



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

# **ALTERNATIVAS PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DEL EXANTEMA COITAL EQUINO**

---

*Trabajo de tesis para optar por el título de doctor en la Universidad de  
Buenos Aires*

María Aldana Vissani

Director: María Barrandeguy

Área de estudio: Ciencias Veterinarias

Sub-área: Farmacología y Microbiología

Instituto de Virología  
CICVyA – INTA

El presente trabajo de Tesis de Doctorado titulado “Alternativas para la prevención y el tratamiento del exantema coital equino” fue realizado por la Veterinaria María Aldana Vissani en el Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), situado en Hurlingham, provincia de Buenos Aires, Argentina, bajo la dirección de la Dra. María Barrandeguy.

El proyecto de tesis doctoral fue presentado a las autoridades del Consejo Directivo de la carrera de postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, dentro del marco de la Carrera de Doctorado en el área de Ciencias Veterinarias, sub-áreas de farmacología y microbiología, y cuya fecha de admisión fue el 17 de septiembre del año 2013 [Resolución (CD) N° 2868/13].

---

V°B°  
Vet. María Aldana Vissani

---

V°B°  
Dra. María Barrandeguy

*A mis hijos, Alessia y Lorenzo;*

*A mi fiel compañero, Mariano;*

*A mis papas, Gabriela y Emilio.*

*No te rindas, aún estás a tiempo  
de alcanzar y comenzar de nuevo,  
aceptar tus sombras,  
enterrar tus miedos,  
liberar el lastre,  
retomar el vuelo.  
no te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros,  
y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas,  
aunque el frío queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se ponga y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños  
porque cada día es un comienzo nuevo,  
porque esta es la hora y el mejor momento.  
Porque no estás solo, porque yo te quiero.*

Mario Benedetti

### **Agradecimientos**

*A la Dra. María Barrandeguy, por haberme dado la posibilidad de trabajar en el Laboratorio de Virus Equinos del Instituto de Virología de INTA, por mostrarme el fascinante mundo de la virología de equinos y enseñarme todo lo que se de la industria hípica, por confiar en mí, por alentarme siempre a ir para adelante, y por darme la posibilidad de desarrollar este trabajo de tesis bajo su supervisión.*

*A la Dra. Karina Trono y al Dr. Fernando Fernandez, directores (actual y anterior, respectivamente), del Instituto de Virología de INTA Castelar, por permitirme desarrollar este trabajo de tesis en dicho Instituto.*

*A INTA y a los Haras participantes del Convenio de Vinculación Tecnológica INTA-Haras, por brindarme los medios económicos para solventar este trabajo de tesis.*

*A mis compañeros de laboratorio, Cecilia, Silvia, Luciana, Verónica, Samuel y Florencia, por las horas que compartimos juntos, y porque sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.*

*Al Dr. Osvaldo Zabal, por enseñarme el mundo de los cultivos celulares y prepararme las células para mis experimentos.*

*Al Dr. Etienne Thiry, por acompañarme en todo este proceso, por su ayuda en el análisis de resultados, lecturas de manuscritos y sus consejos, así como también por ser miembro del Comité de Seguimiento de Tesis, de INTA*

*A la Dra. Viviana Parreño, por su ayuda incondicional en el análisis estadístico de los resultados.*

*A las Dras. Marcela Rebuelto y Alejandra Romera, por participar activamente del Comité de Seguimiento de Tesis de INTA.*

*Al Teniente Coronel Veterinario Gustavo Alvarez y al Coronel Veterinario Santiago Bruno, por la logística y la preparación de las yeguas, así como también a todo el personal del Laboratorio y Depósito de Remonta y Veterinaria del Ejército Argentino, principalmente a Román, Ariel, Dardo, Verón y Pablo, por la colaboración con el manejo de los animales durante la experiencia con las yeguas.*

*A mis compañeros de INTA, Irene, Marina, Celina, Matías, Ezequiel, Silvina, Laura y Betty, a mis amigos, especialmente a Susana y a Nataly, a mi madrina y al resto de mi familia,*

*especialmente a Beatriz, por estar siempre dispuestos a darme una mano y por hacer a veces de niñeros y/o psicólogos.*

*A mis papás, Gabriela y Emilio; por enseñarme a no rendirme ya que todo esfuerzo siempre vale la pena, porque gracias a ellos soy quien soy, y porque junto a mis hermanos, Loredana y Bruno, siempre estuvieron a mi lado para lo que necesitara.*

*A mi familia; mi esposo Mariano, y mis hijos Alessia y Lorenzo, a quienes les estoy inmensamente agradecida por la compañía, el amor, la paciencia y el apoyo de todos los días.*

### **Publicaciones originadas de este trabajo de tesis**

- *Assessing the efficacy of topic administration of ganciclovir using different therapeutic regimens, in mares experimentally infected with Equid alphaherpesvirus 3.* Vissani, MA; Olguin Perglione, C; Zabal, O.; Alvarez, G.; Thiry, E.; Parreño, V.; Barrandeguy, M. En preparación.
- *In vitro comparison of acyclovir, ganciclovir and cidofovir against equid alphaherpesvirus 3 and evaluation of their efficacy against six field isolates.* Vissani MA, Zabal O., Tordoya MS, Parreño V, Thiry E., Barrandeguy M. Enviado a la Revista Argentina de Microbiología, en revisión (RAM-D-17-00073).
- *Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: current status and perspectives.* Review Article. Vissani MA, Thiry E, Dal Pozzo F, Barrandeguy M. 2016, The Veterinary Journal, Jan; 207:38-44. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.06.010.
- *Complete genome sequence of Equid herpesvirus 3.* Sijmons S, Vissani A, Tordoya M, Muylkens B, Thiry E, Maes P, Matthijssens J, Barrandeguy M, Van Ranst M. Genome Announc. 2014. (<http://genomea.asm.org> )

### **Comunicaciones originadas de este trabajo de tesis**

- *Evaluación de la eficacia de Ganciclovir contra Herpesvirus equino 3 en yeguas experimentalmente infectadas.* Vissani, MA; Olguin Perglione, C; Zabal, O; Thiry, E; Alvarez, G; Barrandeguy, M. XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, 5 y 6 de diciembre de 2016, Facultad de Ciencias Exactas, UBA, Buenos Aires.
- *Dispositivo portátil basado en un sistema de PCR isotérmica aislada para la detección rápida de Herpes Virus Equino 3.* Vissani, MA.; Tordoya, MS.; Tsai, YL.; Shen, YH.; Pei-Yu, AL.; Chang, HFG.; Wang, HTT.; Barrandeguy, M. XXI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico “Dr. Bernardo Jorge Carrillo”, 6 al 8 de octubre de 2016, San Salvador de Jujuy.
- *Susceptibility of equid herpesvirus 3 field isolates to antiviral compounds.* Vissani MA, Zabal O, Tordoya MS, Thiry E, Barrandeguy M. 10<sup>th</sup> International Equine Infectious Diseases Conference (IEIDC X). Buenos Aires, Argentina, April 4-8, 2016. Oral presentation. Journal of Equine Veterinary Science, Vol. 39, S68.
- *Effects of lambda-carrageenan on equid herpesvirus 3 in vitro.* Vissani MA, Galdo Novo S, Ciancia M, Zabal O, Thiry E, Bratanich A, Barrandeguy M. 10<sup>th</sup> International Equine Infectious Diseases Conference (IEIDC X). Buenos Aires, Argentina, April 4-8, 2016. Poster presentation Journal of Equine Veterinary Science, Vol. 39, S61–S62.
- *Effect of acyclovir, ganciclovir and cidofovir on equid herpesvirus 3 in vitro.* Vissani MA, Tordoya MS, Becerra L, Thiry E, Barrandeguy M. Journal of Equine Veterinary Science, Volume 32, Issue 10, Supplement, October 2012, Pages S78-S79.
- *Evaluación de compuestos antivirales contra herpes virus equino 3.* Vissani MA, Tordoya MS, Zabal O, Thiry E, Barrandeguy M. XI Congreso Argentino de Virología; II Congreso Latinoamericano de Virología; IV Simposio de Virología Clínica; II Simposio de Virología Veterinaria “Dr. José L. La Torre”. 23 al 26 de junio de 2015, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- *Compuestos antivirales para el tratamiento y la prevención del Exantema Coital Equino. Estudios in vitro.* Vissani, M.A.; Tordoya, M.S.; Becerra, M.L.; Thiry, E.; Barrandeguy, M. Presentación Oral. XXXII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Virología. 4 al 7 de Diciembre de 2012, Valle Hermoso, Córdoba.

