn, A; Rusvai, M; Merza, M; Ekstrom, J; Morein, B; Belak, S (1996). Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of a bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. *Veterinary Microbiology* 51: 55-68.

Pálfi, V; Belák, S; Molár, T (1978). Isolations of equine herpesvirus type 2 from foals showing respiratory symptoms. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 25: 165-167.

Petzoldt, K (1967). Die Virusausscheidung beim Stutenabort (Rhinopneumonitis). *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 21: 115-119.

Plummer, G (1964). Serological comparison of the herpes viruses. *British Journal of Experimental Pathology* 45: 135-141.

Plummer, G; Bowling, C.P; Goodheart, C.R (1969). Comparision of four horse herpesviruses. *Journal of Virology* 4: 738-741.

Plummer, G; Goodheart, C; Studdert, M.J (1973). Equine Herpesviruses: antigenic relationship and deoxyribonucleic acid densities. *Infection and Immunity* 8: 621-627.

Plummer, G; Waterson, A.P (1963). Equine herpesviruses. *Virology* 19: 412-416.

Powell, D.G (1992). Enfermedades Respiratorias Virales. En: *Terapéutica actual en Medicina Equina 2*. Editado por. Prensa Veterinaria Argentina.

Powell, D.G; Burrows, R; Goodrig, D (1974b). Respiratory viral infections among thoroughbred horses in training during 1972. *Equine Veterinary Journal* 6: 19-24.

Prestidge, D.S (1996). Signal Sacn 4.0: additional database and sequences formats. *Computer Application in Bioscience* 12 (2): 157-160

Rasmussen, C; Leisy, D.J; Ho, P.S; Rohmann, G.F (1996). Structure function analysis of the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus homologous region palindromes. *Virology* 224 (1): 235-245.

Reed, L; Muench, H (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Annual Journal of Hygiene* 27: 493 -.

Reubel, G.H.; Crabb, B.S.; Studdert, M.J. (1995). Diagnosis of equine gammaherpesvirus 2 and 5 infections by polymerase chain reaction. *Archives of Virology* 140: 1049-1060.

Rizvi, S:M; Slater, J.D; Wolfinger, U; Borchers, K; Field, H.J; Slade, A.J (1997). Detection and distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central and peripheral nervous systems of ponies. *Journal Of General Virology* 78: 1115-1118.

Robinson; W.F; Huxtable, C.R.R. *Principios de Clinopatología Médica Veterinaria*. Editorial Acribia, S.A. (1993). Capítulo 5, pág. 109-.

Rode, H.J; Bugert, J.J; Handermann, M; Schnitzler, P; Kehm, R; Janssen, W; Delius, H; Darai, G (1994). Molecular characterization and determination of the coding capacity of the genome of equine herpesvirus type 2 between the genome coordinates 0.235 and 0.258 (the Eco RI DNA fragment N; 4.2 kbp). *Virus Genes* 8 (3): 59-73.

Rode, H.J; Janssen, W; Wolff, A.R; Bugert, J.J; Thein, P; Becker, Y; Darai, G (1993). The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL-10)-like gene. *Virus Genes* 7 (1): 111-116.

Roizman, B; Desrosiers, R.C; Fleckenstein, B; Lopez, C; Minson, A.C; Studdert, M.J (1992). The family Herpesviridae: un update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses Archives of Virology 123(3-4):425-449

Roizman, B; Pellett, P.E (2001). Fields Virology. 4ta Edición. Capítulo 71 pag. 2381.

Rousset F; Garcia, E; Defrance, T; Peronne, C; Vezzio, N; Hsu, D.H; Kastlein R; Moore, K.W; Banchereau, J. (1992). Interleukin is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Science 89: 1890-1893.

Sambrook, J; Fritsh, E. F.; Maniatis, T. (1989). En "Molecular cloning: a laboratory manual" Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Schlocker, N; Gerber Bretscher, R; von Felleger, R (1995). Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses. American Journal of Veterinary Research 56 (6): 749-754

Scott, J.C; Dutta, S.K; Myrup, A.C (1983). In vivo harboring of equine herpesvirus 1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitations from experimentally infected ponies. American Journal of Veterinary Research 44: 1344-1348.

Seow, H, (1998). Pathogen interaction with cytokines and host defence: an overview. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63: 139-148.

