

DETECCIÓN RÁPIDA DEL VIRUS HERPES EQUINO-1 (EHV-1) POR LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A PARTIR DE TEJIDOS DE FETOS ABORTADOS

Dra. Cecilia M. Galosi*. 2000. Primer Premio (Dr. Carlos Soni) otorgado por la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD). Merlo, San Luís.

*Dra. en Ciencias Veterinarias, Bacterióloga Clínica e Industrial, Investigador Adjunto s/D de la CIC, Pcia de Bs.As.; Jefe de T. P., Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

cmgalosi@fcv.unlp.edu.ar

www.produccion-animal.com.ar

INTRODUCCIÓN

Los herpesvirus equinos 1 y 4 (EHV-1 y 4) son alfa herpesvirus que afectan a los miembros de la familia equidae. Se considera que el EHV-4 es la principal causa de rinoneumonitis mientras que el EHV-1 está asociado principalmente al aborto, enfermedad neonatal y síndrome neurológico aunque también produce sintomatología respiratoria. La infección por EHV-1 constituye un serio problema económico en los establecimientos de cría en Argentina. Al igual que otros herpesvirus, produce infecciones de tipo latente de manera que el animal se convierte en portador asintomático y eliminador del virus por lo que son necesarios métodos sensibles y rápidos para la detección del virus (1, 3, 4, 5).

El diagnóstico de EHV-1 se realiza usualmente por aislamiento del agente viral (AV) a partir de órganos de fetos abortados pero esta técnica consume mucho tiempo y además brinda resultados falsos negativos debido a los cambios posmortem que se producen en las muestras y que llevan a la inactivación del agente viral (9).

La técnica de PCR es un método sensible y rápido que ya ha sido desarrollada para el diagnóstico de esta virosis a partir de hisopados nasales y de muestras de tejidos frescos o embebidos en parafina (2, 6, 7, 8, 10)

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica de PCR útil para el diagnóstico de EHV-1 en la República Argentina, donde no existe legislación respecto a los métodos de eliminación de residuos químicos y donde no siempre las muestras llegan al laboratorio en buen estado de conservación por las distancias que deben recorrer. Se compararon los resultados con los obtenidos con el tradicional AV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 38 muestras de tejidos (20 de hígado, 8 de bazo y 10 de pulmón) provenientes de diferentes fetos abortados. Diecisiete de ellas llegaron al laboratorio en buen estado de conservación y las restantes 21 estaban en inadecuada conservación. Todos los tejidos se prepararon como homogenatos al 10% en Medio Mínimo Esencial (MEM) y se inocularon sobre células RK13 (riñón de conejo).

Los cultivos se incubaron a 37°C y se observaron hasta la aparición de efecto citopatogénico (ECP). Los cultivos que no mostraron ECP se pasaron dos veces mas antes de ser dados por negativos para AV. En la preparación de las muestras para PCR se analizaron diferentes métodos.

Se optó por la digestión de aproximadamente 50 mg de cada uno con Proteinasa K durante 1 hora a 60°C, seguido de tratamiento con ClNa 6M y precipitación final con etanol. El ADN obtenido se amplificó utilizando un par de cebadores que amplifican un segmento de 489 pares de bases (bp) correspondiente a la glicoproteína C (8, 9). Las condiciones de la PCR fueron optimizadas y estandarizadas (termociclador Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Los productos fueron electroforizados en un gel de agarosa y visualizados con luz UV luego de su tinción con bromuro de etidio. La especificidad de la reacción fue determinada por corte con enzimas de restricción (ER) y por hibridización con una sonda no radioactiva elaborada con una cepa de EHV-1 de referencia y con el análisis comparativo con ADN extraído de cepas de referencia de BHV-1 y SHV-1.