### **Proyectos nacionales e internacionales que contribuyeron a la realización de este trabajo de tesis de doctorado**

- Proyecto Específico de Salud Animal del INTA (PNSA 1115051): “Gestión del proceso de innovación en Salud Animal que contribuya a mejorar las condiciones sanitarias y productivas de las especies de animales de interés zootécnico”.
- Proyecto colaborativo con el “Laboratory of Virology and Immunology, University of Liege”, Bélgica, aprobado y subsidiado por CONICET-FNRS. “Species specificity and diversity of alphaherpesviruses of ruminants and equids”. Cooperación Internacional, Resol. N° 1289-13/5/119. Período: 2011-2012.

**Participación en convenios de vinculación tecnológica**

CVT N° 123. Convenio de Vinculación Tecnológica INTA - HARAS: Enfermedades virales de los equinos. Investigador responsable: María Barrandeguy.

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE DIAGRAMAS</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XIX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Exantema coital equino	26
1.2. Agente etiológico: clasificación y taxonomía	27
1.3. Transmisión y epidemiología	28
1.4. Replicación viral y patogenia	30
1.5. Signos clínicos y lesiones	31
1.6. Diagnóstico	33
1.7. Prevención, control y tratamiento	35
1.8. La industria hípica y el potencial impacto económico del ECE	37
1.9. Compuestos antivirales para alfa herpesvirus: mecanismo de acción	39
1.10. Uso de compuestos antivirales en el tratamiento de infecciones por alfa herpesvirus en equinos	43
<b>2. HIPÓTESIS</b>	
Hipótesis general de trabajo	47
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1. Objetivo general	49
3.2. Objetivos particulares	49
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>4.1 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DISTINTOS COMPUESTOS ANTIVIRALES PARA REDUCIR O INHIBIR LA REPLICACIÓN DE EHV-3 <i>IN VITRO</i></b>	<b>51</b>
4.1.1 Células	51
4.1.2 Virus	51
4.1.3 Compuestos antivirales	52
4.1.4 Ensayos <i>in vitro</i>	53
4.1.4.a Estandarización de la metodología de qPCR en la evaluación de compuestos antivirales	53
4.1.4.b Ensayos dosis-respuesta de los compuestos antivirales sintéticos contra EHV-3 en cultivos celulares	54
4.1.4.c Ensayos dosis-respuesta de compuestos antivirales naturales ( $\lambda$ -carragenanos) contra EHV-3 en cultivos celulares	55
4.1.4.d Ensayos comparativos de distintas concentraciones de los compuestos antivirales sintéticos sobre la producción de EHV-3 en cultivos celulares por qPCR y DICT50%/ml	55
4.1.4.e Comparación de la eficacia de ACV, HPMP y GCV frente a cepas de campo de EHV-3	57

<b>4.2</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL COMPUESTO ANTIVIRAL SELECCIONADO PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ECE EN YEGUAS INFECTADAS EN FORMA EXPERIMENTAL CON EHV-3</b>	<b>59</b>
4.2.1	Animales	59
4.2.2	Virus desafío	61
4.2.3	Compuesto antiviral para su aplicación tópica	61
4.2.3.a.	Preparación del principio activo	61
4.2.3.b.	Preparación magistral del producto farmacéutico: GCV en crema 0,01% p/p	61
4.2.4	Diseño experimental	62
	Infección con EHV-3	64
	Tratamientos	66
4.2.5	Evaluación clínica, toma de muestras y análisis de laboratorio	66
<b>4.3</b>	<b>ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA CONOCIDA COMO iiPCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHV-3 A CAMPO</b>	<b>68</b>
4.3.1	Tecnología iiPCR	68
4.3.2	Muestras	69
4.3.3	Detección de EHV-3 por iiPCR y qPCR	70
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>71</b>
4.4.1	Validación diagnóstica de la técnica de qPCR para la detección de EVH-3	71
4.4.2	Comparación de la eficacia de distintos compuestos antivirales para reducir o inhibir la replicación de EHV-3 <i>in vitro</i>	71
4.4.3	Evaluación de la eficacia del compuesto antiviral seleccionado, en yeguas infectadas en forma experimental con EHV-3	72
4.4.4	Validación de la plataforma tecnológica conocida como iiPCR para el diagnóstico de EHV-3 a campo	72
<hr/>		
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
<hr/>		
<b>CAPÍTULO 1</b>		
<b>ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA</b>		
5.1.1	Virus	76
5.1.1.a	Clon viral E/9283/07 C3A	76
5.1.1.b	Cepas de campo de EHV-3	76
5.1.2	Variabilidad intraensayo e interensayo	79
5.1.3	Estandarización de la metodología de qPCR en la evaluación de compuestos antivirales	82
5.1.3.a	Curva de calibración	82
5.1.3.b	Cinética de replicación	83
5.1.3.c	Validación diagnóstica de la técnica de qPCR	85
<b>CAPÍTULO 2</b>		
<b>COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DISTINTOS COMPUESTOS ANTIVIRALES PARA REDUCIR O INHIBIR LA REPLICACIÓN DE EHV-3 <i>IN VITRO</i>.</b>		
5.2.1	Ensayos dosis-respuesta de los compuestos antivirales sintéticos contra EHV-3 en cultivos celulares	89
5.2.2	Ensayos dosis-respuesta de compuestos antivirales naturales ( $\lambda$ -carragenanos) contra EHV-3 en cultivos celulares	91
5.2.3	Ensayos comparativos de distintas concentraciones de los compuestos antivirales sintéticos sobre la producción de EHV-3 en cultivos celulares, por qPCR y DICT50%/ml	92