Sherman, J; Thorsen, J; Barnum, J.A; Mitchell, W.R; Ingram, D.G (1977). Infectious causes of equine respiratory disease on Ontario Standardbred racetracks. *Journal of Clinical Microbiology* 5: 285-289.

Skerka, C; Decker, E.L; Zipfel, P:F (1995). A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for zinc finger proteins SP1 and EGR-1. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (38): 22500-22506

Slater, J.D; Borchers, K; Thackray, A.M; Field, H.J (1994). The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology* 75: 2007-.

Steck, F;Hofer, B;Schaeren, B;Nicole, J; Gerber, H (1976). Equine Rhinoviruses: New serotypes. *Proceeding of 4th international conference of equine infectious disease, Lyon* 321-328.

Studdert, M.J (1971). Equine herpesviruses 4. Concurrent infection in horses with strangles and conjunctivitis. *Australian Veterinary Journal* 47: 434-436.

Studdert, M.J (1974). Comparative aspects of equine herpesviruses. *Cornell Veterinary* 64: 94-122.

Studdert, M.J; (1983). Restriction endonuclease DAN fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foals isolates of equine herpesvirus type 1. *Archives of Virology* 77: 249-258.

Studdert, M.J; Simpson, T; Roizman, B (1981). Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* 214: 562-564.

Studdert, M.J; Turner, A.J; Peterson, J.E (1970). Equine herpesviruses 1. Isolation and characterisation of equine rhinopneumonitis virus and other equine herpesviruses from horses. *Australian Veterinary Journal* 46: 83-89.

Taga, H; Taga, K; Wang, F; Chretien, J; Tosato, G (1995). Human and viral interleukin-10 in acute Epstein Barr virus induced infectious mononucleosis. *Journal of Infectious Diseases* 171: 1347-1350.

Telford, E.A.R; Studdert, M.J; Agius, C.T; Watson, M.S; Aird, H.C; Davison, A.J (1993). Equine Herpesvirus type 2 and 5 are γ - Herpesviruses. *Virology* 195: 492-499.

Telford, E.A.R; Watson, M.S; Aird, H.C; Perry, J; Davison, A.J (1995). The DNA sequence of equine herpesvirus 2. *Journal of Molecular Biology* 249: 520-528.

Thomson, G.R; Mumford, J.A; Campbell, T.M; Griffiths, L; Clapham, P (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Veterinary Journal* 8: 58-65.

Tone, M; Powell, M.J; Tone, Y; Thompson, S.A.J; Waldmann, H (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *Journal of Immunology* 165: 286-291.

Turner, A.J; Studdert, M.J (1970). Equine herpesviruses 3. Isolation and epizootiology of slowly cytopathic viruses and the serological incidence of equine rhinopneumonitis. *Australian Veterinary Journal* 46: 581-586.

van Den Broeck, M; Brachmann, M.F; Kohler, G; Barner, M; Escher, R; Zinkernagel, R; Kopf, M (2000). IL-4 and IL-10 antagonize IL-12 mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of INF-gamma and nitric oxide synthetase 2. *Journal of Immunology* 164: 371-378.

Vieria, P; de Waal Malefyt, R; Dang, M.N; Jonson, K; Kastlein, R; Fiorentino, D.F; de Vries J.E ; Roncaloro, M.G; Mosmann, T.R; Moore, K.W (1991). Isolation and

expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clone: homology to Epstein Barr virus open reading frame BCRFI. Proceedings of the National Academy of Science 88: 1172-1176.

Welch, H.M; Bridges, C.G; Lyon, A.M; Griffiths, L; Edington, N (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. Journal of General Virology 73: 261-268.

Wharton, J.H; Henry, B.E; O'Callaghan, D (1981). Equine Cytomegalovirus. Cultural characteristics and properties of viral DNA. Virology 109: 106-119.

Wilks, C.R; Studdert, M.J (1974). Equine herpesviruses.5. Epizootiology of slowly cytopathic viruses in foals. Australian Veterinary Journal 50: 438-442.

Xu, Z.G; Iwatsuki, K; Oyama, N; Ohtsuka, M; Satoh, M; Kikuchi, S; Akiba, H; Kaneko, F (2001). The latency pattern of Epstein-Barr virus infection and viral IL-10 expression in cutaneous natural killer/T cell lymphomas. British Journal of Cancer 84 (7): 920-925.