

VIRUS HERPES EQUINO TIPO 1 (EHV-1): PATRONES DE RESTRICCIÓN DE ADN, PERFILES PROTEICOS Y ESTUDIO DE PATOGENICIDAD EN RATONES

C.M. Galosi^{1,2}, M.G. Echeverría^{1,3}, M.V. Vila Roza^{1,4}, V. Cid de La Paz^{1,5},
G.A. Oliva¹, M.E. Etcheverrigaray¹

¹Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata

²Investigador Adjunto c/D CIC, Provincia de Buenos Aires.

³Investigador Asistente CONICET. ⁴Becaria de Iniciación de CIC, Provincia de Buenos Aires

⁵Profesional de Apoyo de CIC, Provincia de Buenos Aires

RESUMEN: Se estudiaron siete cepas de herpesvirus equino 1 (EHV-1) aisladas en Argentina desde 1979 hasta 1996 y una cepa de referencia japonesa, analizándose los patrones de restricción del ADN, perfiles proteicos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y los biotipos, para determinar posibles diferencias entre las mismas y su correlación con la patogenicidad en el ratón. El análisis genómico con enzimas de restricción demostró que todas las cepas pertenecen al tipo 1P de EHV-1. Sólo el primer aislamiento realizado en el país (cepa SP) mostró diferencias en su patrón de restricción del ADN. Esta cepa y la cepa aislada en el año 1985 (cepa LP) presentaron además diferencias en sus perfiles proteicos. El estudio de patogenicidad en ratones indicó la presencia de tres biotipos, no encontrándose correlación con las variaciones halladas en los electroferotipos y con la sintomatología clínica en el equino.

PALABRAS CLAVES: Virus herpes equino 1, Patrones de restricción del ADN, Electroforesis en geles de poliacrilamida, Patogenicidad en ratones.

EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 (EHV-1): RESTRICTION FRAGMENT PATTERNS, POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROFILES AND PATHOGENICITY IN BABY MICE

ABSTRACT: Seven strains of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolated in Argentina from 1979 to 1996 and reference Japanese strain, were compared by restriction fragments analysis (RFA), polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and inoculation of baby mice. The RFA revealed that all EHV-1 strains belonged to genome type 1P. Only the first isolate (SP strain) showed differences. This strain and the LP strain isolated in 1985 presented a small differences for SDS-PAGE analysis. Baby mice inoculation revealed that three biotypes could be distinguished on the basis of pathogenicity. However, no strict correlation with pathogenicity in the natural host was seen.

KEY WORDS: Equine herpesvirus 1, Restriction enzyme patterns, Polyacrylamide gel electrophoresis, Pathogenicity in baby mice

INTRODUCCIÓN

El virus herpes equino tipo 1 (EHV-1) fue aislado por primera vez de material de fetos abortados en EE.UU. en 1933 (Dimock et al., 1947). Se encuentra distribuido por todo el mundo y produce cuatro manifestaciones clínicas importantes en el equino: enfermedad respiratoria, aborto, síndrome neonatal y enfermedad nerviosa (Allen y Bryans, 1986; Crabb y Studdert, 1995).

En nuestro país se detectaron anticuerpos (Ac) por primera vez en el año 1965 (Matumoto et al., 1965) y en 1978 se determinó la existencia de 25% de reactores en la Provincia de Buenos Aires (Etcheverrigaray et al., 1978). En 1979 se realizó el primer aislamiento a partir de un feto abortado (Etcheverrigaray et al., 1982), en 1984 se describieron brotes epizooticos de enfermedad nerviosa asociada a este virus (Nosetto et al., 1985) y en 1985 se realizó el aislamiento a partir de leucocitos de un equino con cuadro clínico respiratorio (Galosi et al., 1989). Desde ese momento han sido aisladas numerosas cepas, tanto de animales vacunados como de no vacunados.

El control de esta virosis se realiza por medio de vacunas atenuadas e inactivadas (Kirisawa et al., 1994). En Argentina, desde el año 1982, sólo está permitido el uso de vacunas inactivadas no existiendo ningún tipo de información sobre el uso de otro tipo de vacunas antes de esa fecha.