---

5.2.4 Comparación de la eficacia de ACV, HPMPC y GCV frente a cepas de campo de EHV-3.	94
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE GANCICLOVIR PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ECE EN YEGUAS INFECTADAS EN FORMA EXPERIMENTAL CON EHV-3</b>	<b>99</b>
5.3.1 Infección experimental con EHV-3	100
5.3.2 Lesiones y cuadro clínico	100
5.3.3 Excreción viral	103
5.3.4 Infectividad del virus, previamente detectado por qPCR en los hisopados de las yeguas bajo estudio	105
5.3.5 Respuesta de anticuerpos neutralizantes inducida por la infección por EHV-3	106
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA CONOCIDA COMO iiPCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHV-3 A CAMPO</b>	<b>110</b>
5.4.1 Sensibilidad y especificidad analítica de la iiPCR	111
5.4.2 Detección de EHV-3 mediante iiPCR y qPCR	113
<b>6. DISCUSIÓN</b>	
<b>6.1 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DISTINTOS COMPUESTOS ANTIVIRALES PARA REDUCIR O INHIBIR LA REPLICACIÓN LA REPLICACIÓN DE EHV-3 <i>IN VITRO</i></b>	<b>115</b>
<b>6.2 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE GANCICLOVIR PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ECE, EN YEGUAS INFECTADAS EN FORMA EXPERIMENTAL CON EHV-3</b>	<b>118</b>
<b>6.3 ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA CONOCIDA COMO iiPCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHV-3 A CAMPO</b>	<b>121</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
<b>8. APÉNDICE TÉCNICO.</b>	
<b>8.1 MULTIPLICACIÓN DE VIRUS EN CÉLULAS</b>	<b>126</b>
8.1.1 Titulación de virus por DICT50%/ml	126
8.1.2 Titulación de virus por UFP/ml	126
8.1.3 Determinación del tamaño de las placas de lisis	127
8.1.4 Aislamiento viral en cultivos celulares	127
<b>8.2 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE GENOMA VIRAL</b>	<b>128</b>
8.2.1 Extracción de ADN	128
8.2.2 PCR convencional	128
8.2.3 Cuantificación de ADN viral por qPCR	128
8.2.4 Secuenciación del ADN	129
<b>8.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ESPECÍFICOS CONTRA EHV-3</b>	<b>129</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>131</b>

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Compuestos antivirales contra EHV-3.*n.d.: no determinado.....	44
Tabla 4.1: Cepas de campo y control, utilizadas para evaluar la eficacia de los compuestos antivirales.*A-E, cada letra corresponde a un establecimiento; **Tamaño de placa (media aritmética del tamaño de 20 placas de lisis) comparado con el tamaño de placas de la cepa de referencia (tamaño estándar): “pequeño” es 1,64 veces más grande que la cepa de referencia y “grande” es 2,88 veces más grande.....	52
Tabla 4.2: Diseño experimental para la evaluación de la eficacia de GCV 0,01% p/p en yeguas experimentalmente infectadas con EHV-3.*nc: No corresponde.....	64
Tabla 4.3: Sistema de “scoring” aplicado durante la evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia de GCV 0,01% p/p.....	67
Tabla 5.1: Resultados de los ensayos de titulación del virus E/9283/07 C3A por UFP/ml. Se muestran únicamente los resultados obtenidos en cada ensayo para la dilución 1/10000, en la cual se obtuvieron entre 20 y 30 placas de lisis por pocillo. *Promedio del recuento de placas obtenido en la dilución 10 <sup>-4</sup> de 3 réplicas **Promedio del área de entre 20-30 placas de lisis de las 3 réplicas.....	79
Tabla 5.2: Resultados del análisis por qPCR, en paralelo con DICT50%/ml de diluciones seriadas (base 10) del lote viral de trabajo E/9283/07 C3A. *Ne: No establecido; Indet: Indeterminado; (-): Negativo; (+): Positivo; R2: coeficiente de determinación.....	82
Tabla 5.3: Resultados obtenidos por iiPCR, qPCR y aislamiento en cultivo celular de las 12 muestras que se encontraron ubicadas en la zona gris de Ct determinado por qPCR y que fueron analizadas por las tres metodologías.....	87
Tabla 5.4: Análisis de varianza factorial de medidas repetidas en el tiempo (p < 0,05) para el AUC de ACV, HPMP y GCV, cada uno a distintas concentraciones. *El valor p que figura en la tabla para las distintas concentraciones de cada compuesto fue determinado contra el virus sin tratamiento (control de virus, +). .....	94
Tabla 5.5: Eficiencia de los compuestos antivirales analizados <i>in vitro</i> , frente a la infección de cultivos celulares con diversas cepas de campo de EHV-3. Los valores se expresan en porcentaje de inhibición de la replicación viral medida en términos de %IT, %IN y %IPV. %IT: Porcentaje de inhibición del tamaño de placas de lisis; %IN: porcentaje de inhibición del número de placas de lisis; %IPV: porcentaje de inhibición de la producción de virus. ....	95
Tabla 5.6: Títulos promedios del inóculo administrado a cada grupo determinados por qPCR, expresados en Log <sub>10</sub> y estimados por DICT50%/ml. *DICT50%/ml fue estimado por la ecuación de la recta <b>Log<sub>10</sub> DICT50%/ml = 1,17 Log<sub>10</sub> qPCR – 0,76</b> , con un R2 de 0,88 (ANOVA de una vía, p < 0,0001).....	100
Tabla 5.7: Sensibilidad analítica de la iiPCR. En negrita se indica el límite de detección para el genoma de EHV-3. R*: resultado; NR**: no realizado; ND***: no detectado. ....	111
Tabla 5.8: Resultados obtenidos por iiPCR y qPCR de aislamientos de campo y cepas de referencia de otros patógenos equinos. R*: resultado; **Cepas de referencia cedidas gentilmente por Dr. Dubovi, Cornell University; ND***: No detectado; ****Cepa vacunal de arteritis viral equina (AVE). ....	112
Tabla 5.9: Concordancia entre las técnicas de iiPCR y qPCR para la detección de EHV-3 en hisopados perineales.....	113

## **ÍNDICE DE DIAGRAMAS**

Diagrama 4.1: Ensayos comparativos de distintas concentraciones de los compuestos antivirales sintéticos sobre la producción de EHV-3 en cultivos celulares, por qPCR y DICT50%/ml.....	56
Diagrama 4.2: Comparación de la eficacia de ACV, HPMP y GCV frente a cepas de campo de EHV-3 .....	58
Diagrama 5.1: Comparación de las 411 muestras incluidas en la validación del ensayo de qPCR, en referencia a los resultados de aislamiento en cultivo celular, y de acuerdo al punto de corte establecido por Ct (panel a la izquierda) y copias de genoma (panel a la derecha).....	86
Diagrama 5.2: Comparación de clasificación de muestras según qPCR con punto de corte de baja y alta sensibilidad (Ct 31,04 y Ct 38,5, respectivamente), asociada a al diagnóstico por iPCR y a la detección de virus por aislamiento en cultivo celular. Se muestra la zona gris entre ambos puntos de corte, en donde quedan ubicadas 19 muestras. ....	86
Diagrama 5.3: “Box and whisker” para la CE <sub>50</sub> de número de placas (ANOVA de una vía, p = 0,00261) y CE <sub>50</sub> de tamaño de placas (ANOVA de una vía, p = 0,012) de lisis, frente al tratamiento con ACV, HPMP y GCV CE <sub>50N</sub> y de CE <sub>50T</sub> .....	90
Diagrama 5.4: “Box and whisker” del AUC para el “score” clínico global en los 5 grupos analizados. No se observó diferencia significativa entre los grupos (ANOVA de una vía, p = 0,322). El * muestra el valor del AUC para la yegua 6 (AUC = 216,50).....	101
Diagrama 5.5: “Box and whisker” del AUC del “score” clínico global, de los grupos control y preventivos, excluida la yegua 6. Las diferencias significativas se muestran en letras (ANOVA de una vía, p = 0,0088).1: grupos control (C y T <sub>p</sub> ), 2: grupos tratados de forma preventiva (P <sub>4</sub> y P <sub>4/24</sub> ). ....	102
Diagrama 5.6: “Box and whisker” del AUC del “score” clínico global, de los grupos control, preventivos y terapéutico. Las diferencias significativas en el “score” global se muestran en letras (p = 0,034).1: grupos control (C y T <sub>p</sub> ); 2: grupos tratados de manera preventiva (P <sub>4</sub> y P <sub>4/24</sub> ); 4: grupo tratado en forma terapéutica (T <sub>GCV</sub> ). ...	102

