

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

1 9 8 2

ARTERITIS VIRAL EQUINA:

"DETECCION DE ANTICUERPOS EN POBLACIONES EQUINAS DEL PAIS"

Por el Médico Veterinario Edgardo Omar Nosetto\*

Director: Prof. Dra. María Elisa Etcheverrigaray

Cátedra de Virología Facultad de Ciencias Veterinarias-  
Universidad Nacional de La Plata.

(\* ) Becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de  
la Provincia de Buenos Aires.

### Mi reconocimiento

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por haberme incorporado a sus claustros.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas otorgadas que me permitieron la realización de este trabajo.

A Laboratorios Med-Vet por el apoyo material brindado.

### Mi agradecimiento

A la Dra. María E. Etcheverrigaray por la permanente orientación y guía personal en el desarrollo del trabajo.

A las Dras. Graciela Oliva y Ester Teresa González por la colaboración prestada en el manejo de las distintas técnicas, discusión de los resultados y corrección de la redacción final.

Al Med.Vet. Sergio Samus por la ayuda prestada en la compaginación del trabajo y su buena voluntad para colaborar en distintas tareas de apoyo.

Al personal técnico de la Cátedra de Virología, Sr. Derlys D'Andrea y Sta. María del Carmen Mondragón por la colaboración prestada y permanente buena disposición.

## ARTERITIS VIRAL EQUINA

### INTRODUCCION

Las enfermedades del tracto respiratorio de los equinos son uno de los problemas sanitarios más comunes en estos animales (37-66) Generalmente resultan de la infección con uno o más microorganismos patógenos (virus, bacterias y hongos). De estos, los virus parecen ser los agentes más comunmente involucrados en las -- epizootias de enfermedades respiratorias, algunas de las cuales pueden estar acompañadas por abortos (37) Varios virus asociados a las afecciones respiratorias han sido aislados y estudiados en distintos países, habiéndoselos clasificado dentro de las siguientes familias:

Herpetoviridae	(Virus Herpes Equino)
Adenoviridae	(Adenovirus Equino)
Togaviridae	(Arteritis Viral Equina)
Ortomyxoviridae	(Influenza)
Picornaviridae	(Rinovirus y Enterovirus)
Paramixoviridae	(Parainfluenza)
Reoviridae	(Reovirus)

De la revisión bibliográfica realizada para determinar los antecedentes en nuestro país sobre la existencia de estas virosis, surge que el primer aislamiento y clasificación corresponden al virus de la Influenza Equina Tipo I, realizado en el año 1977 (24-65), aunque en el año 1962 H. M. Fernandez (26) hace observaciones clínicas muy sugestivas.

Matumoto y colaboradores (49) en el año 1965 detectan por serología anticuerpos específicos contra el Virus Herpes Equino tipo I en sueros de equinos de la República Argentina. En el año 1978 (22) se describe el hallazgo de anticuerpos precipitantes en animales de la Provincia de Buenos Aires y en el año 1981 (23)

se comunica el aislamiento de este virus y su identificación por serología.

Información sobre las demás familias de virus patógenos para el tracto respiratorio del equino en nuestro país no se han encontrado.

Según informes presentados en el Simposio Sobre Enfermedades Respiratorias Equinas llevado a cabo en la Universidad del Estado de Ohio (EE.UU.) en mayo de 1980<sup>(64)</sup>, los estudios realizados en poblaciones equinas de los EE.UU. de Norteamérica mostraron que las afecciones respiratorias producidas por los agentes virales constituyen la mayor causa de pérdidas económicas en la industria equina de ese país.

Con respecto al virus de la arteritis viral equina, motivo de particular estudio en esta tesis, debemos señalar que hasta el presente solo se cuenta con un trabajo en nuestro país donde son descritos hallazgos histopatológicos<sup>(48)</sup> correspondientes a esta enfermedad.

Considerando la falta de información específica respecto a esta virosis y teniendo en cuenta que por las características clínicas es frecuente su confusión con las infecciones producidas por otros virus respiratorios, se encaró el presente trabajo cuyo principal objetivo es la detección de anticuerpos específicos en distintos lotes de animales con sintomatología clínica o sin ella. El logro de este objetivo, mediante la selección y aplicación de la metodología adecuada, posibilitará en el futuro llegar a un diagnóstico certero en distintos cuadros clínicos que pueden ser atribuidos a esta etiología.

#### ANTECEDENTES DE ARTERITIS VIRAL EQUINA

Hasta el año 1953 se consideraba que el agente etiológico de los abortos en yeguas con cuadros febriles y asociados con una sintomatología propia de una afección del tracto respiratorio, eran producidas por el Virus Herpes Equino tipo I (Rinoneumonitis

Equina). En diciembre del citado año en Bucyrus, Ohio (EE.UU.) se desató una epizootia en equinos, presentándose síntomas similares a los antes referidos<sup>(19)</sup> Al practicarse exámenes bacteriológicos en materiales de estos animales enfermos y de fetos abortados, los resultados fueron negativos. También se descartó la infección con el Virus de Rinoneumonitis Equina al no observarse las lesiones histopatológicas típicas en los tejidos analizados (cuerpos de inclusión intranucleares)<sup>(75)</sup>, pero se logró la reproducción experimental de la enfermedad inoculando material de los fetos abortados en yeguas preñadas<sup>(18)</sup> Del inóculo y de los animales que -- enfermaron experimentalmente fue aislado un virus, que fue diferenciado de la cepa Ky-B del virus de Rinoneumonitis Equina, siendo denominado cepa Bucyrus de Arteritis Viral Equina<sup>(18)</sup>.

El nombre de Virus de Arteritis Equina así como el de -- Arteritis Viral Equina dado a la enfermedad, se basaron en las constantes y características lesiones de las pequeñas arterias de los equinos infectados<sup>(18-40)</sup>. Previamente a ser designada con este nombre, varios autores<sup>(10-17-18-32-72)</sup> describieron a esta enfermedad, basándose en manifestaciones clínicas, con los nombres de fiebre tifoidea virémica, influenza catarral, ojo rosado, síndrome epizootico celulitis-ojo rosado.

Desde su aislamiento, el virus de Arteritis Viral Equina fue reconocido como una entidad nosológica distinta a los restantes virus del complejo de enfermedades respiratorias equinas<sup>(18)</sup>. Doll y colaboradores inicialmente lo diferenciaron basándose en test de protección cruzada en equinos y en técnicas de laboratorio como Fijación del Complemento y Seroneutralización y por las lesiones típicas que se producen en esta enfermedad y luego de su adaptación a cultivos de tejidos, por el efecto citopatogénico característico.

Luego de esta caracterización parcial, estos investigadores realizaron otros aislamientos del virus y estos resultaron idénticos a la cepa Bucyrus inicialmente obtenida<sup>(58)</sup>.

Posteriormente, dentro de los EE.UU., fue aislado en los

estados de California, Pensylvania e Indiana<sup>(58)</sup>

Burky<sup>(10)</sup> lo aisló en Europa luego de epizootias ocurridas en Austria y Suiza y lo caracterizó como un virus ARN que poseía envoltura lipoproteica. Posteriormente fue clasificado como miembro de la familia Togaviridae (6-25-30-31-42-77-78-80)

Los equinos son los únicos huéspedes susceptibles y actualmente se considera, basándose en evidencias serológicas, que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (2-11-16-28-29-58-61-62-66-72-73)

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO a-PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO CELULAR APROPIADO PARA EL DESARROLLO DEL VIRUS.

### a-1-MATERIALES Y METODOS

#### a-1-1-ORIGEN DE LAS CELULAS:

Se realizaron cultivos primarios de células de riñón de conejo y de células de riñón de hamster lactantes (53-79)

Los riñones de conejo fueron obtenidos de animales procedentes de la zona, con edades que oscilaban entre 1 y 5 días. Los riñones de hamster se obtuvieron de animales recién nacidos, provenientes del bioterio de la facultad. Se controló especialmente que todos los lotes de animales se encontraran clínicamente sanos.

#### a-1-2-MEDIOS DE CULTIVO:

Como medio de crecimiento celular se utilizó MEM Eagle (medio esencial mínimo de Eagle) de laboratorios GIBCO, con el agregado de 100 UI de penicilina por ml, 100 ug de estreptomina por ml y 25 ug de fungizone por ml y 10 % de suero bovino (SB) inactivado. Como medio de mantenimiento fueron utilizados los anteriores, reduciendo el suero bovino al 5 %. En algunos lotes de cultivos se investigó la conveniencia de agregar aminoácidos no esenciales (GIBCO) al medio de crecimiento para mejorar el desarrollo celular.

Para la dispersión de las células se utilizó tripsina (DIFCO) al 0,25% en solución salina reguladora de fosfatos (PBS), pH 7,4.

#### a-1-3-CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS:

Los riñones fueron extraídos de los animales recién sacri-

ficados, decapsulados y luego triturados en forma grosera, siendo colocados en un frasco trébol con el agregado de 3 partes de tripsina y en agitación magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente. También se practicó el método de tripsinado durante una noche a 4°C. Posteriormente se efectuó un filtrado por gasa y se centrifugó a 900 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular resuspendido en medio de crecimiento. Se sembraron a concentraciones de  $7 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células por ml en frascos Roux, Cuzco y tubos con laminillas, llevándose para su incubación a estufa a 37°C. Cada 48 horas se cambió el medio de crecimiento hasta la formación de una monocapa completa, procediéndose entonces a cambiar el medio de crecimiento por el de mantenimiento<sup>(51-53-60-74-79)</sup>

#### a-1-4-CULTIVOS CELULARES DE LINEA:

Se utilizaron células BHK-21 (riñón de hamster lactante)<sup>(33)</sup> y VERO (riñón de mono verde africano)<sup>(38-41)</sup> La línea BHK fue cedida por Lab. Med-Vet (La Plata) y las células VERO se obtuvieron en el laboratorio de virología del Instituto "Carlos Malbrán" de Buenos Aires y en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Monocapas de estas células fueron tripsinadas durante 10 ó 20 minutos a 37°C. Las células desprendidas fueron recogidas y centrifugadas a 900r.p.m. durante 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el paquete celular resuspendido en medio de crecimiento. Se sembraron a una concentración de  $3 \times 10^5$  células por ml. Al formarse una monocapa celular completa, se reemplazó el medio de crecimiento por el de mantenimiento.