Distintos grupos de investigación han realizado varios estudios *in vivo* e *in vitro* para demostrar diferencias entre las cepas aisladas de fetos abortados y enfermedad neonatal de aquellas provenientes de casos respiratorios (Engels et al., 1986; Kirisawa et al., 1994). Las endonucleasas de restricción, útiles para detección de heterogeneidad entre los aislamientos virales han confirmado que el EHV-1 posee un genotipo simple y dos electroferotipos [1P y 1B] (Allen et al., 1983) aunque algunos autores hallaron cepas compuestas de variantes atenuadas y virus salvaje (Palfi y Christensen, 1995). El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas estructurales y no estructurales del virus aportan datos sobre diferencias de movilidad intratípicas (Allen et al., 1983). Los estudios en ratones lactantes demostraron que existen cuatro biotipos de acuerdo al organotropismo y patogenicidad, que no hay correlación con la patogenicidad en el equino y que los diferentes signos clínicos se deben a las condiciones del mismo (Allen et al., 1983; Nowotny et al., 1987; Palfi y Christensen, 1995; Patel y Edington, 1983).

El propósito del presente trabajo fue determinar el perfil proteico, el genotipo y el bioti-

po de 7 cepas de EHV-1 aisladas en Argentina entre 1979 y 1996 para determinar el grado de homogeneidad entre las mismas y establecer su correlación con la patogenicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

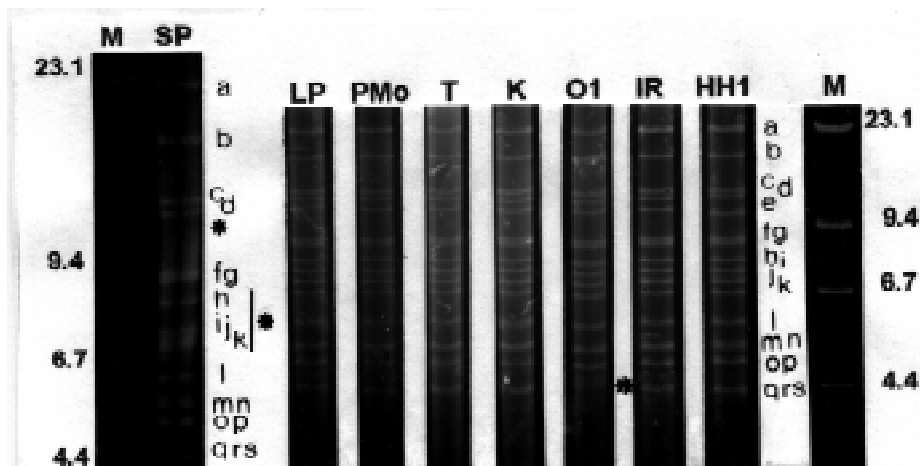
Virus y aislamientos virales: Se estudiaron siete cepas de EHV-1 aisladas en Argentina (Tabla N° 1). Las cepas SP y LP fueron aisladas en cultivos primarios de riñón de feto equino (EFK) y las restantes fueron aisladas en células de línea RK₁₃ (riñón de conejo). La cepa SP fue replicada 62 veces en células heterólogas; LP y PMo fueron replicadas 18 veces en células RK₁₃ y las restantes cepas fueron estudiadas a partir de su aislamiento. La cepa japonesa HH1, de electroferotipo 1P, fue incluida como cepa de referencia (Kawakami, Y, 1993).

Cultivos celulares: se utilizaron células RK₁₃ desarrolladas con Medio Mínimo Esencial (MEM) (Lab. Nissui, Japón) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos y antimicóticos. Para el mantenimiento de las células se usó el mismo medio de cultivo con 2% de SFB.

Extracción del ADN viral: monocapas de células RK₁₃ fueron infectadas con cada una de las cepas utilizando multiplicidad de infección (mdi) = 0,5. Cuando el efecto citopático (ECP) fue extensivo, las monocapas se levantaron, se lavaron con solución tamponada de fosfatos (PBS), se lisaron con TEN (100 mM de Tris-HCl pH 8,5, 12,5 mM de EDTA pH 8,0, 150 mM de ClNa y 1% de SDS) y luego se trataron durante 4 horas a 50° C con 0,2 mg/ml de Proteínasa K. El ADN fue extraído con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y luego precipitado con etanol puro (Echeverría et al., 1994).