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.1: (a) Fotografía de alfa herpesvirus equinos tomada por microscopía electrónica ( <i>Adaptado de</i> (Straus y col., 1988), (b) estructura del virión ( <i>Adaptado de Viral Zone 2017, Swiss Institute from Bioinformatics</i> ). ....	27
Figura 1.2: Lesiones de ECE en prepucio y mucosa del pene de un padrillo.....	31
Figura 1.3: Lesiones de ECE en la yegua. Progresión secuencial de lesiones presentes en la superficie cutánea y en la mucosa interna de los labios de la vulva, así como también en la base de la cola (e). De (a) a (g) se observan los distintos estadios clínicos, desde vesícula, pústula, úlcera hasta la cicatrización, incluyendo también complicaciones como miasis externa (d).....	32
Figura 1.4: Toma de muestra de hisopado perineal-vaginal en una yegua (a) y de pene-prepucio de un padrillo (b).....	33

Figura 1.5 Monocapa de células EDerm (NBL-6) sin infectar (control, a) e infectadas con EHV-3 (b, c y d) Fotografías tomadas en el microscopio invertido con un aumento de 40X (a, b y c) y 100X (d). .....	34
Figura 1.6: (a y b) Preparación de la yegua pre-servicio y examen clínico; (c) instrumentos individuales para la higiene de cada padrillo.....	36
Figura 1.7: Estructura química de los tres grupos de análogos de nucleósidos, análogos de guanósina y timidina acíclica, y fosfonatos de nucleósidos acíclicos.....	41
Figura 1.8: Mecanismo de acción de los compuestos antivirales: (a) análogos de guanósina acíclica; (b) análogos de timidina acíclica; (c) de los fosfonatos de nucleósidos acíclicos. En (a), tanto para ACV como para GCV, la TK viral realiza la primera fosforilación del análogo de guanósina acíclica mientras que las restantes fosforilaciones son realizadas por la TK celular. En (b) la TK viral realiza las dos primeras fosforilaciones del compuesto y sólo la última fosforilación la realiza la TK celular. En (c), los fosfonatos de nucleósidos acíclicos, poseen en su estructura un fosfonato el cual es equivalente a un fosfato, por lo que no requieren de la TK viral para la primera fosforilación. Los análogos de guanósina (a) y timidina (b) acíclica, actúan como inhibidores competitivos/sustrato alternativo para la ADN polimerasa dando lugar a la finalización de la elongación o a la formación de una cadena de ADN no funcional, en cambio los fosfonatos acíclicos (c) actúan como inhibidores competitivos y producen la finalización de la elongación del ADN. <i>Adaptado de Erik De Clercq, 2004a</i> . .....	42
Figura 4.1:(a) Potrero con bebederos y comederos comunitarios en donde se alojaban las yeguas; (b) corral de encierre y bretes de trabajo. ....	60
Figura 4.2: (a) Preparación del principio activo; (b) preparación del producto farmacéutico: GCV en crema 0,01% p/p .....	62
Figura 4.3: Identificación de los animales en la parrilla costal izquierda con tiza <i>ad hoc</i> . ....	63
Figura 4.4: (a) Preparación de la zona genital y perineal para la infección con EHV-3, (b) Inoculación tópica por medio de un hisopo conteniendo EHV-3. ....	65
Figura 4.5: Obtención de muestras (HPV en medio de transporte virológico y sangre sin anticoagulante) y toma de temperatura rectal. ....	67
Figura 4.6: Reacción de iiPCR: (1) tubo capilar ubicado en un compartimento aislado, con un dispositivo de calefacción; (2) la convección de temperatura se produce por el calentamiento de la parte inferior del tubo (anillo de cobre); (3) la convección térmica impulsa el movimiento del contenido del capilar dando lugar a la reacción de PCR; (4) desnaturalización del ADN; (5) hibridación con los cebadores; (6) extensión de una nueva hebra de ADN (7) la amplificación completa del ADN se produce en un ciclo completo de convección térmica.....	68
Figura 4.7: Secuencia de pasos para el ensayo de iiPCR mediante el uso del dispositivo POCKIT™. ....	69
Figura 5.1: Tamaños de placas de lisis de los 25 aislamientos de campo de EHV-3 y de la cepa de referencia, determinado a las 72 h pi (el valor graficado corresponde a la media del tamaño determinado para 20 placas por cada aislamiento).Las barras grises corresponden a las cepas de campo (aislamientos) mientras que la barra blanca corresponde a la cepa de referencia de EHV-3, cedida gentilmente por el Dr. Dubovi, Cornell University	76
Figura 5.2: Secuencia génica en las posiciones 904, 1103 y 1264 de la región parcial del gen gG de los 25 aislamientos argentinos de EHV-3. ....	77
Figura 5.3: Relación filogenética entre aislamientos de campo argentinos y cepas de EHV-3 aisladas en otras partes del mundo. El árbol filogenético fue generado por Neighbour-Joining utilizando la secuencia parcial del	

gen gG de 496 pb. Valores de Bootstrap se muestran por 1000 réplicas. Barra, 0,001 sustituciones por nucleótido. ....	78
Figura 5.4: “Control chart” para: (a) número de placas de lisis; (b) título infeccioso, expresado como UFP/ml; y (c) tamaño de placas de lisis, expresado como Log <sub>10</sub> ; obtenidos por la infección con E/9283/07 C3A en la dilución 1/10000 en cultivo de células EDerm. ....	80
Figura 5.5: Recuento de placas de lisis en relación al pasaje de células utilizados. Se marca entre líneas el rango de admisión para el número de placas de lisis, determinado con anterioridad, entre 4 y 32,5. ....	81
Figura 5.6: Relación entre título viral por qPCR y DICT50%/ml. ....	83
Figura 5.7: Cinética de replicación viral de EHV-3 medida por DICT50%/ml. ....	84
Figura 5.8: Cinética de replicación viral de EHV-3 medida por qPCR. ....	84
Figura 5.9: Dosis-respuesta para número (N) y tamaño (T) de placas de lisis en presencia de ACV, HPMP, GCV y BVDU. Para cada compuesto, se muestra la CE <sub>50</sub> y CE <sub>100</sub> obtenidas con sus respectivos DE. Para CE <sub>50</sub> con diferente letra en superíndice se indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, CE <sub>50N</sub> p = 0,00261 y CE <sub>50T</sub> p = 0,012). ....	89
Figura 5.10: Células EDerm fijadas y teñidas con CV 0,1% en formol 10%. Se muestran 2 fotografías de placas de lisis producidas por la infección con EHV-3 de células, sin tratamiento (control de virus), y tratadas con ACV 10 µg/ml, HPMP 4 µg/ml y GCV 0,4 µg/ml. ....	91
Figura 5.11: Dosis-respuesta para número de placas de lisis en presencia de λ-carragenanos. ....	91
Figura 5.12: Células EDerm fijadas y teñidas con CV 0,1% en formol 10%. Se observan 2 fotografías de placas de lisis producidas por la infección con EHV-3, sin tratamiento (control de virus) y tratadas con λ-carragenanos 100µg/ml. ....	92
Figura 5.13: Cuantificación de la producción viral por qPCR y DICT50%/ml, en presencia de ACV, HPMP y GCV, y en ausencia de tratamiento (control), a distintos tiempos pi. Para los tres compuestos a distintas concentraciones, el panel de la izquierda ilustra la producción viral medida por qPCR y el de la derecha, por DICT50%/ml. Entre paréntesis se muestran los resultados de AUC promedio para cada concentración de cada compuesto a lo largo del tiempo. ....	93
Figura 5.14: Efecto de ACV 5 µg/ml (ACV 5), GCV 0,05 µg/ml (GCV 0,05) y HPMP 2 µg/ml (HPMP 2) sobre el tamaño (T) de las placas de lisis inducidas por la infección de células EDerm con distintas cepas de campo de EHV-3 (n: 6) y una cepa control (E/9283/07 C3A). Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula sobre las columnas (ANOVA de dos vías; Test de Tukey; p < 0,05). ....	96
Figura 5.15: Efecto de ACV 5 µg/ml (ACV 5), GCV 0,05 µg/ml (GCV 0,05) y HPMP 2 µg/ml (HPMP 2) sobre el número (N) de placas de lisis inducidas por la infección de células EDerm con distintas cepas de campo de EHV-3 (n: 6) y una cepa control (E/9283/07 C3A). Se muestra en un recuadro el efecto promedio de los tratamientos sobre las 6 cepas de campo y la cepa control. Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula sobre las columnas (ANOVA de dos vías; Test de Tukey; p < 0,0001). ....	97
Figura 5.16: Efecto de ACV 5 µg/ml (ACV 5), GCV 0,05 µg/ml (GCV 0,05) y HPMP 2 µg/ml (HPMP 2) sobre la producción de virus determinada por qPCR en células EDerm infectadas con distintas cepas de campo de EHV-3 (n: 6) y una cepa control (E/9283/07 C3a). Se muestra en un recuadro el efecto promedio de los tratamientos	