#### a-1-5-OBSERVACION Y CONTROL DEL DESARROLLO CELULAR:

Los frascos sembrados con células fueron inspeccionados en forma directa con microscopio invertido. También se colorearon laminillas provenientes de tubos donde se desarrollaron las

células, fijándolas previamente con Carnoy durante 5 minutos. Las coloraciones se hicieron con Hematoxilina y Eosina, utilizando distintos tiempos de inmersión en estos colorantes para ajustar la técnica. El montaje sobre portaobjetos se hizo con bálsamo de Canadá.

a-1-6-CONSERVACION DE CELULAS POR CONGELAMIENTO:

Para conservar un stock de células se procedió a congelar parte de las mismas, procediéndose como se detalla<sup>(44-60)</sup>:

- 1°- A dos frascos Roux con una monocapa celular perfectamente formada, se procedió a quitarles el medio.
- 2°- Se les agregó 1 cc. de tripsina y se llevó a estufa a 37°C durante 5 minutos.
- 3°- Al despegarse las células se les agregó 10 ml. de medio MEM Eagle más 10 % de suero bovino y se recogieron con pipeta.
- 4°- Se centrifugaron 10 minutos a 1.000 r.p.m..
- 5°- Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se suspendió en 20 ml. de MEM Eagle más 10 % de SB.
- 6°- Se agregó a la suspensión 12 % de glicerina pura (MERCK).
- 7°- Se fraccionaron 2 ml. por ampolla, las que se sellaron.
- 8°- Se colocaron las ampollas en un tubo del termo de nitrógeno líquido y se lo sumergió en una probeta llena con alcohol 100°C.
- 9°- Se fueron agregando al alcohol pequeños trozos de hielo seco, controlando la temperatura para que esta descienda 1°C por minuto hasta los -30°C.
- 10°- Se llevó el tubo con las ampollas al termo con nitrógeno líquido.

OBJETIVO b-MULTIPLICACION DEL VIRUS DE AVE.

Adaptación a distintos sustratos celulares, estudio del efecto citopatogénico, determinación del título, etc.

## b-1-MATERIALES Y METODOS

### b-1-1-CULTIVOS CELULARES Y MEDIO DE CULTIVO:

Se eligieron como sustratos celulares más apropiados las líneas celulares BHK y VERO.

Los métodos de cultivo y los medios fueron descritos anteriormente.

### b-1-2-VIRUS:

Se utilizó una cepa vacunal derivada de la cepa Bucyrus del Virus de Arteritis Equina, cedida por el Dr. William McCollum de la Universidad de Lexington, Kentucky, EE.UU.

### b-1-3-INOCULACION DE CULTIVOS CELULARES:

Luego de la formación de una monocapa celular completa, fue eliminado el medio de crecimiento y se inocularon 0,2 ml de la suspensión viral en los tubos de cultivo y 1 ml. en los frascos Roux. Se llevaron a estufa a 37°C durante 60 minutos para permitir la adsorción viral y luego se agregaron 2 ml. de medio de mantenimiento en los tubos y 60 ml. en los Roux. Se incubaron a 37°C en estufa.

En tubos y frascos testigos se procedió de igual manera, sustituyéndose el inóculo viral por medio de mantenimiento.

### b-1-4-CONTROL DEL DESARROLLO VIRAL:

Cada 24 horas se tomaron laminillas de los tubos inoculados y testigo y se colorearon con la técnica detallada anteriormente, observándose la evolución del efecto citopatogénico. Asimismo se fueron realizando lecturas directas por medio del microscopio invertido.

### b-1-5-TITULACION DEL VIRUS:

Luego de 10 pasajes del virus por BHK y 6 pasajes por VERO,

fue titulado por el método de Reed y Muench.

Para la titulación en BHK se utilizaron tubos de cultivo, procediéndose de acuerdo al siguiente método<sup>(60)</sup>:

- 1°- Se colocaron en una gradilla 10 tubos de Kahn.
- 2°- En cada uno de ellos se colocó 0,9 ml de PBS como diluyente.
- 3°- En el primer tubo se agregó 0,1 ml. de la suspensión viral, obteniéndose una dilución de  $10^{-1}$ .
- 4°- Con una nueva pipeta se homogeneizó con el diluyente y se llevó 0,1 ml. al segundo tubo, obteniéndose una dilución  $10^{-2}$ .
- 5°- Se efectuó el mismo trabajo con los tubos subsiguientes, obteniéndose así, diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ...  
... $10^{-9}$
- 6°- Se inocularon 5 tubos con monocapa celular completa con cada dilución.
- 7°- Se dejaron tubos controles con células más virus sin diluir y células más medio de mantenimiento.
- 8°- Se dejó 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la adsorción viral agregando luego medio de mantenimiento y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 9°- Se controlaron diariamente los tubos hasta el 6° día, en que se dió por finalizada la experiencia.

Los datos obtenidos se analizaron por el método de Reed y Muench, obteniéndose un título de  $10^{5.75}$  DICT<sub>50</sub>/0,2 ml.

Se repitió esta experiencia, tres veces obteniéndose resultados similares.

Para la titulación viral en células VERO fueron utilizadas placas Falcon de 96 microcubetas con fondo plano para cultivos celulares.

Las diluciones virales se realizaron de la misma forma que para BHK. Se agregó a cada cavidad de la microplaca 50ul de las

sucesivas diluciones virales y luego 100  $\mu$ l de una suspensión de células VERO a una concentración de  $2 \times 10^5$  cel/ml.

Las placas fueron selladas con un film autoadhesivo y llevadas a estufa a 37°C.

En todos los casos se trabajó con los correspondientes controles y se utilizaron 5 tubos por dilución viral para BHK y ocho cubetas por dilución para VERO.

Las lecturas se efectuaron cada 24 horas en microscopio invertido hasta el 6º día en que se realizó la lectura final.

OBJETIVOS c-d-DESARROLLO DE UNA PRUEBA SEROLOGICA PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN POBLACIONES EQUINAS.  
OBTENCION DE MUESTRAS DE SUEROS EQUINOS.

c-d-1-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA<sup>(3-14-38-39)</sup>

c-d-1-1-MATERIALES

CULTIVOS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVOS:

Se emplearon células BHK. Los métodos de cultivo y medios necesarios fueron descriptos previamente.

VIRUS:

Los tubos con monocapas fueron inoculados con la suspensión viral de título  $10^{5.75}$  DICT<sub>50</sub>/0,005 ml. A las 16, 24, 48 y 72 horas post inoculación se fijaron laminillas inoculadas y testigo en acetona (Merck) a -20°C durante 12 horas, luego de este lapso se eliminó la acetona, se secaron a 37°C durante 15 minutos y se conservaron a -20°C.

SUEROS MARCADOS:

Se utilizó un suero antiglobulinas equinas marcado con isotiocianato de fluoresceina de laboratorios Cappel, diluido 1/8 en agua destilada.

SUEROS CONTROL DE REFERENCIA:

Los utilizados fueron cedidos por el Dr. W. McCollum, Kentucky, EE.UU., siendo ellos:

- 1) Suero positivo para AVE y negativo para otras virosis.
- 2) Suero negativo para AVE y negativo para otras virosis.

SUEROS A ANALIZAR:

El banco de sueros equinos se formó con muestras provenientes de:

AMERICAN TROTTER: Hurlingam	10
Partido de La Plata	5
La Carlota (Córdoba)	35
SANGRE PURA DE CARRERA:	
Hipódromo de La Plata	16
2 haras Partido de La Plata	54
1 haras de Pcia. de Santa Fé	6
MESTIZOS:	
Partido de Zárate	16
Magdalena	2
Haras Partido Berazategui	11
Partido de La Plata	6
Pcia. de Corrientes	69
CRIOLLOS:	
Partido de Rojas (Bs.As.)	5
TOTAL:	<hr/> 235

De estas 235 muestras, 61 correspondieron a animales con sintomatología similar a la referida para esta enfermedad y 174 a animales sin sintomatología clínica de ningún tipo.

Fueron analizadas por esta técnica 163 muestras previamente descomplementadas a 56°C durante 30 minutos.

c-d-1-2-METODO

I) Se fijaron las laminillas a un soporte y se las cubrió

con una gota de suero equino a analizar diluido 1/2 con PBS. Como controles se utilizaron sueros positivos y negativos de referencia y PBS, sobre laminillas inoculadas y sin inocular.

II) Se incubaron durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda.

III) Se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos cada vez y por último con agua destilada durante 5 minutos.

IV) Se cubrieron todas las laminillas con una gota de suero antiespecie marcado y se incubaron durante 45 minutos a 37°C.

V) Se repitieron los lavados del punto III.

VI) Se montaron sobre portaobjetos con glicerina al 50 % en PBS.

VII) Se observaron en Microscopio de fluorescencia marca Leitz.

c-d-2-FIJACION DEL COMPLEMENTO (1-4-27-60)

c-d-2-1-MATERIALES

#### COMPLEMENTO DE COBAYOS:

Fue obtenido por punción cardíaca de cobayos adultos en ayunas. La sangre obtenida fue colocada a 37°C durante 30 minutos para favorecer la coagulación y luego llevada a 4°C durante una noche. Los sueros obtenidos fueron mezclados y fraccionados a razón de 0,5 ml por frasco y luego de rotularlos fueron conservados a -20°C.

#### SUERO HEMOLITICO:

Se trabajó con suero hemolítico anti-globulos de carnero, de laboratorios Britania.

#### GLOBULOS ROJOS DE OVINO:

Se obtuvieron sangrando una oveja y recogiendo la sangre en solución de ALSEVER (Solución Salina Citratada), para su conservación. Se centrifugaron para eliminar el Alsever y luego se lavaron tres veces con STVS (Solución Tampón de Veronal Sódico, pH 7,3). Se preparó una suspensión al 4 % en esta misma solución salina (0,8 ml de pasta de glóbulos rojos más 19,2 ml de STVS).

#### MEZCLA HEMOLITICA:

Para preparar la mezcla hemolítica (MH) se tomaron partes iguales de suero hemolítico en la dilución apropiada y glóbulos rojos ovinos al 4. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos y luego se llevó a 4°C.

#### ANTIGENOS:

Se obtuvieron 3 antígenos:

ANTIGENO I: Constituido por el líquido sobrenadante de un cultivo celular BHK inoculado con el 8° pasaje de virus de Arteritis Equina de título  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/0,2 ml que fue congelado y descongelado 3 veces para producir la ruptura celular y consiguiente liberación de viriones. La suspensión resultante fue centrifugada durante 10 minutos a 2.000rpm. El sobrenadante fue conservado a -20°C.

ANTIGENO II: Constituido por el antígeno I concentrado al doble en PEG 600 al 20 % (Polietilen Glicol 600).

ANTIGENO III: Fue obtenido de una monocapa celular VERO inoculada con el 16° pasaje del virus y con un título de  $10^6$  DICT<sub>50</sub>/0,05 ml. Una vez manifiesto el efecto citopatogénico se desprendió la monocapa del vidrio por raspado y la suspensión fue centrifugada a baja velocidad durante 10 minutos. El paquete celular fue resuspendido con 5 ml de sobrenadante

y el resto de éste se conservó refrigerado. La suspensión fue sonicada durante 2 minutos a 100 W (Sonicator Hear Systems) y centrifugada a baja velocidad durante 10 minutos. El sobrenadante fue mezclado en partes iguales con el obtenido en primer término, constituyendo esta mezcla el tercer antígeno.