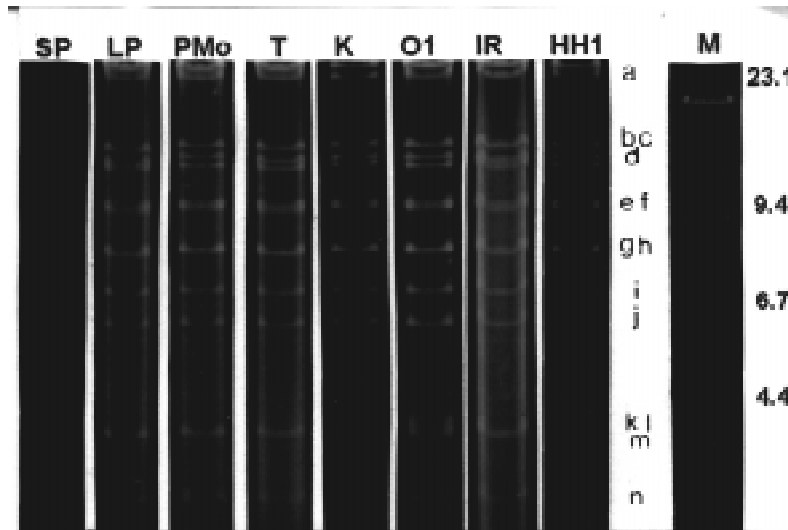
Análisis con endonucleasas de restricción (RE): aproximadamente 1,5 µg de ADN de cada una de las cepas fueron digeridos a 37° C durante toda la noche con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*III. Luego se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (140 x 150 x 5 mm) en solución de Tris-acetato (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 20 V durante 16 horas, se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml) y se visualizaron con luz UV.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): Monocapas de células RK₁₃ fueron infectadas con cada una de las cepas virales con mdi= 0,5 y mantenidas con MEM libre de SFB. Cuando el ECP fue generalizado, las células y los sobrenadantes se levantaron, se cen-



M: marcador de peso molecular (λ DNA digerido con *Hind*III) expresado en kilobases. La nomenclatura de los fragmentos se cita a la derecha de la cepa de referencia HH1. Los asteriscos indican las variaciones halladas.

Foto 1: Patrones de restricción del ADN obtenidos con *Bam* HI, de 10 cepas de EHV-1 aisladas en la Argentina entre 1979 y 1996.



M: marcador de peso molecular (λ DNA digerido con *Hind* III) expresado en kilobases. La nomenclatura de los fragmentos se cita a la derecha de la cepa de referencia HH1

Foto N°2: Patrones de restricción del ADN obtenidos con *Bgl*III, de 10 cepas de EHV-1 aisladas en la Argentina entre 1979 y 1996.

trifugaron y los paquetes celulares obtenidos se lavaron con PBS y se solubilizaron con Nonidet P-40 al 1% en TEN. Se procedió de la misma manera con células sin infectar como control (AgC). Estas muestras (Ags) fueron procesadas para trabajar en condiciones reducidas y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5% (170 x 190 x 1 mm) empleando un sistema de buffer discontinuo (Laemmli 1970) durante 7 horas a 30 mA. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie y se decoloraron en solución de metanol ácido.

Patogenicidad en ratones: Se utilizaron 7 ratones (cepa CF-1) de 3 días de edad por cada una de las cepas virales en estudio y 7 ratones como controles. Se inocularon vía intracerebral

(IC) utilizando 0,01 ml de cada suspensión viral clarificadas por centrifugación (DICT 50%= 10^{4.5} - 10^{5.0}) y sobrenadante de células no infectadas para el caso de los controles. Los ratones muertos en las primeras 48 horas post-inoculación (pi) no fueron considerados y aquellos que murieron y/o mostraron síntomas nerviosos a partir del tercer día pi fueron sacrificados y sus órganos (cerebro, pulmón, hígado, riñones y bazo) conservados a -70° C. Los ratones sobrevivientes fueron sacrificados a los 21 días pi. Todas las muestras se procesaron para el reaislamiento de las cepas y se inocularon sobre monocapas preformadas de células RK₁₃. Se realizaron tres pasajes ciegos antes de dar por negativa a la muestra.

Tabla N^a 1: Cepas de herpesvirus equino 1 (EHV-1) empleadas en este estudio.

CEPA VIRAL	LUGAR DE AISLAMIENTO	AÑO DE AISLAMIENTO	SIGNOS CLÍNICOS
SP	Buenos Aires	1979	Aborto
LP	Buenos Aires	1985	Rinoneumonitis
PMo	Buenos Aires	1990	Aborto
T	Tucumán	1990	Aborto
K	Comientes	1991	Aborto
O1	Buenos Aires	1991	Enfermedad neonatal
IR	Buenos Aires	1996	Aborto
HH1*	Japón	1967	Aborto

* Cepa japonesa de referencia

Tabla N^o 2: Clasificación de acuerdo a su patogenicidad en ratón (cepa CF-1) de 3 días de edad, de cepas de EHV-1 aisladas en Argentina entre 1979 y 1996.