sobre las 6 cepas de campo y la cepa control. Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula sobre las columnas (ANOVA de dos vías; Test de Tukey;  $p < 0,05$ )..... 98

Figura 5.17: Área bajo la curva total de excreción viral determinada por qPCR y corregida por el punto de corte ( $10^{2,93}$  copias de genoma). Para cada grupo, se muestran las medias de AUC obtenidas. Con diferentes letras se muestran las diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p = 0,0294$ )..... 104

Figura 5.18: Evolución del ECE en yeguas infectadas con EHV-3 sin la aplicación de un tratamiento (grupo C), tratadas de manera preventiva (grupos  $P_4$  y  $P_{4/24}$ ) y tratadas de manera terapéutica ( $T_{GCV}$  y  $T_p$ ). En el eje vertical primario se grafica el “score” clínico (valor absoluto), la excreción viral medida en copias de genoma por qPCR y la temperatura rectal en °C, donde 0 es igual a 30°C y 15 es igual a 45°C. El recuadro coloreado marca la duración del tratamiento: en color verde representa el uso de GCV 0,01% p/p en la crema y en color gris representa a la crema placebo (sin GCV). Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula, para el “score” al día 12 pi en gris (ANOVA de una vía,  $p = 0,033$ ), para la excreción viral al día 12 en color rojo (ANOVA de una vía,  $p = 0,0137$ ) y para la respuesta de anticuerpos a los días 7, 23 y 28 pi en color azul (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ )..... 107

Figura 5.19: Infectividad de los HPV, tomados de yeguas infectadas con EHV-3 sin la aplicación de un tratamiento (grupo C), tratadas de manera preventiva (grupos  $P_4$  y  $P_{4/24}$ ) y tratadas de manera terapéutica ( $T_{GCV}$  y  $T_p$ ) y expresada en porcentaje de yeguas del grupo que excretan virus. Las barras indican el porcentaje de yeguas por grupo que excretan virus con capacidad de infectar células susceptibles. Las diferencias significativas en los días 12 y 16 pi se muestran en imprenta minúscula ( $p = 0,0005$  y  $p = 0,0306$ , respectivamente para cada día). El recuadro coloreado marca la duración del tratamiento: en color verde representa el uso de GCV 0,01% p/p en la crema y en color gris representa a la crema placebo (sin GCV)..... 108

Figura 5.20: Relación entre índice de iiPCR y  $\text{Log}_{10}$  de la dilución de EHV-3..... 112

Figura 5.21: Comparación mediante análisis ROC de la clasificación por índice de iiPCR y clasificación inicial de las muestras. .... 113

Figura 8.1: Titulación por UFP/ml en monocapa de células EDerm. En la figura se muestran dos placas de 12 pocillos inoculadas con diluciones seriadas base 10 ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ) de E/9283/07 C3A..... 127

Figura 8.2: Fotografías obtenidas en el microscopio invertido con un aumento de 100X de células EDerm teñidas con cristal violeta al 0,1%: (a) células sin infectar; (b, c, d) placas de lisis producidas por la infección con EHV-3. .... 127

## ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
ACV	Aciclovir
ADN	Ácido dextrorribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	Del inglés “ <i>American tissue culture collection</i> ”
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Del inglés “ <i>Area under the curve</i> ”, Área bajo la curva
AVE	Arteritis viral equina
BVDU	Brivudin
°C	Grados Celsius
Cat	Catálogo
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50%
CE <sub>100</sub>	Concentración efectiva 100%
CICUAE	Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
Cl <sub>2</sub> Mg	Cloruro de magnesio
cm <sup>2</sup>	Centímetros al cuadrado
CMC	Carboximetilcelulosa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CpHV-1	Del inglés “ <i>Caprine alphaherpesvirus 1</i> ”, Alfaherpesvirus caprino 1
Csp	Cantidad suficiente para
Ct	Del inglés “ <i>Cycle threshold</i> ”, Ciclo umbral
CV	Cristal violeta
DE	Desvío estándar
dNTP	Dinucleósido trifosfato
DICT50%	Dosis infectiva de cultivo de tejido 50%
ECE	Exantema coital equino
ECP	Efecto citopático
EDerm	Del inglés “ <i>Equine dermis</i> ”, Dermis equina
ej	Ejemplo
etc	Etcetera
FHK	Del inglés “ <i>Fetal Horse Kidney-Transformed clone 3.1</i> ”, Riñón de feto equino clon 3.1
g	Gramos
gG	Glicoproteína G
h	Hora/s
EHV-1	Del inglés “ <i>Equid alphaherpesvirus 1</i> ”, Alfaherpesvirus equino 1
EHV-2	Del inglés “ <i>Equid betaherpesvirus 2</i> ”, Betaherpesvirus equino 2
EHV-3	Del inglés “ <i>Equid alphaherpesvirus 3</i> ”, Alfaherpesvirus equino 3
EHV-4	Del inglés “ <i>Equid alphaherpesvirus 4</i> ”, Alfaherpesvirus equino 4
EHV-5	Del inglés “ <i>Equid betaherpesvirus 5</i> ”, Betaherpesvirus equino 5
EHV-8	Del inglés “ <i>Equid alphaherpesvirus 8</i> ”, Alfaherpesvirus equino 8
EHV-9	Del inglés “ <i>Equid alphaherpesvirus 9</i> ”, Alfaherpesvirus equino 9
FeHV-1	Del inglés “ <i>Felid alphaherpesvirus 1</i> ”, Alfaherpesvirus felino 1
GCV	Ganciclovir
HHV-1	Del inglés “ <i>Human alphaherpesvirus 1</i> ”, Alfaherpesvirus humano 1
HHV-2	Del inglés “ <i>Human alphaherpesvirus 2</i> ”, Alfaherpesvirus humano 2
HHV-3	Del inglés “ <i>Human alphaherpesvirus 3</i> ”, Alfaherpesvirus humano 3, Virus de Varicela Zoster
HPMPC	Del inglés “ <i>Hydroxyl 2 Phosphonmethoxy Propyl Cytosine</i> ”, Cidofovir
HPLC	Del inglés “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”, Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPV	Hisopado perineal-vaginal
IA	Inseminación artificial
Ig	Inmunoglobulina
iiPCR	Del inglés “ <i>Isolated isothermal polymerase chain reaction</i> ”, PCR isotérmica aislada
IN%	Porcentaje de inhibición del número de placas de lisis