#### SUEROS CONTROL DE REFERENCIA:

Fueron citados en el punto c-d-1-1.

#### SUEROS A ANALIZAR:

De las 235 muestras de suero citadas en el punto c-d-1-1 se analizaron por esta técnica 150 muestras que fueron previamente descomplementadas a 56°C durante 30 minutos.

#### c-d-2-2-METODOS:

##### TITULACION DEL COMPLEMENTO Y DEL SUERO HEMOLITICO:

Se prepararon diluciones del complemento (C'): 1/20, 1/40, 1/50, 1/80, 1/100, 1/160, 1/320.

El suero hemolítico (SH) se diluyó en la siguiente escala: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600 y 1/3.200.

En una placa de microtitulación de 96 cubetas, se colocaron 2 gotas (se trabajó con pipetas de 0,025 ml para todos los materiales) de STVS en cada pocillo y tres gotas en los controles. En cada columna vertical se colocó una gota de cada dilución de C' menos en la de control de glóbulos rojos (GR). Se selló con un film autoadhesivo y fue llevada a 4°C durante una noche. Al día siguiente se pusieron las placas a 37°C durante 15 minutos y luego se agregó una gota de GR en los controles y una gota de MH en las columnas horizontales correspondientes a cada dilución. Se llevaron a 37°C durante 30 minutos agitando cada 5 minutos y luego se colocaron a 4°C para permitir que precipiten los GR en los pocillos donde no hubo hemólisis.

## TITULACION DE LOS ANTIGENOS Y SUERO PATRON:

Se prepararon diluciones en tubos de los antígenos en la siguiente escala: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128.

El suero se diluyó: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256.

Por otro lado y trabajando en frío, se prepararon las diluciones de C' correspondientes a 2 U para la reacción y 1 U y 1 1/2 U para los controles.

Las microplacas se rotularon de la siguiente manera:

## DILUCIONES - SUERO

	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	CA	C.C'			CGR
									1U	1 1/2U	2U	
D												
I												
L												
U												
C												
I												
O												
N												
A												
N												
T												
I												
G												
E												
N												
O												

Se colocó: 1 gota de STVS en los controles de suero y antígenos, 2 gotas en los controles de C' y 3 gotas en los controles de GR. En los pocillos correspondientes a las diluciones de suero y antígeno, se colocó una gota de ambos en las diluciones indicadas para cada uno de ellos.

La dilución de 2 U de C' fue agregada en todas las cavidades menos en los controles de GR y en los controles de C' correspondientes a 1 U y 1 1/2 U, donde se agregaron estas diluciones. Se sellaron las placas y se llevaron a 4°C durante 18 horas. Pasado este lapso, se llevaron a estufa a 37°C durante 15 minutos y luego se agregó en todas las cavidades 1 gota

de MH, menos en los controles de GR donde se agregó una gota de la suspensión de GR al 2 %.

Se incubó a 37°C durante 30 minutos agitando periódicamente y luego se colocaron a 4°C durante 30 minutos para luego realizar su lectura.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

#### TITULACION DE SUEROS PROBLEMA:

Se diluyó cada suero (descomplementado a 56°C durante 30 minutos) como sigue; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256.

Las microplacas se rotularon de la siguiente manera:

#### DILUCIONES - SUEROS

SUERO Nº	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	C S	C C'		
										1 U	1 1/2 U	2 U
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
C GR												

Se colocó una gota de STVS en los controles de suero, 2 gotas en los controles de C' y 3 gotas en los controles de GR.

En las columnas correspondientes a cada suero se colocó una gota de las diluciones debidas (en controles de sueros la dilución 1/2). Se agregó 1 gota de antígeno en la dilución correspondiente, en todas las cubetas menos en controles. Por último se agregó una gota de las 2 U de C' menos en controles de C' y GR. En controles de C' se colocó una gota de 1 U y

1 1/2 U de complemento donde correspondía. Se sellaron y llevaron a 4°C una noche.

Se realizó igual prueba con los mismos sueros, pero realizando las diluciones de los mismos con microdiluidores en la misma placa, para comparar los resultados con las diluciones hechas en tubos.

Al día siguiente se agregó una gota de GR en los controles de estos y una gota de MH en todas las demás cubetas. Se llevó 30 minutos a 37°C agitando periódicamente y luego a 4°C para realizar por último la lectura final.

#### c-d-3- SERONEUTRALIZACION

c-d-3-1-BAJO CAPA DE AGAR<sup>(33-43)</sup>

c-d-3-1-1-MATERIALES

#### CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron células BHK. Fueron preparadas en frascos Cuzco empleando las técnicas y medios descriptos previamente.

#### VIRUS:

Se empleó el 6° pasaje del virus de AVE en BHK, con un título de  $10^5 \text{DICT}_{50}/0,2 \text{ ml}$ . Fue utilizado a una dilución  $10^{-2}$ , es decir 1.000 partículas infectivas por 0,2ml.

#### DILUYENTES:

Para tal fin se preparó una solución de medio MEM Eagle con el agregado de 2 % de suero bovino y antibióticos. Se utilizó como diluyente de sueros y de virus.

#### MEDIO AGAR:

Se utilizó agar noble DIFCO al 1 % en medio de mantenimiento (MEM + 5% SB + antibiótico)

#### COLORANTES:

Se empleó una solución de cristal violeta al 10 % en formalina al 10 para colorear células vivas.

SUEROS CONTROL DE REFERENCIA:

Fueron citados en el apartado c-d-1-1.

SUEROS A ANALIZAR:

Se analizaron por esta técnica los sueros positivos por IF y FC.

c-d-3-1-d-METODO

El método empleado fue el de virus constante-suero variable, procediéndose de la siguiente manera:

- I.- Se colocó en 7 tubos 0,5 ml de la solución viral.
- II.- Se efectuaron diluciones del suero 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128.
- III.- Se agregó 0,5 ml de las diluciones de suero a cada uno de los tubos con 0,5 ml de la dilución viral  $10^{-2}$ .
- IV.- Se colocaron las mezclas durante 60 minutos a 37°C para permitir la unión antígeno-anticuerpo.
- V Se inocularon 3 frascos Cuzco con monocapa celular completa BHK por dilución de suero.
- VI.- Se dejaron las monocapas inoculadas durante 60 minutos a 37°C para permitir la adsorción del virus no neutralizado.
- VII.- Se eliminó el inóculo y se lavaron las monocapas con PBS.
- VIII.- Se cubrieron con 5 ml del agar al 1 % en MEM, que fue mantenido a 40°C en estado líquido.
- IX.- Luego de solidificar el agar, se llevaron a estufa a 37°C durante 96 horas.
- X Se procedió de igual manera con frascos monocapa BHK sin inocular que actuaron como testigos
- XI.- Luego del período de incubación se cubrió la capa de agar con formalina al 10 % durante 15 minutos para remover el agar.
- XII.- Luego de eliminado el agar las monocapas fueron cubiertas con la solución de cristal violeta.
- XIII.- Se procedió al conteo de placas de lisis formadas.

c-d-3-2-MICROTECNICA (60-61)

c-d-3-2-1-MATERIALES

CULTIVOS CELULARES:

Se utilizaron células VERO con técnicas y medios ya descritos.

DILUYENTES:

Se emplearon los mismos utilizados en la anterior técnica.

VIRUS:

Se utilizó virus del 6° pasaje por VERO con un título de  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/0,05 ml. Se empleó la dilución  $10^{-2}$ , (1.000 partículas infectivas x 0,05 ml).

SUEROS CONTROL DE REFERENCIA:

Fueron los mismos citados en el apartado c-d-1-1.

SUEROS A ANALIZAR:

Fueron analizados por esta técnica todos los sueros que resultaron positivos por IF y FC'.

c-d-3-2-2-METODO

Se trabajó con el método de virus constante-suero variable. Las diluciones de suero y virus fueron realizadas de igual manera que en el anterior método al igual que la incubación durante 60 minutos para permitir la unión antígeno-anticuerpo. Luego se procedió como sigue:

I.-En una placa Falcon 3040 de fondo plano, con 96 cavidades (12 x 8), se colocaron 50 microlitros de la mezcla suero virus en cada cavidad. Se utilizaron 4 cavidades por dilución de suero.

II.-Se agregó a cada cavidad 100 microlitros de una suspensión de células VERO a una concentración de  $2 \times 10^5$  cel./ml.

III.-En la misma placa se efectuó una titulación simultánea

del virus para comprobar si se había utilizado la dilución correcta. También se utilizaron controles de células sin inocular.

IV.-Se secó la superficie de la placa con papel de filtro estéril y se selló con un film autoadhesivo. Se incubó a 37°C en estufa leyéndose diariamente para observar la aparición del efecto citopatogénico.

## RESULTADOS

OBJETIVO a. Tanto las células de riñón de hamster como de conejo formaron monocapas completas a los 7-8 días de la siembra. De los riñones de conejos de 6 a 7 días de edad se obtuvieron las mejores monocapas; los recién nacidos brindaron pocas células y los de mayor edad demandaron más tiempo de tripsinado.

En el medio de cultivo adoptado las células desarrollaron perfectamente. El agregado de aminoácidos no esenciales no influyó en el desarrollo de cultivos primarios ni de BHK, pero fue necesario para VERO.

Se obtuvieron mejores resultados con el tripsinado de los riñones durante 30 minutos a temperatura ambiente que durante toda la noche a 4°C. Realizando por el primer método 3 ó 4 tripsinados sucesivos, el primero generalmente debió ser eliminado por contener muy escasa cantidad de células y elevada concentración de glóbulos rojos.

La cantidad óptima de células a sembrar en cultivos primarios es de  $1 \times 10^6$  por mililitro, cuando se utilizó una concentración menor de células el desarrollo de la monocapa fue muy lento o no se logró. En el caso de las líneas celulares fue suficiente una concentración de células de  $3 \times 10^5$  por mililitro.

La distinta velocidad de desarrollo de las células de línea utilizadas hizo que la frecuencia de cambio de medios fueran adaptadas a cada una de ellas. Agregando 10 % de suero bovino al medio de mantenimiento pudieron ser mantenidas a temperatura ambiente por 12 ó 15 días.

Las mejores coloraciones de células se obtuvieron con inmersión de 3 minutos en hematoxilina y 2 minutos en eosina. Con ello fue posible la observación de detalles de núcleo y citoplasma (FOTO N° 7 y 9).

La congelación de células nos permitió conservar un

lote de éstas para ser utilizadas en el momento necesario. El método empleado dio buenos resultados, comprobándose la viabilidad celular al abrir ampollas a tiempos variables (24 horas, 7 días, 30 días y 180 días) luego de la congelación y sembrándolas para observar su desarrollo.