GRUPO	CEPAS	MUERTE (días p.)	RE AISLAMIENTO VIRAL	
			cerebro	vísceras
A	HH1*, PMo, T, K, IR	5-7	+	+
B	SP	5-10	+	-
C	LP, O1	0	+	-

* Cepa japonesa de referencia

RESULTADOS

La foto 1 muestra los patrones de restricción obtenidos con *Bam*HI. La cepa SP puede ser diferenciada de las otras por la variación en la movilidad del grupo de fragmentos "h, i, j y k". Además esta cepa carece del fragmento "e" que está presente en el resto de los aislamientos aunque con diferente movilidad que la cepa de referencia HH1. El grupo "q, r, s" es similar en todas las cepas excepto en O1 en la que este grupo demuestra poseer menor movilidad.

En los electroferotipos con *Bg*III (Foto N^o2) puede observarse que la cepa SP se diferencia de las restantes por la movilidad del grupo de fragmentos "b, c, y d". Las cepas K y O1 demuestran una leve diferencia de movilidad del grupo "k, l y m" al igual que en la cepa HH1 aunque en este último caso, este grupo de fragmentos demuestra ser mas liviano.

Mediante el uso de la técnica de SDS-PAGE, los Ag de membranas celulares modificadas por la acción de cada uno de los virus en estudio y el AgC otorgaron un número elevado de bandas proteicas. La única diferencia hallada fue la pérdida de la banda correspondiente al peso molecular de 200 kD en las cepas SP y LP.

Por su patogenicidad en ratones lactantes las cepas fueron categorizadas de acuerdo a los siguientes criterios: letalidad (*), y capacidad de reaislamiento a partir de cerebro (**) y vísceras (***) (Nowotny et al., 1987; Palfi y

Christensen, 1995; Patel y Edington, 1983) tal como se demuestra en la Tabla N^o2.

En el grupo A se encuentran las cepas que mataron a la totalidad de los ratones y que pudieron ser reaisladas de cerebro y vísceras. En el grupo B se incluyen a las cepas que no mataron a la totalidad de los ratones (SP) y en el grupo C se presentan las cepas que no fueron letales (LP). En estos dos últimos grupos el virus sólo fue reaislado de cerebro.

DISCUSIÓN

El RE análisis con *Bam*HI demostró que todas las cepas pertenecen al tipo 1P y no se observan variantes 1B (Allen y Bryans, 1986). Los patrones de restricción no presentaron características de recombinaciones entre genomas 1P y vacunas atenuadas como hallaron otros autores (Meyer et al., 1987; Palfi y Christensen, 1995). No se demostró variabilidad en el fragmento "g" reafirmando que éste es altamente estable. Únicamente en la cepa SP se observó pérdida del fragmento *Bam*HI "e", lo que podría deberse al efecto de la mayor cantidad de pasajes de esta cepa en células heterólogas (Allen et al., 1983; Studdert et al., 1986). Las cepas restantes presentaron pequeñas diferencias de movilidad de algunos de los fragmentos de restricción.

En el estudio de movilidad de las proteínas, las variaciones halladas en la banda correspondiente a la glicoproteína (gp) de 200 kD

de PM en las cepas SP y LP confirman los datos aportados por otros grupos de trabajo que indican que esta gp es variable dentro del mismo tipo viral (Turtinen y Allen, 1982).

En concordancia con Patel y Edington (1983), las cepas de reducida letalidad y no letales (grupos B y C) sólo pudieron ser reaisladas de cerebro y a diferencia de otros autores no se encontraron cepas "no letales y no reaisladas" clasificadas en el grupo denominado D (Palfi y Christensen, 1995). Por otro lado, las cepas LP y O1, provenientes de casos clínicos diferentes en equinos presentaron las mismas características patogénicas para el ratón, reafirmando que no existe correlación entre las manifestaciones clínicas en equinos y la patogenicidad en ratón lactante.

Como conclusión del presente trabajo podemos inferir que no existen mayores diferencias entre los perfiles proteicos de las cepas

en estudio como así tampoco se observó correlación entre las variaciones halladas en los electroferotipos y la patogenicidad en el ratón.