---

INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPV%	Porcentaje de inhibición de la producción de virus
IT%	Porcentaje de inhibición del tamaño de placas de lisis
IV	Del inglés <i>“intravenous”</i> , Endovenosa
Kb	Kilo bases
Kg	Kilogramo
Log	Logaritmo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
MHE	Mielo encefalitis por alfa herpesvirus equino
MEM-E	Medio esencial mínimo Eagle
MEM-D	Medio Eagle mínimo Dulbecco modificado
nt	Nucleótidos
ORF	Del inglés <i>“Open reading frame”</i> , Marco abierto de lectura
%p/p	Porcentaje peso en peso
Pb	Pares de bases
PCR	Del inglés <i>“Polymerase chain reaction”</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
PCV	Penciclovir
pi	Post-infección
PO	Del inglés <i>“Per orally”</i> , vía oral
qPCR	Del inglés <i>“Quantitative polymerase chain reaction”</i> , PCR cuantitativa en tiempo real
ROC	Del inglés <i>“Receiver Operating Characteristic”</i> , Característica Operativa del Receptor
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Del inglés <i>“Roswell Park Memorial Institute”</i>
SFB	Suero fetal bovino
SPC	Sangre pura de carrera
subsp	Subespecie
TE	Transferencia embrionaria
TK	Del inglés <i>“Thymidine kinase”</i> , Timidina quinasa
UFP	Unidades formadoras de placa
UL	Del inglés <i>“Unique long”</i> , Región única larga
US	Del inglés <i>“Unique short”</i> , Región única corta
VA	Vagina artificial
VACV	Valaciclovir
κ	Kappa
λ	Lambda
μ	Micras
μg	Microgramo
μM	Micromolar

## **RESUMEN**

El exantema coital equino (ECE), causado por la infección con alfa herpesvirus equino 3 (*Equid alphaherpesvirus 3*, EHV-3), es una enfermedad venérea, altamente contagiosa y caracterizada por la formación de pápulas, vesículas, pústulas y úlceras en los genitales externos de yeguas y padrillos. La infección no resulta en enfermedad sistémica, ni tampoco produce infertilidad y/o aborto. El impacto negativo del ECE radica en la necesidad de interrumpir temporalmente la actividad reproductiva; el riesgo de diseminación iatrogénica de EHV-3, y la ocurrencia de brotes en centros de inseminación artificial (IA) y transferencia embrionaria (TE). Esto se ve reflejado en retrasos de las fechas de parto, disminuciones significativas del número de yeguas servidas y en las tasas de preñez en las yeguas afectadas, al reducirse las oportunidades de ser servidas.

El diagnóstico se realiza en forma clínica, ya que las lesiones son muy características, pero como existen animales latentemente infectados en los que el virus se reactiva y re-excreta en forma subclínica y no predecible, la identificación de los mismos resulta crítica para prevenir la transmisión de la infección, principalmente de yeguas a padrillos durante el servicio. Existen técnicas de diagnóstico rápidas, como la PCR convencional y la PCR en tiempo real (qPCR), pero las mismas no son aplicables para determinar la excreción viral subclínica *in situ*, previo al servicio, IA y/o TE. Las medidas de control frente a brotes de ECE en centros de reproducción son, limitar la diseminación de la infección por medio del reposo sexual en animales clínicamente afectados, detectar tempranamente nuevos casos clínicos, e implementar estrictas medidas de higiene para evitar la transmisión mecánica. El tratamiento es paliativo y consiste en la utilización de antisépticos/astringentes, anti-inflamatorios y antimicrobianos, que contribuyen a acortar el período de reposo sexual.

El objetivo general de este trabajo fue disminuir el impacto negativo de las infecciones por EHV-3 mediante la evaluación de compuestos antivirales para su uso tópico, y la incorporación de un método rápido de diagnóstico rápido a campo.

Inicialmente se realizó un análisis *in vitro* de cuatro compuestos antivirales sintéticos (aciclovir, cidofovir, ganciclovir y brivudin) y uno natural (lamda-carragenano). Con los resultados de concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) y CE<sub>100</sub>, se seleccionaron tres concentraciones de aciclovir, cidofovir y ganciclovir para continuar con el análisis de inhibición de la producción viral en cultivos celulares. Posteriormente, estos tres compuestos fueron evaluados contra seis cepas de campo de EHV-3 aisladas en nuestro laboratorio entre los años 2001 y 2009. Se demostró que 5 µg/ml de aciclovir, 2 µg/ml de cidofovir y 0,05 µg/ml de ganciclovir son efectivos para reducir la replicación de EHV-3 *in vitro*, siendo ganciclovir el compuesto más eficiente.

Se continuó entonces, con el análisis de ganciclovir *in vivo* y el mismo fue preparado en crema base al 0,01% p/p (GCV 0,01% p/p) para su uso tópico, como tratamiento

preventivo o terapéutico, en yeguas infectadas experimentalmente con EHV-3. Dos grupos de animales recibieron tratamiento preventivo, uno a las 4 h y el otro a las 4 y 24 h post-infección; mientras que un tercer grupo recibió tratamiento terapéutico con este compuesto una vez iniciado el cuadro clínico. Un grupo de yeguas, experimentalmente infectadas, que no recibió tratamiento antiviral y otro tratado con crema base sin antiviral (placebo) fueron los grupos controles. Como parámetros de la eficacia del compuesto *in vivo*, se evaluaron: signos clínicos y lesiones (mediante un “score” numérico); temperatura rectal; excreción viral por qPCR y por infectividad en cultivos celulares; y respuesta de anticuerpos séricos por seroneutralización. En los grupos tratados a las 4 y 4/24 h (animales clínicamente sanos, pero excretando virus), se redujo significativamente la severidad del cuadro clínico y en uno de ellos se observó una disminución significativa en el tiempo de excreción de virus infectivo (animales tratados a las 4 h post-infección). Con respecto a los animales tratados con GCV 0,01% p/p en forma terapéutica, se observó una reducción de la severidad clínica y una disminución significativa en la intensidad y en el tiempo de excreción de virus infectivo (ocho días menos). Este ensayo *in vivo*, representa un avance en el desarrollo de un tratamiento preventivo y/o terapéutico, basado en la aplicación tópica de ganciclovir para controlar la infección por EHV-3. Ajustes en la concentración, forma de presentación o frecuencia del tratamiento deberían considerarse para alcanzar una inhibición completa de la excreción viral.

Por último, se adoptó la plataforma tecnológica conocida como PCR isotérmica aislada (iiPCR), para el diagnóstico rápido (1:30 h) de la infección por EHV-3, al pie del animal. Se realizó la validación de este método estableciendo la sensibilidad y especificidad (analítica y diagnóstica), comparado con la qPCR. Los resultados obtenidos con la iiPCR tiene una concordancia de 98,2% con la qPCR, metodología que si bien permitía el diagnóstico rápido de EHV-3 en el laboratorio, no era útil desde el punto de vista práctico para el diagnóstico rápido e *in situ*, previo a las maniobras reproductivas.

Para concluir, tanto el uso de GCV en forma tópica como tratamiento de las lesiones producidas por la infección con EHV-3, así como también la incorporación de la tecnología de iiPCR para el diagnóstico rápido al pie del animal, podrían contribuir a disminuir el impacto negativo del ECE en la producción equina.