OBJETIVO b. Con los pasajes realizados del virus, dentro de las 48 horas posteriores a la inoculación, no fue posible observar en microscopio invertido ni en laminillas teñidas con hematoxilina y eosina alteraciones de las células de la monocapa. Recién a partir de las 48 horas comenzaron a verse células alteradas en las monocapas inoculadas y no en las testigo. Estas alteraciones se fueron acentuando hasta el 6°- 8° día post inoculación, para terminar con el desprendimiento de las células del vidrio.

Los cambios citopáticos se caracterizaron inicialmente por redondeamiento y vacuolización de las células y por un aumento de la densidad del citoplasma. Estos cambios fueron seguidos por picnosis, cariorrexis y necrosis de las células que se desprendieron del vidrio y quedaron flotando en el medio de cultivo.

En concordancia con lo citado en la bibliografía, no fueron observados cuerpos de inclusión intranucleares ni citoplásmicos.

El efecto citopatogénico fue similar en todos los sistemas celulares utilizados y constante a través de sucesivos pasajes ( FOTOS N° 2-6-8-10).

#### TITULACION VIRAL:

En ambos sistemas celulares se efectuó la lectura final a los 6 días post inoculación. Se comprobó la presencia de efecto citopatogénico en las células inoculadas y el desarrollo normal de los testigos.

Al analizarse los resultados por el método de Reed y Muench, se determinó que en el 10° pasaje del virus por BHK, el título fue de  $10^{5.75}$  DICT<sub>50</sub>/0,2 ml. (Dosis infectantes cultivo de tejido 50 %).

El título del 6° pasaje por VERO fue de  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/0,05ml.

OBJETIVOS c.d. INMUNOFLUORESCENCIA:

Se observó un granulado muy fino de color amarillo verdoso en el citoplasma celular. Esta fluorescencia comienza en la periferia del núcleo, principalmente en los polos nucleares. En las células fijadas a las 48 horas ó 72 horas post inoculación el área de fluorescencia se extiende a casi todo el citoplasma (FOTOS N° 11 y 12).

El resultado del análisis de las 163 muestras de sueros analizados por esta técnica se detallan en el siguiente cuadro:

Figura N° 1 Análisis de sueros equinos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de Anticuerpos contra AVE.

Inmunofluorescencia

RAZA	N° SUEROS	+	
AM. TROT.	49	5	44
SPC	74	1	73
MESTIZOS	35	7	28
CRIOLLOS	5		5
TOTAL	165	13	150

FIJACION DEL COMPLEMENTO:

Titulación del complemento y suero hemolítico:

Se obtuvo un título del complemento de 1/100 y del suero hemolítico 1/400.

Titulación de antígenos y suero patrón:

Los antígenos I y II no fueron aptos para su utilización en la reacción, dado que enfrentándolos a sueros positivos de referencia no se produjo reacción específica dejando libre suficiente cantidad de C. que fue utilizado por la MH visualizándose en todos los casos una nítida hemólisis.

El antígeno III dio, en cambio, un título de 1/32 y fue el de elección para esta prueba. El suero patrón dió un título de 1/64.

Titulación de sueros problema:

De los 150 sueros analizados por esta técnica, resultaron 20 positivos y 130 negativos. Se consideraron positivos aquellos con un título superior a 1/4. Los títulos variaron entre 1/8 y 1/64. En el siguiente cuadro se detallan estos resultados.

Figura N° 2 Análisis de sueros equinos por la técnica de fijación del complemento para la detección de anticuerpos contra AVE.

Fijación del complemento

RAZA	Nº SUEROS	+	
AM. TROT.	45	5	40
SPC	8	2	6
MESTIZOS	92	13	79
CRIOLLOS	5		5
TOTAL	150	20	130

Figura N° 3 Análisis de sueros equinos por las técnicas de Fijación del Complemento e Inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra AVE.

RAZA	+		TOTAL	% de +
AM. TROT.	5	45	50	
SPC	2	74	76	
MESTIZOS	15	89	104	
CRIOLLOS		5	5	
TOTAL	22	213	235	9,36

#### SERONEUTRALIZACION

Fueron puesta a punto las técnicas de (SN) seroneutralización bajo capa de agar y en microcubetas. Los resultados obtenidos en ambas fueron similares, pero la segunda ofreció las ventajas de ser más práctica y requerir menos elementos que la primera por lo que la mayoría de los sueros fueron analizados por la microtécnica.

Todos los sueros positivos a cualquiera de las otras dos técnicas (IF y FC) fueron analizados y confirmada su positividad por SN (22 muestras).

Del total de 235 sueros, 61 provenían de animales con una sintomatología similar a la producida por AVE y analizados por las tres Técnicas (IF, FC y SN) y 174 muestras de animales sin síntomas.

Del total de 22 sueros positivos, solamente 1 provenía de un animal con sintomatología.

Figura N° 4 Análisis de Sueros provenientes de animales con sintomatología y sin sintomatología para AVE.

	Con sintomatología	Sin sintomatología	TOTAL
+	1	21	22
	60	153	213
TOTAL	61	174	235

## DISCUSION

La técnica empleada en la obtención de cultivos celulares primarios de riñón de hamster y conejo, nos permitieron obtener monocapas completas a los 7 8 días. Estos cultivos primarios pudieron ser conservados por un tiempo relativamente largo (3 ó 4 semanas) con cambios periódicos de medio. A partir de ellos por tripsinado se obtuvieron subcultivos. Estos presentaron la ventaja de ser más uniformes que los cultivos primarios y a su vez desarrollaron más rápidamente.

Cuando se trabajó con riñones de hamster y conejos recién nacidos o de pocos días de edad, la realización de 3 ó 4 tripsinados a temperatura ambiente, hasta la digestión completa del triturado del órgano, si bien más laboriosa, resultó más satisfactoria que cuando se efectuó un solo tripsinado a 4°C durante una noche.

Los cultivos celulares de línea presentaron una mayor velocidad de desarrollo. En 48 horas fue posible contar con una monocapa completa que se presentaba sumamente uniforme y pudieron ser mantenidos a temperatura ambiente con medio de crecimiento durante 3 semanas.

El trabajo a realizar en los distintos pasos para multiplicar las células de líneas son menores, reduciendo esto los riesgos de contaminación por microorganismos. A esto debe agregarse que la obtención y mantenimiento de animales de los cuales se obtuvieron los riñones, como los materiales utilizados con las técnicas empleadas, resultan mucho más onerosos que el mantenimiento de líneas celulares, por lo cual decidimos el empleo de estas últimas en en trabajo de rutina del laboratorio, dejando a los cultivos primarios para casos especiales, como intento de aislamiento viral.

El virus propaga rápidamente en las líneas celulares utilizadas (VERO y BHK-21) ya que estas células poseen una alta susceptibilidad al virus AVE y esto concuerda con lo citado por varios autores (38-41-46)

La cepa vacunal de virus de AVE utilizada en la experiencia se encontraba adaptada a células de riñón de conejo por lo que se le efectuaron 3 pasajes en estas células, siendo luego replicado en las células de línea antes citadas, observándose luego de 10 pasajes en BHK y 6 pasajes posteriores en VERO, la aparición de un ECP similar al observado en células de riñón de conejo y al citado en la bibliografía (41-51-46-53-79)

La titulación del virus en células VERO se realizó en microcubetas y con BHK en tubos. La primer técnica es más práctica y económica pero es difícil de llevar a cabo con células BHK debido a que estas células crecen muy rápidamente y tienen un alto metabolismo, que acidifica mucho el medio, por lo que no es posible mantenerlas por varios días en buen estado si no se cuenta con una incubadora de bióxido de carbono.

El virus se conservó congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el tiempo en que duró la experiencia (24 meses) no observándose una pérdida apreciable del Título.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos en sueros fue puesta a punto en primer término. Fue posible observar fluorescencia en las células fijadas a partir de las 16 horas post inoculación. A partir de este momento las células contienen el suficiente antígeno viral como para ser observado, por esta técnica se pudo observar un granulado amarillo-verdoso en la región perinuclear del citoplasma.

Esto está de acuerdo a los hallazgos, citados en la bibliografía<sup>(21)</sup>, hechos por microscopía electrónica, en que el virus se ubica en las cisternas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi, por lo cual solo es observado en citoplasma y en la región perinuclear en las primeras horas post infección. También hay concordancia con lo citado por Van der Zeijst<sup>(78)</sup> con respecto a la cinética de replicación viral. De acuerdo a los resultados obtenidos por este autor, la síntesis de RNA comienza a las 4 horas post infección produciéndose la liberación de la progenie viral a partir

de las 13 horas post infección. La fluorescencia nunca fue observada en los núcleos.

A las 24 horas PI una gran cantidad de células se presentan con fluorescencia, habiendo elegido nosotros este período post infección para la fijación de las células con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por ser de más fácil visualización.

El antígeno de AVE se puede demostrar fácilmente por esta técnica, la metodología no es complicada aunque resulta onerosa.

La técnica de fijación del complemento resulta más laboriosa hasta la estandarización de todo el sistema y la obtención de un buen antígeno. Luego de ello es posible analizar un número alto de sueros en poco tiempo y obtener el título de anticuerpos presentes en el suero.

Para la obtención de un antígeno para esta prueba, se -- procedió de acuerdo a lo citado en la bibliografía (27-59) no obteniéndose buenos resultados al tratar de liberar antígeno de las células por congelados y descongelados sucesivos.

Recién nos fue posible obtener un antígeno con el suficiente título al romper las células por sonicación.

Una vez puestas a punto la metodología a emplear y estandarizados los reactivos, esta técnica resulta más práctica que la anterior al permitir analizar un mayor número de sueros en menos tiempo y a su vez es más económica.

La seroneutralización fue realizada en tubos, bajo capa de agar y en cubetas (microtécnica). Los dos primeros métodos se llevaron a cabo en una primera etapa a fin de adquirir experiencia en el manejo del material y una vez estandarizada se las consideró como patrones de referencia para la ejecución de la microtécnica de seroneutralización. Esta demostró ser más práctica que las anteriores y nos permitió una gran economía de tiempo y materiales, considerando que los resultados son comparables, trabajando siempre con los respectivos controles de virus y sueros de referencia.

Varios autores (36-62-68-69-70) citan que es necesario,

para que los anticuerpos neutralicen al virus, la presencia de complemento, pero ello no es necesario para el virus altamente modificado (27); nosotros, trabajando con complemento, solamente hemos obtenido un pequeño aumento de la capacidad neutralizante de los sueros.

Por esta técnica confirmamos la positividad de los sueros que habían resultado positivos previamente a las técnicas de inmunofluorescencia y fijación del complemento.

Consideramos, por lo expuesto, que para las condiciones de nuestro laboratorio, la prueba de fijación del complemento es la técnica más apta para ser utilizada en el diagnóstico de rutina de arteritis viral equina.