Esta es la primera investigación epidemiológica de cepas argentinas de EHV-1. Debemos identificar y determinar en el futuro, la implicancia de la heterogeneidad hallada en los patrones de restricción del primer aislamiento realizado en el país.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por haber provisto gratuitamente los animales de experimentación utilizados en este estudio. Este trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional de La Plata y la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, G.P.; Yeargan, M.R.; Bryans, J.T. Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo virus passage. *Infection and Immunity* 1983; 40: 436-9
2. Allen, G.P.; Yeargan M.S.; Turtinen, M.S.; Bryans, J.T.; Mc Collum W.H. Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *American Journal Veterinary Research* 1983; 44: 263-71
3. Allen, G.P.; Bryans, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 1986; 2: 78-144.
4. Crabb, B.S.; Studdert, M. Equine herpesviruses 4 (Equine rhinopneumonitis virus) and 1 (Equine abortion virus). *Advances in Virus Research* 1995; 45: 153-90
5. Dimock, W.W.; Edwards, P.E.; Bruner, D.W. Infections observed in equine fetuses and foals. *Cornell Vet* 1947; 37: 88-9
6. Echeverria, M.G.; Norimine, J.; Galosi, C.M.; Oliva, G.A.; Etcheverrigaray, M.E.; Noretto, E.O.; Tohya, Y.; Mikami, T. The genotype of Aujeszky's disease viruses isolated in Argentina. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 1994; 56: 985-7
7. Engels, M.; Nowotny, N.; Metzler A.E.; Wyler R.; Burki, F. Genomic and antigenic comparison of an equine herpesvirus-1 (EHV-1) isolate from the 1983 lipizan abortion storm with EHV-1 reference strains. *Microbiologica* 1986; 9:221-34
8. Etcheverrigaray, M.E.; Sciutto, D.; Schudel, A.A.; Perez Azumendi, R. Rinoneumonitis equina I: detección de anticuerpos precipitantes en caballos de la provincia de Buenos Aires. *Revista Militar Veterinaria* 1978; 25: 173-5
9. Etcheverrigaray, M.E.; Oliva, G.A.; Gonzalez, E.T.; Noretto, E.O.; Martin, A.A. Comportamiento de una cepa de HVE-1 aislada de un feto abortado. *Revista Militar Veterinaria* 1982; 30: 138-9
10. Galosi, C.M.; Noretto, E.O.; Gimeno, E.J.; Gomez Dunn, C.; Etcheverrigaray, M.E.; Ando, Y. Equine herpesvirus-1 (EHV-1): characterization of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1989; 8,1:117-22
11. Kawakami, Y. The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan. *Archives of Virology* 1993; 129: 11-22
12. Kirisawa, R.; UI, S.; Takahashi, A.; Kawakami, Y.; Iwai, H. Comparison of the genomes of attenuated equine herpesvirus-1 strains with their parent virulent strain. *Virology* 1994; 200: 651-60
13. Laemmli, V. Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5
14. Matumoto, M.; Ishizaki, R.; Shimizu, T. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infections among horses in various countries. *Arch Ges Virusforsch* 1965; 50: 606-23
15. Meyer, H.; Hubert, P.H.; Eichhorn, W. Changes in restriction enzyme pattern of the Equine herpes virus type 1 (EHV-1) strain Rac H DNA during attenuation. *J Vet Med B* 1987; 34: 310-13
16. Noretto, E.O.; Monina, M.I.; Baschar, H.; Galosi, C.M.; Gallo, G.; Idiart, J.R.; Gimeno, E.J. Síndrome neurológico asociado a herpes virus equino tipo 1 (HVE-1). *Med Vet* 1985; 2: 583-8
17. Nowotny, N.; Burtscher, H.; Burki, F. Neuropathogenicity for suckling mice of Equine herpesvirus 1 from the Lipizzan outbreak 1983 and of selected other EHV 1 strains. *J Vet Med B* 1987; 34: 441-8
18. Palfi, V.; Christensen, L.S. Analysis of restriction fragment patterns (RFPs) and pathogenicity in baby mice of equine herpesvirus 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) strains circulating in Danish horses. *Veterinary Microbiology* 1995; 47: 199-204
19. Patel, J.R.; Edington, N. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology* 1983; 8: 301-5
20. Studdert, M.J.; Fitzpatrick, D.R.; Browning, G.F.; Cullinane, A.A.; Whalley, J.M. Equine herpesvirus genomes: heterogeneity of naturally occurring type 4 isolates and of a type 1 isolate after heterologous cell passage. *Arch Virol* 1986; 91: 375-81
21. Turtinen, L.W.; Allen, G.P. Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus type 1. *J Gen Virol* 1982; 63: 481-5