Se utilizó el índice de kappa para medir la concordancia entre el AV y la PCR.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El método de extracción del ADN viral resultó adecuado y no fue necesaria la extracción convencional con productos químicos de alto riesgo como la mezcla de fenol-cloroformo. Las muestras debieron diluirse 1:10 para reducir los factores inhibitorios de la reacción.

La visualización de una banda con el correcto peso molecular fue considerado un resultado positivo. La especificidad de la reacción fue confirmada por las ER y la sonda utilizada.

De las 38 muestras de tejidos fetales, 9 de hígado, 6 de bazo y 2 de pulmón bien preservadas y 8 de hígado, 1 de bazo y 4 de pulmón en mal estado de conservación fueron positivas por PCR. Solo a partir de 9 muestras de hígado, 5 de bazo y 2 de pulmón en buen estado de conservación fue aislado EHV-1. De ninguna de las muestras mal conservadas se aisló EHV-1.

El valor de kappa fue estimado en $k=0.60$ para hígado y pulmón y $k=0.75$ para bazo.

En el diagnóstico de las enfermedades virales el AV es considerado "la técnica de oro" sin embargo se puede demorar mucho tiempo en obtener los resultados y el éxito depende de la calidad de las muestras (3). Con el presente trabajo se implementa una técnica de PCR sensible, específica y de utilidad para la detección rápida del EHV-1 en muestras de fetos abortados de diferente calidad de conservación. El método de extracción de ADN estandarizado hace innecesario el uso de fenol-cloroformo que se usa corrientemente en la extracción de ADN viral.

La utilización de esta técnica es por eso muy importante para Argentina en donde no existen buenos métodos de eliminación de residuos químicos y las distancias recorridas por las muestras hasta el laboratorio de diagnóstico contribuyen a la inactivación del virus y a una baja eficiencia del AV.

Los datos aquí presentados indican que esta técnica de PCR es de excelente aplicabilidad en el diagnóstico de EHV-1 en nuestro país cuando no se puede recuperar el virus utilizando la técnica convencional.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Allen, G.P. & J.T. Bryans, 1986: Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2, 78-144.
- 2-Ballagi-Pordány, A., B. Klingeborn, J. Flensburg, S. Belak, 1990: Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 22, 373-381.
- 3-Edington, N., C.G. Bridges, A. Huclke, 1985: Experimental reactivation of equine herpesvirus 1 (EHV-1) following administration of corticosteroids. *Equine Vet. J.* 17, 369-372.
- 4-Galosi, C.M., J. Norimine, M.G. Echeverría, G.A. Oliva, E.O. Nosetto, M.E. Etcheverrigaray, Y. Tohya, T. Mikami, 1998: Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 771-774.
- 5-Galosi, C.M., E.O. Nosetto, E.J. Gimeno, C. Gomez Dunn, M.E. Etcheverrigaray, Y. Ando, 1989: Equine herpesvirus 1 (EHV-1): characterisation of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. *Rev. Scient. Tech. Off. Int. Epiz.* 8, 117-122.
- 6-Kirisawa R, A. Endo, H. Iwai, Y. Kawakami, 1993: Detection and identification of equine herpesvirus-1 and 4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 36, 57-67.
- 7-Mackie J.T., G.A. Macleod, G.H. Reubel, M.J. Studdert, 1996: Diagnosis of equine herpesvirus 1 abortion using polymerase chain reaction. *Aust Vet J.* 74, 390-391.
- 8-Rimstad, E., O. Evensen, 1993: The identification of equine herpesvirus 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Vet. Diag. Inv.* 5, 174-183.
- 9-Rimstad, E., B. Hyllseth, 1994: Equine Herpesviruses 1 and 4: Amplification and Differentiation by Polymerase Chain Reaction. *Acta Vet. Scan.*, 35, 303-306.
- 10-Sharma, P.C., A.A. Cullinane, D.E. Onions, L. Nicolson, 1992: Diagnosis of equine herpesvirus-1 and 4 by polymerase chain reaction. *Equine Vet J* 24, 20-25.