De las 235 muestras de sueros analizados, 165 lo fueron por inmunofluorescencia indirecta y 150 por fijación del complemento, siendo 70 de ellos analizados por ambas técnicas. Los sueros que resultaron positivos, 22 en total, a cualquiera de las dos -- pruebas o a ambas, fueron luego analizados por seroneutralización, confirmándose su positividad.

Los autores norteamericanos<sup>(58-59)</sup> encontraron que los mayores porcentajes de animales que reaccionaron positivamente contra AVE, pertenecían a las razas Saddlebreed y American Trotter. En Europa<sup>(61-62)</sup> no se observó que algunas razas en particular fueran más susceptibles que otras a AVE. En nuestro estudio, si bien las muestras no son representativas, se observó que la mayor cantidad de animales seropositivos se encuentran en las razas American Trotter y mestizos.

De las 61 muestras de sueros provenientes de animales con sintomatología similar a la descrita para esta enfermedad (abortos y/o sintomatología respiratoria) solamente 1 (1,6%) resultó positiva.

Asimismo, estos sueros fueron analizados por la técnica de inmunodifusión en gel de agar para detectar la presencia de anticuerpos contra HVE-1 (Rinoneumonitis equina), siendo 22 de ellos

positivos a esta enfermedad. La mayoría de estos sueros fueron obtenidos en la fase aguda de la afección, no habiendo sido posible la obtención de una segunda muestra, por lo cual podemos considerar que estos animales no hubieran desarrollado aún inmunidad al momento de la extracción de la sangre, de haber estado padeciendo una infección por virus de AVE. También es de considerar la similitud de la sintomatología de esta enfermedad con la de otras afecciones virales respiratorias de los equinos.

La obtención de sueros positivos contra AVE de animales sin una sintomatología aparente (12%), nos lleva a pensar, coincidiendo con diversos autores (28-58-61), que esta enfermedad cursa la mayoría de las veces en forma subclínica.

Por el hallazgo de anticuerpos contra el virus de arteritis viral equina en animales originarios de nuestro país, donde no se vacuna contra esta enfermedad, podemos inferir que este virus se encuentra entre nuestras poblaciones equinas. Con este hallazgo creemos haber cumplido con el objetivo de esta tesis. Posteriores trabajos sobre el tema contribuirán para aclarar la real importancia de esta enfermedad en nuestro país.

## CONCLUSIONES

- 1.-El virus de AVE multiplica perfectamente en los cultivos celulares utilizados (BHK-21, VERO)
- 2.-El virus es lítico para las células utilizadas, comenzando a observarse el ECP a las 48 horas y el desprendimiento de la monocapa a los 7 días post-inoculación.
- 3.-La prueba de F del C' da buenos resultados, es sensible, práctica y económica para la detección y titulación de Ac. contra AVE cuando se trabaja con un gran número de sueros.
- 4.-La prueba de IF indirecta, aunque también sensible es menos práctica para trabajar con muchas muestras de sueros, siendo más subjetiva la lectura de los resultados. Puede ser utilizada cuando la muestra a analizar es pequeña.
- 5.-La prueba de SN es la más sensible pero también la más laboriosa, y los resultados recién pueden ser leídos a los 7 días, por lo cual no resulta práctica para realizar relevamientos serológicos en gran escala.
- 6.-Por los resultados obtenidos, consideramos que el virus existe en nuestro país. Si bien el número de sueros analizados no fue grande, los resultados fueron reproducibles y confirmados por más de una técnica.
- 7.-El hallazgo de anticuerpos en animales asintomáticos nos lleva a considerar que los equinos sufren esta enfermedad en forma subclínica.

## RESUMEN

Se investigó la presencia de anticuerpos contra virus de Arteritis Equina (AVE) en sueros de equinos de diversas razas, con o sin antecedentes clínicos de haber padecido una afección del aparato respiratorio y/o abortos en las yeguas.

Se utilizó una cepa vacunal del virus de AVE y antisuero específico, cedido por el Dr. W. Mc Collum de la Universidad de Lexington, Kentucky, EE.UU..

Para la replicación del virus se trabajó con cultivos celulares primarios de riñón de conejo y hamster y con líneas celulares BHK-21 y VERO, adoptándose estas últimas por ser adecuadas para el desarrollo del virus y más prácticas para su manejo en el laboratorio.

Para la detección de anticuerpos específicos, se utilizaron las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta, Seroneutralización y Fijación del Complemento.

En los animales sin sintomatología 12 % dieron positivos y en los animales con sintomatología, el 1,6 % resultó positivo, llegándose a la conclusión que esta afección cursa con cuadros clínicos confundibles con los producidos por otras afecciones virales o en forma subclínica. De lo estudiado se determinó que un porcentaje variable de animales de nuestros planteles de equinos ha tomado contacto con el virus, señalándose la importancia del análisis serológico para asegurar un diagnóstico certero.

## SUMMARY

It's been investigated the presence of antibodies against Equine Arteritis (EVA) Virus, in equines Serums of diverser races, with or what clinicals antecedents in suffering an affection of the respiratory apparatus or abortion by mares.

It's been utilized a vaccinal strain from the EVA viurs and specific antiserums, which has been ceded by Dr. W. Mc Collum from Lexington University, Kentucky, EE. UU..

For the Virus replies it's been working with primary rabbit and hamster cellulars cultivations, and with cellulars lines BHK-21 and VERO, adopting these last ones for been adequated for the virus unfolding and more practice for its handling in the laboratory.

For de detection of specific antibodies, it's been utilized the indirect Inmunofluorescence, Seroneutralization and Complement Fixation techicals.

In the animals without sintomatology, 12 % were positive and in the ones with sintomatology the 1,6 % was positive, arriving to the conclusion that this affection courses with clinicals pictures confusedly with the ones produced by others viral affections or in a subclinical way. After all this study it's been determined that a variable percent of ours equines has taken contact with the virus pointing the importance of the serologic analysis to secure a sure diagnostic.

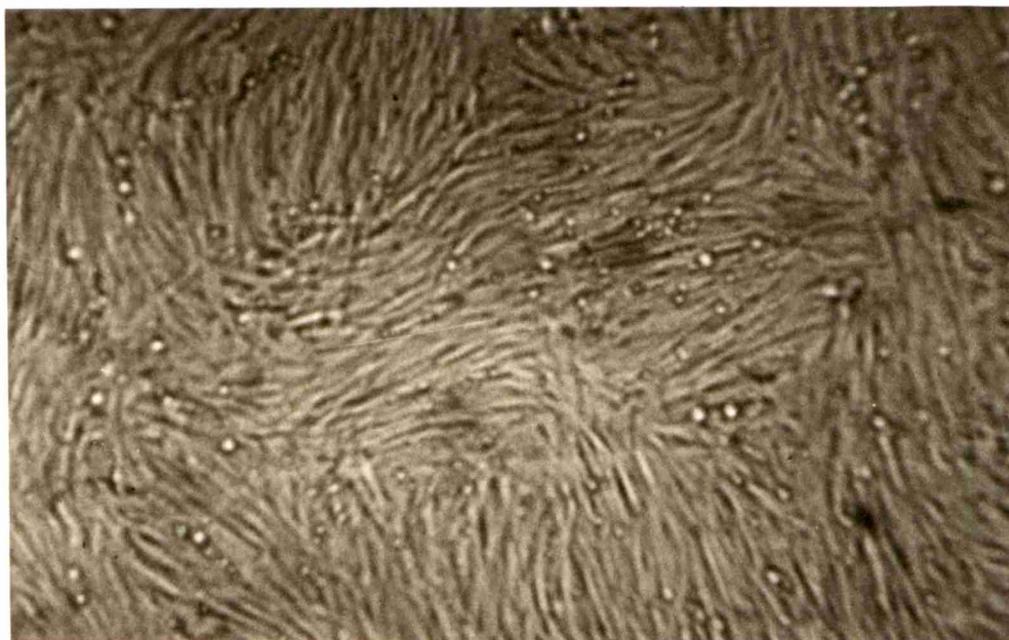


FOTO N° 1 CULTIVO NORMAL DE CELULAS BHK OBSERVADAS EN MICROSCOPIO INVERTIDO. (MI) 100 X.

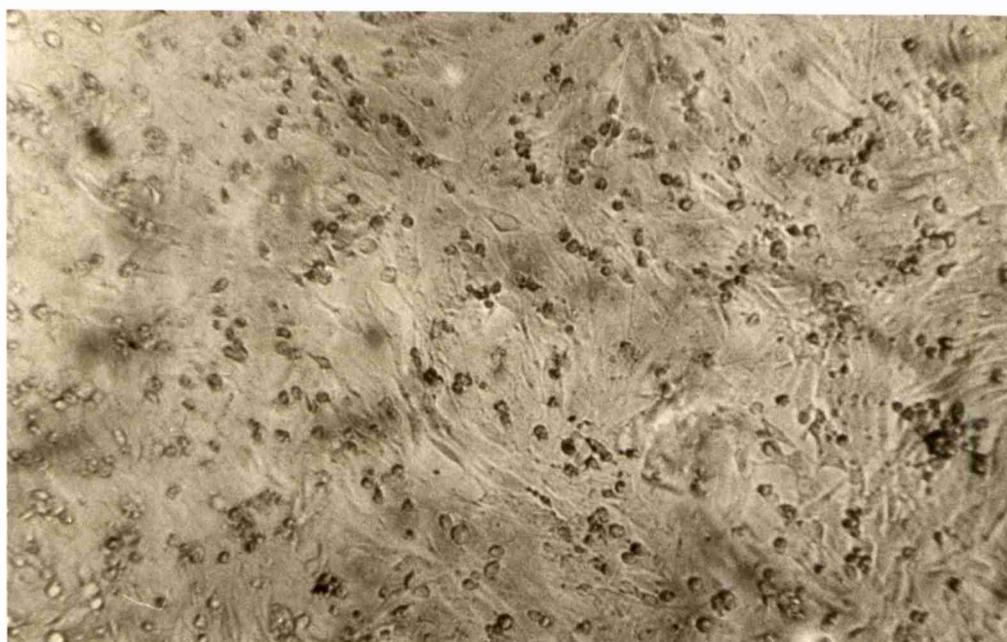


FOTO N° 2 CULTIVO DE CELULAS BHK 48 HORAS POSTINOCULACION OBSERVADO AL M.I. 100 X.