---

## **ABSTRACT**

Equine coital exantema (ECE), caused by equid alphaherpesvirus 3 (EHV-3), is a contagious venereal disease, characterized by the formation of papules, vesicles, pustules and ulcers on the external genitalia of both mares and stallions. EHV-3 infection does not result in systemic infection, infertility and / or abortion. The negative impact of ECE lies on the need to temporarily interrupt reproductive activity, the risk of iatrogenic dissemination of EHV-3, and the occurrence of outbreaks at artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) centers. This may translate into delayed foaling dates, and significant decreases in the number of mares mated and in pregnant rates, as opportunities of being mated are lost.

ECE clinical lesions are usually characteristic enough for a clinical diagnosis, but as there are latently infected animals from which the virus can be re-activated and re-excreted without lesions, the identification of these animals is critical to prevent transmission, principally from mares to stallions during mating. There are quick diagnostic tests, such as conventional or real time PCR (qPCR), which can be carried out in the laboratory, but these techniques are not applicable for detection of excretion of virus *in situ* before mating, AI and/or ET. Cessation of breeding of clinically affected animals until the end of the excretion period, heightened vigilance by the personnel for early recognition of new clinical cases and strict adherence to breeding shed hygiene procedures designed to eliminate mechanical transmission of the virus, are the primary ways to avoid the spread of infection if a case of ECE is observed during the breeding season. Treatment is palliative and is based on the application of antiseptic/astringents, anti-inflammatory agents and broad-spectrum antimicrobials, which contribute to a rapid and uncomplicated healing of genital lesions.

The general objective of this work was to decrease the negative impact of ECE infections by the evaluation of antiviral compounds as topical treatment, and the implementation of a rapid detection field assay.

Initially, the *in vitro* analysis of four synthetic antiviral compounds (acyclovir, cidofovir, ganciclovir and brivudin) and one natural (lamda-carragenan) antiviral compound was carried out. With the results on the 50% effective concentration (CE<sub>50%</sub>) and the CE<sub>100%</sub>, three concentrations of each of the compounds acyclovir, cidofovir and ganciclovir, were selected to continue with the analysis of inhibition of

viral production in cell cultures. Next, these three compounds were evaluated against six EHV-3 field strains, isolated in our laboratory between 2001 and 2009. By these assays, we demonstrated that 5 µg/ml of acyclovir, 2 µg/ml of cidofovir and 0.05 µg/ml of ganciclovir are effective to reduce the replication of EHV-3 *in vitro*, being ganciclovir the most efficient compound.

We proceeded then with the *in vivo* analysis of ganciclovir formulated in base cream at 0.01% p/p (GCV 0.01% p/p), as to be used topically, in a preventive and therapeutic treatment, in mares experimentally infected with EHV-3. While two groups of such mares received a preventive treatment, one of them at 4 h and the other at 4 and 24 h post-infection; a third group received the therapeutic treatment during clinical manifestation of ECE. Two other groups were used as control: one of them did not receive any treatment and the other received base cream without antiviral (placebo). To evaluate the *in vivo* efficacy of GCV 0.01% p/p, the following were assessed: clinical signs and lesions (evaluated by a numerical score); rectal temperature; viral excretion by qPCR and by infection of culture cells; and antibodies response by seroneutralization. In the groups which had received preventive treatment at 4 and 4/24 h (clinically healthy animals, but excreting virus), the clinical severity was significantly reduced, but the excretion of virus was only significantly reduced in one of them (treated 4 h post-infection). Regarding the animals treated during the clinical manifestation of ECE with GCV 0.01% p/p, the clinical severity and the intensity and period of excretion of infective virus (reduced in 8 days) were significantly reduced. This *in vivo* experiment represents an advance in the development of a treatment, either preventive or therapeutic, or both, based on the topical administration of ganciclovir to control infection by EHV-3. Adjustments in the concentration, presentation form or frequency of administration, should be considered in order to achieve complete inhibition of viral excretion.

Finally, the technological platform known as insulated isothermal PCR (iiPCR), was adopted for the rapid (1:30 h) diagnosis of EHV-3 infection *in situ*. The validation was carried out to determine the sensibility and specificity, both analytical and diagnostic, compared to qPCR for the detection of EHV-3. Results showed that iiPCR has a 98,2% concordance with qPCR, a technique which it is not practically useful for *in situ* diagnosis before mating.

To conclude, both the topical administration of GCV as a treatment for the infection of EHV-3 and the incorporation of the iPCR technology for the rapid diagnosis *in situ*, could contribute to decrease the negative impact of ECE in equine production.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Exantema coital equino**

El exantema coital equino (ECE), causado por el alfaherpesvirus equino 3 (*Equid alphaherpesvirus 3*, EHV-3), es una enfermedad infecciosa aguda, caracterizada por la formación de pápulas, vesículas, pústulas y úlceras en el pene y prepucio de los padrillos y en la mucosa vaginal y vestibular, y en la piel de la región perineal de las yeguas. Esta infección viral, altamente contagiosa, se transmite principalmente de forma venérea, pudiendo también transmitirse por contacto directo con objetos contaminados.

El ECE es también conocido como “viruela genital del caballo”, “enfermedad venérea eruptiva”, “vulvitis y balanitis venérea equina” o “exantema vesicular coital” y la enfermedad fue descrita por primera vez en Irlanda a principios del siglo XX (Craig y Kehoe, 1921). En 1960, se describió en Argentina (Monteverde y col., 1960) y en Australia, donde Osborne y Bain (1961) la asociaron con la infección por espiroquetas, observadas en frotis de semen y raspados de lesiones tempranas. El EHV-3 fue aislado por primera vez en 1968, de manera concurrente en los Estados Unidos (Bryans, 1968), Canadá (Girard y col., 1968) y Australia (Pascoe, 1981), y actualmente presenta una distribución mundial (Barrandeguy y Thiry, 2012; Kirisawa y col., 2017).

La infección con EHV-3 no resulta en enfermedad sistémica debido a que el virus no hace viremia y no infecta otros tejidos, ni órganos (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012; Blanchard y col., 1992; Paccamonti y Pycock, 2009; Parkinson, 2009; Thiry, 2006). Algunos autores argumentan que podría existir un efecto directo de la infección sobre la fertilidad y la preñez, (Feilen y col., 1979; Gleeson y col., 1976; Léon y col., 2008), pero en la actualidad existe evidencia suficiente de que este virus no genera infertilidad y/o aborto (Barrandeguy y Thiry, 2012; Bryans, 1980; Léon y col., 2008; Pascoe, 1981; van der Meulen y col., 2006a).

Si bien la enfermedad es relativamente benigna, el impacto negativo del ECE en la industria equina radica principalmente en la necesidad de interrumpir, temporalmente, la actividad reproductiva tanto en padrillos como en yeguas afectadas, sobre todo en la raza sangre pura de carrera (SPC) donde no está permitida la inseminación artificial (IA) (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012; HBLB, 2017); así como también al riesgo de diseminación iatrogénica de EHV-3 y a la ocurrencia de brotes de ECE en centros de IA y transferencia embrionaria (TE) (Barrandeguy y col., 2010a).

## **1.2. Agente etiológico: clasificación y taxonomía**

EHV-3, pertenece al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesviridae*, género *Varicelovirus* (Allen y Randall, 1979; Anonymous, 2017; Davison, 2010; Pellet y Roizman, 2007) (Figura 1.1).