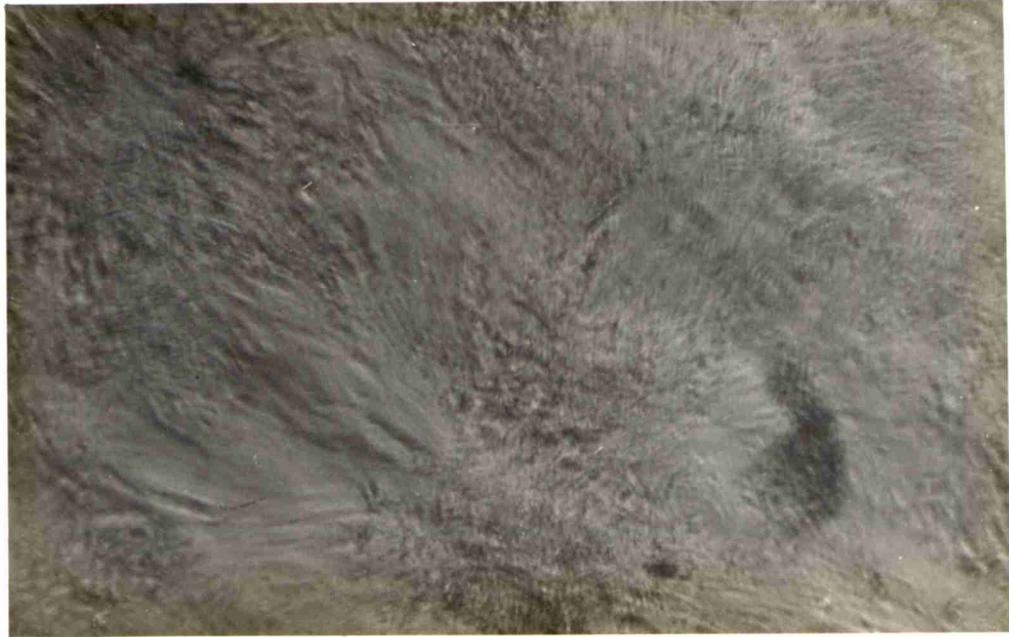


FOTO N° 3 CULTIVO NORMAL DE CELULAS VERO OBSERVADAS EN MI 40 X



FOTO N° 4 CULTIVO NORMAL DE CELULAS BHK. 100 X. H. y E.

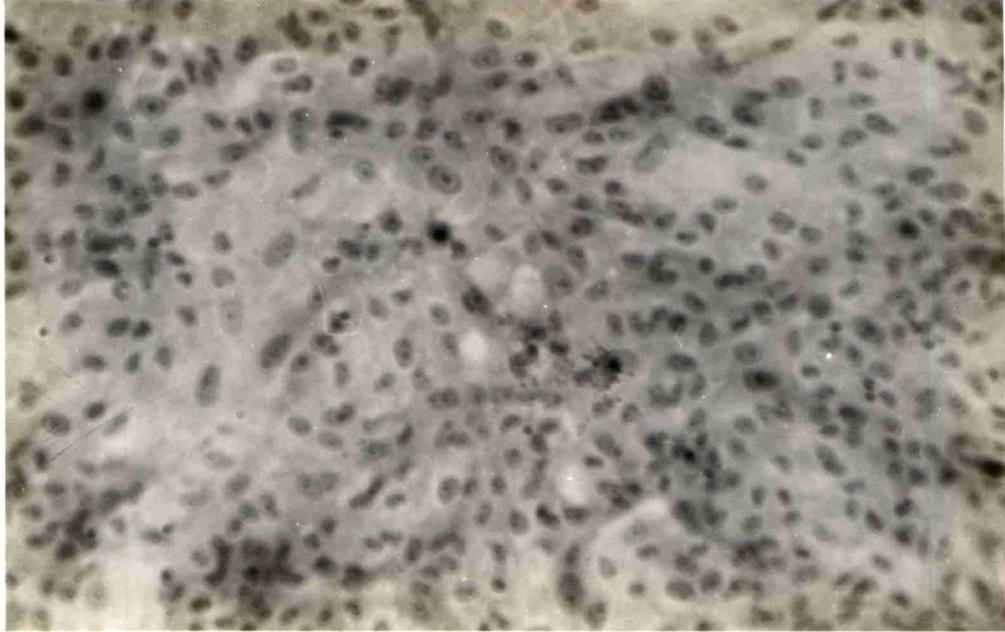


FOTO N° 5 CULTIVO NORMAL DE CELULAS VERO 100 X H. Y E..



FOTO N° 6 CULTIVO DE CELULAS BHK 5 DIAS POSTINOCULACION 100X H.Y E.

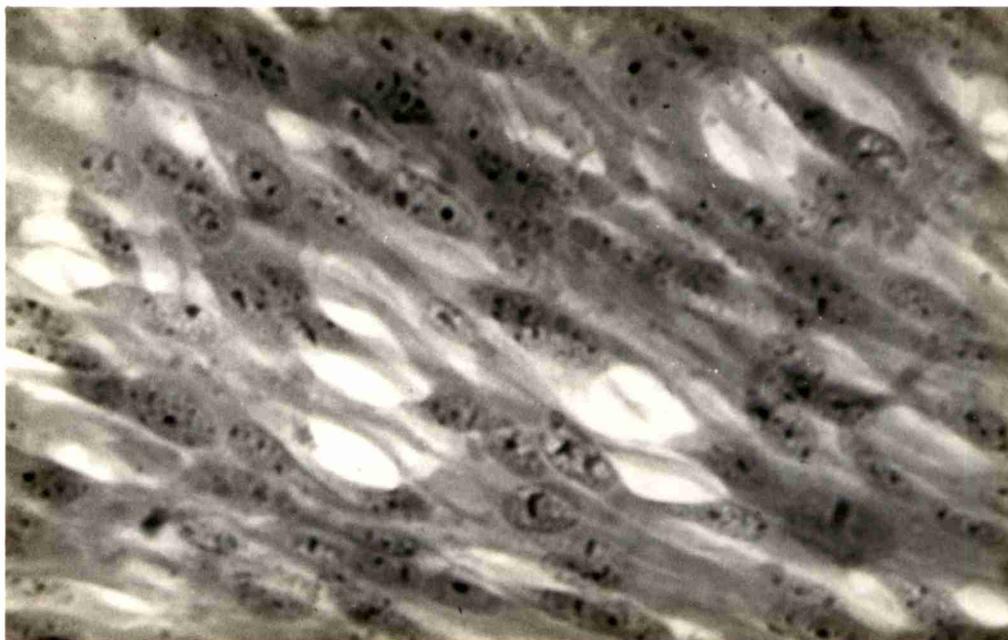


FOTO N° 7 CULTIVO NORMAL DE CELULAS BHK. 400X H. Y E.

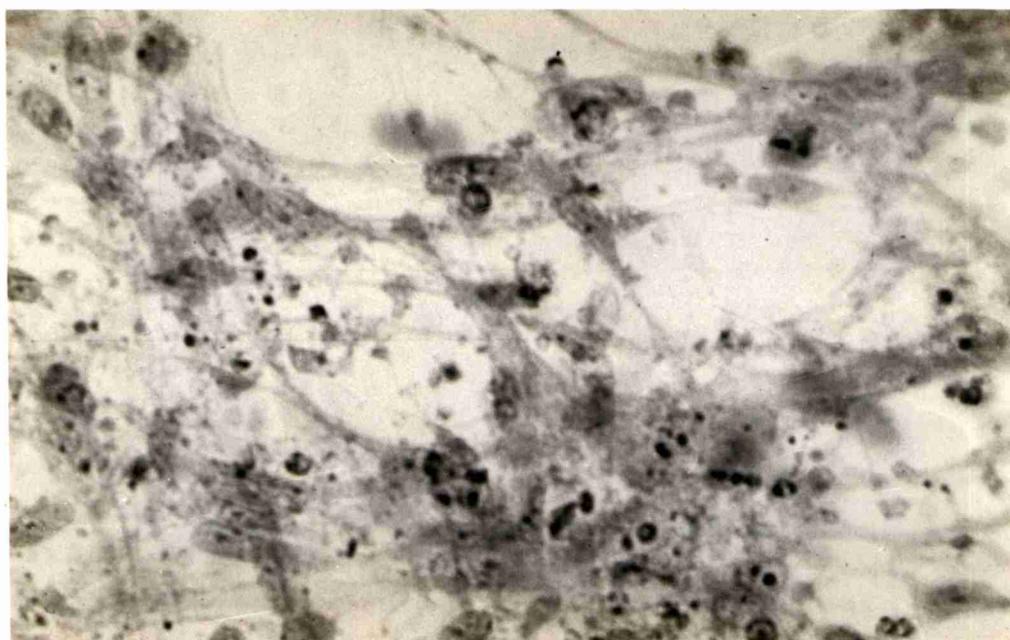


FOTO N° 8 CULTIVO DE CELULAS BHK 5 DIAS POSTINOCULACION 400X H.Y E..

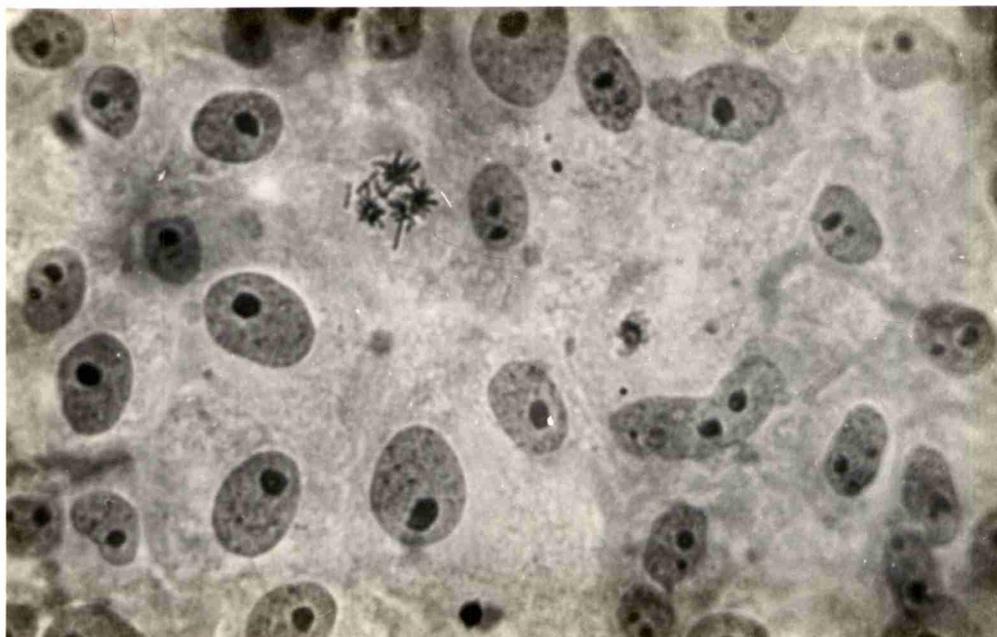


FOTO N° 9 CULTIVO NORMAL DE CELULAS VERO. 400X. H. Y E..

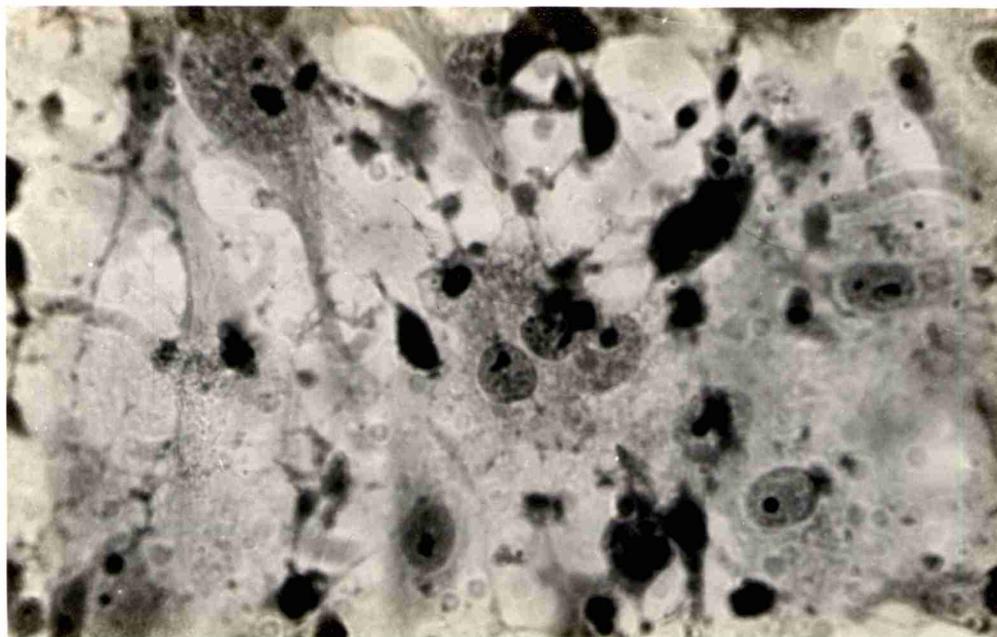


FOTO N° 10 CULTIVO DE CELULAS VERO 72 HORAS POSTINOCULACION.  
400X. H. Y E..

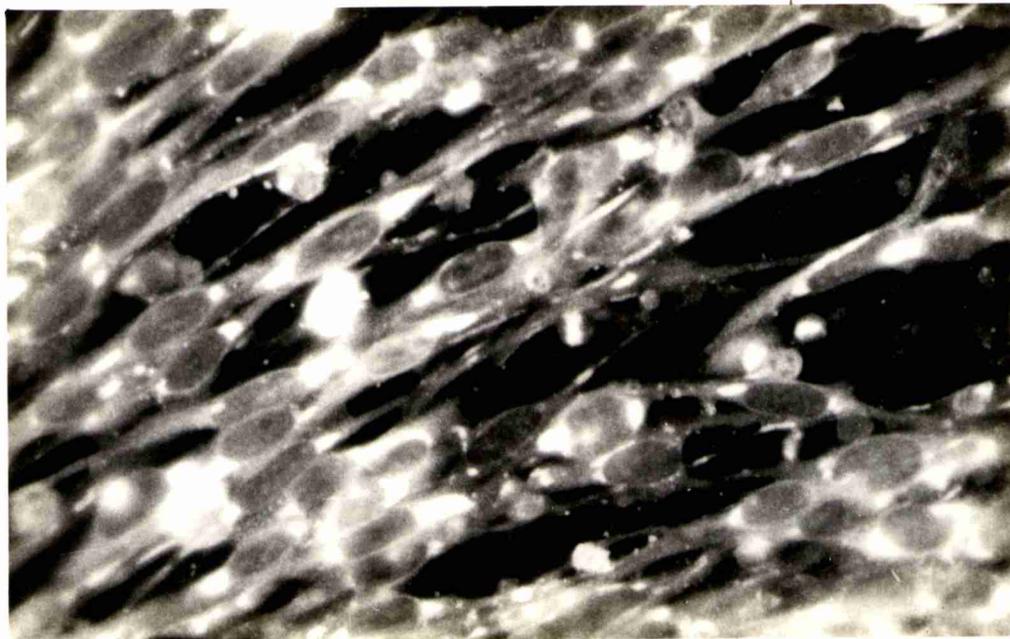


FOTO N° 11 CELULAS BHK CON FLUORESCENCIA PERINUCLEAR. 400X.



FOTO N° 12 CELULAS BHK CON FLUORESCENCIA PERINUCLEAR. 400X.

## BIBLIOGRAFIA

- 1-ADLER, E.  
"Manual de fijación del complemento para serología de fiebre aftosa".  
2° Manual Técnico, INTA, 1967.
- 2-AKASHI, H.; KONISHI, S.; OGATA, M.  
Studies on Equine Viral Arteritis I: A Serology Survey of EVA in horses Imported in 1973/74.  
Jap.J.Vet.Sci., 87: 71 73, 1976.
- 3-BOZZINI, J. P.; LARGHI, O.; LUBIN, H.; SANTABAYA, E.; VILCHES, A.  
Microscopía de fluorescencia en el diagnóstico de enfermedades transmisibles.  
Monografía N°1, As. Arg. de Microbiol., Buenos Aires, 1970.
- 4-BRADSTREET, C. P.; TAYLOR, C. D. E.  
Technique of Complement-Fixation test applicable to the diagnosis of virus diseases.  
Monthly Bull. Ministry of Health, 21: 96, 1962.
- 5-BREESE, S.S.; Mc COLLUM, W. H.  
Electron microscopic Characterization of Equine Arteritis Virus.  
Equine Inf. Diseases II, 133 139, 1970.
- 6-BREESE, S.S.; Mc COLLUM, W.H.  
Equine Arteritis Virus: Ferritin-tagging and determination of RNA core.  
Arch. Ges. Virus. 35: 290 295, 1971.
- 7-BREESE, S.S.; Mc COLLUM, W.H.  
Electron Microscopic Studies of Tissues of Horses Infected by Equine Arteritis Virus.  
Equine Inf. Diseases III: 273-281, 1973.
- 8-BRYANS, J.T.; DOLL, E.R.; CROWE, M.; McCOLLUM, W.H.  
The Blood Picture and Thermal Reaction in Experimental Viral Arteritis of Horses.  
Cornell Vet., 47: 42-52, 1957.
- 9-BURKI, F.  
Further Properties of Equine Arteritis Virus.  
Arch. Ges. Virus., 19: 123-129, 1966.

- 10-BURKI, F.  
The Virology of Equine Viral Arteritis.  
Equine Inf. Diseases II: 125-129, 1970.
- 11-COGGINS, L.  
Viral Respiratory Diseases.  
Vet. Cl. N. A.: Large An. Pract., 1 (1): 59-73, 1979.
- 12-COOPER, N.; WELSH, R.  
Antibody and Complement-Dependent Viral Neutralization.  
Spring. Sem. Immunopathol., 2: 285-310, 1979
- 13-CRAWFORD, T.B.; HENSON, J.B.  
Immunofluorescent Light Microscopic and Immunologic Studies  
of Equine Arteritis Virus.  
Equine Inf. Diseases III: 282-302, 1973.
- 14-COONS, A.H.; KAPLAN, M.H.  
Localization of Antigen in Tissue Cells. Improvement in a  
Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent  
Antibodies.  
J. Exp. Med., 91: 1, 1950.
- 15-DAVIS, B.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H.; WOOD, B.;  
McCARTY, M.  
Microbiology.  
2nd. Ed., Harper and Row Ed., 1973.
- 16-DE BOER, -G.F.  
Prevalence of Antibodies to Equine Viruses in The Netherlands.  
Equine Inf. Diseases IV: 461-465, 1978.
- 17-DE DIEGO, A.I.  
Guia para el estudio de las enfermedades infecciosas de los  
animales.  
Ed. del autor, Buenos Aires, pag. 66, 1974.
- 18-DOLL, E.R.; BRYANS, J.T.; McCOLLUM, W.H.; CROWE, M.  
Isolation of a Filterable Agent Causing Arteritis of Horses  
and Abortion by Mares. Its Differentiation from the Equine  
Abortion Virus.  
Cornell Vet., 47: 3-41, 1957.

- 19-DOLL, E.R.; KNAPPENBERGER, R.; BRYANS, J.T.  
An Outbreak of Abortion Caused by the Equine Arteritis Virus.  
Cornell Vet., 47: 69-75, 1957.
- 20-DOLL, E.R.; BRYANS, J.T.; WILSON, J.; McCOLLUM, W.H.  
Immunization Against Equine Arteritis Virus using modified live virus propagated in cell cultures of Rabbit Kidney.  
Cornell Vet., 58: 497-524.
- 21-ESTES, P.C.; CHEVILLE, N.F.  
The Ultrastructure of Vascular Lesions in Equine Viral Arteritis.  
Am. J. Pathol., 58 (2): 235-252, 1970.
- 22-ETCHEVERRIGARAY, M.E.; SCIUTTO, D.; SCHUDEL, A.A.; PEREZ AZU-  
MENDI, R.  
Rinoneumonitis equina I: detección de anticuerpos precipitantes en caballos de la provincia de Buenos Aires. (Comunicación preliminar).  
Rev. Mil. Vet. 25 (115): 173-177, 1978.
- 23-ETCHEVERRIGARAY, M.E.; OLIVA, G.A.; GONZALEZ, E.; NOSETTO, E.;  
MARTIN, A.  
Comportamiento de una cepa de Herpesvirus Equino I (HVE-1) aislado de un feto abortado.  
Trab. Presentado en el VII Sem. Mil. de Vet., 29-31 octubre de 1981.
- 24-FAIN BINDA, J.; HERMIDA, P.; MARTIN, J.; VECCHIO, R.; LOPEZ, R.  
Huéspedes del Myxovirus Influenzae Equino.  
Res. III Congr. Lat. Microbiol., Bs. As., Arg., 1977.
- 25-FENNER, F.  
Classification and Nomenclature of Viruses.  
Int. Com. Tax. Viruses, 2nd. report, Ed.Karger-Basel, pag.45-47 1976.
- 26-FERNANDEZ, H.M.E.  
Algunas observaciones sobre el brote de rinolaringotraqueítis enzoótica equina del año 1962.  
Rev. Mil. Vet. 11 (58): 99-100, 1963.
- 27-FUKUNAGA, Y.; McCOLLUM, W.H.  
Complement Fixation reactions in Equine Viral Arteritis.  
Am. J. Vet. Res. 38 (12): 2043-2046, 1977.

- 28-GERBER, H.; STECK, F.; HOFER, B.; WALTHER, L.  
Clinical and Serological Investigations on Equine Viral Arteritis.  
Equine Inf. Diseases IV: 461-465, 1978.
- 29-HOFER, B.; STECK, F.; GERBER, H.  
Virological Investigations in a Horse Clinic.  
Equine Inf. Diseases IV: 475-480, 1978.
- 30-HORZINEK, M.  
Compendio de Virología General.  
Ed. Hemisferio Sur, 1980.
- 31-HORZINEK, M.; MAESS, J.; LAUFS, R.  
Studies on substructure of Togaviruses analysis of Equine Arteritis, Rubella, Bovine Viral Diarrhea and Hog Cholera Viruses.  
Arch. Ges. Virus., 33: 306-318, 1971.
- 32-HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R.  
Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos.  
Ed. Labor, 2a. Ed., Tomo I pag. 161, 1968.
- 33-HYLLSETH, B.  
A Plaque Assay of Equine Arteritis Virus in BHK-21 Cells.  
Arch. Ges. Virus. 28: 26-33, 1969.
- 34-HYLLSETH, B.; PERNILLA MAGNUSON; MARUSYK, H.  
Studies on Equine Arteritis Virus.  
Equine Inf. Diseases II: 140-142, 1970.
- 35-HYLLSETH, B.  
Buoyant Density Studies on Equine Arteritis Virus.  
Arch. Ges. Virus., 30: 97-104, 1970.
- 36-HYLLSETH, B.; PETERSON, B.  
Neutralization of Equine Arteritis Virus, enhancing effect of Guinea Pig Serum.  
Arch. Ges. Virus., 32: 337-347, 1970.
- 37-INGRAM, D.G.; SHERMAN, J.; MITCHELL, W.; THORSEN, J.; MARTIN, S.  
The Epidemiology and Control of Respiratory Diseases at Ontario Racetracks.  
Equine Inf. Diseases IV: 329-338, 1978.

- 38-INOUE, T.; YANAGAWA, R.; SHINAGAWA, M.; AKIYAMA, Y.  
Immunofluorescent Studies on the Multiplication of Equine Arteritis Virus In VERO cells and ED (NBL-6) cells.  
Jap. J. Vet. Sci., 37 (6): 569-575, 1975.
- 39-JOHNSON, G.D.; HOLBOROW, E.J.; DORLING, J.  
Handbook of Experimental Immunology. Chapter 15: Immunofluorescence and Immunoenzyme Techniques.  
Ed. D.M.Weir, Blackwell Sc. Pub., 3rd. Ed., 1978.
- 40-JONES, T.C.; DOLL, E.R.; BRYANS, J.T.  
The Lesions of Equine Viral Arteritis.  
Cornell Vet., 47: 52, 1957.
- 41-KONISHI, S.; AKASHI, H.; SENTSU, H.; OGATA, M.  
Studies on Equine Viral Arteritis I: Characterization of the Virus and Trial Survey on Antibody with VERO cells Culture.  
Jap. J. Vet. Sci., 37: 541-549, 1975.
- 42-LAUDE, H.  
Nonarbo-Togaviridae: comparative Hydrodynamic Properties of the Pestivirus Genus.  
Arch. Virol., 62 (4): 347-351, 1979.
- 43-LETTER TO THE EDITORS  
Plaque Formation with Poliomyelitis, Coxsackie and Orphan (ECHO) Viruses in Bottle Cultures of Monkey Epitelial Cells.  
Virology, 1: 533-535, 1955.
- 44-LINDSEY, N.; CHOW, T.L.  
Preservation of Primary Bovine Embryonic Kidney Cells with Dimethyl Sulfoxide.  
Applied Microbiol., 17 (3): 484-485, 1969.
- 45-MAESS, J.; RECZKO, E.; BOHM, H.  
An investigation of the Morphology of Equine Arteritis Virus.  
Equine Inf. Diseases II: 130-132, 1970.
- 46-MAESS, J.; RECZKO, E.; BOHM, H.  
Equine Arteritis Virus: Multiplication in BHK-21 cells; Buoyant Density and Electron Microscopical Demonstration.  
Arch. Ges. Virus., 30 (1): 47-59, 1970.

- 47-MAGNUSSEN, P.; HYLLSETH, B.; MARUSYK, H.  
Morphological Studies on Equine Viral Arteritis.  
Arch. Ges. Virus., 30: 105, 1970.
- 48-MARTIN, A.A.; RUAGER, J.; IDIART, J.; ANDREATA, J.  
Arteritis Virósica Equina. Comunicación de primeros hallazgos.  
V Jornadas Int. Fac. Cs. Vet., UNLP., nov. 1970.
- 49-MATUMOTO, M.; ISHIZAKI, R.; SHIMIZU, T.  
Serologic Survey of Equine Rhinopneumonitis Virus Infection  
among Horses in Various Countries.  
Arch. Ges. Virus., 15 (5): 609-624, 1965.
- 50-McCOLLUM, W.H.  
Pathologic Features of Horses Given Avirulent Equine Arteritis  
Virus Intramuscularly.  
Am. J. Vet. Res., 42 (7): 1218-1220, 1981.
- 51-McCOLLUM, W.H.; DOLL, E.R.; WILSON, J.; JOHNSON, C.  
Propagation of Equine Arteritis Virus in Monolayers Cultures  
Equine Kidney.  
Am. J. Vet. Res., 22: 731-735, 1961.
- 52-McCOLLUM, W.H.; DOLL, E.R.; WILSON, J.  
The Recovery of Virus From Horses with Experimental Cases of  
Equine Viral Arteritis, Using Monolayer Cells Cultures of Equi-  
ne Kidney.  
Am. J. Vet. Res., 23: 465-469, 1961.
- 53-McCOLLUM, W.H.; DOLL, E.R.; WILSON, J.; CHEATHAM, J.  
Isolation and Propagation of Equine Arteritis Virus in Mono-  
layer Cells Cultures of Rabbit Kidney.  
Cornell Vet., 52: 452, 1962.
- 54-McCOLLUM, W.H.  
Development of a Modified Virus Strain and Vaccine for Equine  
Viral Arteritis.  
J. A. V. M. A., 155: 318-322, 1969.
- 55-McCOLLUM, W.H.  
Vaccination for Equine Viral Arteritis.  
Equine Inf. Diseases II: 143-151, 1970.

- 56-McCOLLUM, W.H.; OZAWA, Y.; DARDIRI, A.  
Serologic Differentiation Between African Horse-Sickness and Equine Arteritis.  
Am. J. Vet. Res., 31 (11): 1963-1966, 1970.
- 57-McCOLLUM, W.H.; PRICKETT, M.; BRYANS, J.T.  
Temporal Distribution of Equine Arteritis Virus in Respiratory Mucosa, Tissues and Body Fluids of Horses Infected By Inhalation.  
Res. Vet. Sci., 2: 459-464, 1971.
- 58-McCOLLUM, W.H.; BRYANS, J.T.  
Serological Identification of Infection by Equine Arteritis Virus in Horses of Several Countries.  
Equine Inf. Diseases III: 256-263, 1973.
- 59-McGUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HENSON, J.  
Prevalence of Antibodies to Herpesvirus Types I and II, Arteritis and Infectious Anemia Viral Antigens in Equine Serum.  
Am. J. Vet. Res., 23: 465-469, 1961.
- 60-MITCHELL-HOSKINS, J.  
Virological Procedures.  
Butterworth Ed., London, 1967.
- 61-MORAILLON, A.; MORAILLON, R.  
Results of a Serological Surveys of Viral Arteritis in France and in Several European and African Countries.  
Equine Inf. Diseases IV: 467-473, 1978.
- 62-MORAILLON, R.; MORAILLON, A.  
Acquisitions recentes dans L'epidemiologie de L'arterite a virus du cheval en France.  
Rec. Med. Vet., 150: 1015-1022, 1974.
- 63-MUMFORD, J.; ROSSDALE, P.D.  
Virus and its Relationship to the "Poor Performance" syndrome.  
Equine Vet. J., 12 (1): 3-9, 1980.
- 64-NEWSLETTER  
Viral Respiratory Diseases.  
Proc., Equine Resp. Diseases, Symp. Ohio S. Univ., May 19-20, 1980.

- 65-PAULI, R.; PASEGGI, C.; CALVO, M.  
Aspectos epizootiológicos de un brote de influenza equina en la región central de la Provincia de Santa Fé.  
Res. 3er. Congreso Lat. de Microbiol., Bs. As., Arg., 1977.
- 66-POWELL, D.; BUROWS, R.; SPOONER, P.; GOODRIDGE, D. THOMSON, G.  
A Study of Infectious Respiratory Diseases among Horses in Great Britain, 1971-1976.  
Equine Inf. Diseases IV: 451-459, 1978.
- 67-PRICKETT, M.E.; McCOLLUM, W. H.; BRYANS, J.T.  
The Gross and Microscopic Pathology observed in Horses Experimentally Infected with the Equine Arteritis Virus.  
Equine Inf. Diseases III: 265-272, 1973.
- 68-RADWAN, A.I.; BURGER, D.  
The Complement Requiring Neutralization of Equine Arteritis Virus by Late Antisera.  
Virology: 51: 71-77, 1973.
- 69-RADWAN, A. I.; BURGER, D.  
The Role of Sensitizing Antibody in the Neutralization of Equine Arteritis Virus by Complement or Anti IgG serum.  
Virology, 53 (2): 366-371, 1973.
- 70-RADWAN, A. I.; BURGER, D.; DAVIS, W. C.  
The Fate of Sensitized Equine Arteritis Virus.  
Virology, 53, (2): 372,378, 1973.
- 71-RADWAN, A. I.; CRAWFORD, T. B.  
The Mechanisme of Neutralization of Sensitized Arteritis Virus by Complement Components.  
J. Gen. Virol., 25: 229-237, 1974.
- 72-REDAELLI, G.  
Arterite equina o malattia degli occhi rossi (Pink eye).  
La Clinica Vet., 102 (6-7): 560, 1979.
- 73-REIF, J. S.  
Epidemiology of Equine Infectious Respiratory Disease.  
Vet.Cl.N.A.: Large An. Pract., 1 (1):.3-15, 1979.

- 74-SHARP, J. A.  
Introducción al cultivo de tejidos animales.  
Cuad. de Biol., Ed. Omega, 1980.
- 75-STUDDERT, M. J.  
Comparative Aspects of Equine Herpesviruses.  
Cornell Vet., 64: 94-122, 1974.
- 76-TIZARD, I.  
Inmunología Veterinaria.  
Ed. Interamericana, 1r. Ed., 1979.
- 77-VAN BERLO, M.F.; HORZINEK, M.; VAN DER ZEIJST, B.A.  
Temperature Sensitive Mutants of Equine Arteritis Virus.  
J. Gen. Virol., 49: 97-104, 1980.
- 78-VAN DER ZEIJST, B.A.; HORZINEK, M.  
The Genome of Equine Arteritis Virus.  
Virology, 68: 418-425, 1975.
- 79-WILSON, J. C.; DOLL, E. R.; McCOLLUM, W. H.  
Propagation of Equine Arteritis Virus Previously adapted to  
cell Cultures of Equine Kidney in Monolayer Cultures of Hamster  
Kidney.  
Cornell Vet., 52 (2): 200-205, 1962.
- 80-ZEEGER, J. J.; VAN DER ZEIJST, B. A.; HORZINEK, M.  
The Structural Proteins of Equine Arteritis Virus.  
Virology, 73: 200-205, 1976.