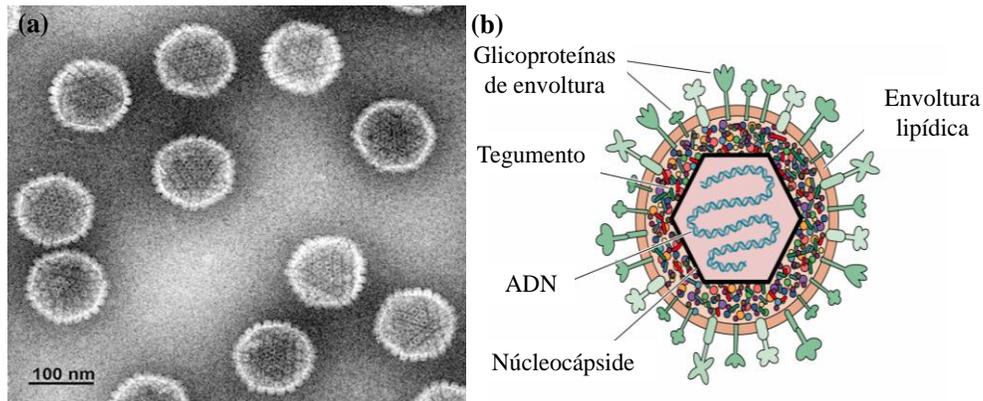


Figura 1.1: (a) Fotografía de alfaherpesvirus equinos tomada por microscopía electrónica (*Adaptado de* (Straus y col., 1988), (b) estructura del virión (*Adaptado de Viral Zone 2017, Swiss Institute from Bioinformatics*).

Este virus es antigénica, genética y patogénicamente distinto de otros herpes virus equinos (alfaherpesvirus equino 1: EHV-1, alfaherpesvirus equino 4: EHV-4, alfaherpesvirus equino 8: EHV-8, alfaherpesvirus equino 9: EHV-9, beta-herpes virus equino 2: EHV-2 y beta-herpes virus equino 5: EHV-5) (Allen y col., 1977; Allen y Umphenour, 2004; Baumann y col., 1986; Hartley y col., 1999; Kleiboeker y Chapman, 2004). El genoma de EHV-3 está constituido por ADN de doble cadena tipo D (149 kilo bases), con dos regiones únicas, una larga (UL) y otra corta (US) que se encuentran flanqueadas por segmentos de repeticiones invertidas (TRL/IRL y TRS/IRS) (Atherton y col., 1982). Hasta el 2013 se conocían únicamente las secuencias de nucleótidos (nt) de los genes codificantes de ciertas proteínas de EHV-3, como la glicoproteína G (gG), la ADN polimerasa y la proteína de envoltura del ADN (Ehlers y col., 1999; Hartley y col., 1999; Kleiboeker y Chapman, 2004). Posteriormente, se conoció la secuencia de nucleótidos del genoma completo de EHV-3, el cual posee un tamaño total de 151601 nt y codifica para 76 genes (Sijmons y col., 2014). Genéticamente, EHV-3 es el más divergente de los alfaherpesvirus equinos, con una identidad nucleotídica que va desde 62,1 a 64,9%, mientras que EHV-1, 4, 8 y 9 tienen una identidad nucleotídica entre ellos del 78% (Sijmons y col., 2014).

La secuencia de nucleótidos del gen de la gG de EHV-3 comprende un marco abierto

de lectura (ORF) de 1344 pares de bases (pb) y se encuentra localizada en la región US del genoma. La misma codifica para una proteína de membrana de clase 1 de 448 aminoácidos y contiene regiones tanto conservadas como variables (aminoácidos 1 - 295 y 296 - 375, respectivamente), que también se encuentran en EHV-1 y EHV-4. De manera similar a la secuencia de aminoácidos de la gG de estos virus, la región variable C-terminal de la gG de EHV-3 contiene epítopes altamente inmunogénicos reconocidos por células tipo B en el hospedador natural (Hartley y col., 1999). Hasta el momento, no se han descrito variantes antigénicas de EHV-3, y no se ha realizado ningún análisis detallado de las proteínas o glicoproteínas inmunogénicas del virus (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012; Studdert, 1996).

EHV-3 replica *in vitro* sólo en cultivos celulares derivados de equinos (Allen y Bryans, 1977). Si bien existen referencias de que la temperatura óptima para la multiplicación y aislamiento del virus es de 34°C (Bouchey y col., 1987; Jacob y Steiner, 1988) en nuestra experiencia, 37°C es una temperatura permisiva para aislar (a partir de muestras de equinos infectados) y multiplicar EHV-3 en cultivos de células de dermis equina (EDerm).

El virus es lábil en el medio ambiente, y su infectividad es rápidamente inactivada por solventes lipídicos, detergentes, calor, secado y desinfectantes comunes disponibles para uso veterinario (Dwyer, 2004).

### **1.3. Transmisión y epidemiología**

La infección por EHV-3 es endémica en la mayoría de las poblaciones equinas de distintas razas en todo el mundo (Barrandeguy y Thiry, 2012), y el virus se transmite por contacto directo, principalmente durante el coito o a través de elementos contaminados con secreciones que contienen virus (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012; Studdert, 1996). Como elementos más frecuentes de transmisión iatrogénica de EHV-3 podemos nombrar guantes de examinación, instrumental de trabajo, escáner de ultrasonido o baldes utilizados en el momento del examen clínico ginecológico (examen pre-servicio), de la palpación rectal, del servicio y/o del aseo pre y post-servicio (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012). En Argentina, se ha descrito la transmisión iatrogénica a través de guantes y/o escáner de ultrasonido contaminados en yeguas de un centro de TE (Barrandeguy y col., 2010a), así como también debido al uso de un endoscopio contaminado en varios caballos SPC (Barrandeguy y col., 2010b), en donde se observó rinitis unilateral, manifestación atípica de la infección. A su vez, la

transmisión no coital también se ha asociado con lesiones en los labios, fosas nasales y zona periocular debido al contacto genito-nasal asociado a conductas como el hociqueo y el olfateo (Barba y col., 2015; Crandel y Davis, 1985; Cullinane y col., 1994). El virus podría transmitirse al eyaculado durante la extracción de semen, por contacto del pene con la vagina artificial (VA) y, en consecuencia, diseminarse a otros animales vía semen fresco o congelado (Metcalf, 2001). Por último, se ha sugerido también la transmisión mecánica por moscas (Gibbs y col., 1972).

El único reservorio conocido de EHV-3 son los equinos latentemente infectados, desde donde el virus se reactiva periódicamente y se re-excreta, generalmente de manera subclínica, actuando como fuente de propagación de virus a otros animales (Allen y Umphenour, 2004; Seki y col., 2004; Thiry, 2006). Hace algunos años, la latencia de EHV-3 fue demostrada por la reactivación y re-excreción del virus en yeguas seropositivas luego del tratamiento con glucocorticoides (Barrandeguy y col., 2008), así como también en forma espontánea en yeguas mantenidas en aislamiento durante 11 meses (Barrandeguy y col., 2010c). El sitio anatómico donde ocurre la latencia no se conoce, pero se estima, por analogía con el alfaherpesvirus caprino 1 (CpHV-1) y el alfaherpesvirus humano 2 (HHV-2), que producen una enfermedad clínicamente similar en cabras y humanos respectivamente, que el virus podría encontrarse en los ganglios nerviosos sacros (Barrandeguy y Thiry, 2012; Studdert, 1996). Se determinó, en un trabajo realizado en yeguas en un centro de monta de caballos SPC, que la prevalencia de animales que excretan EHV-3 en ausencia de manifestación clínica es del 6% (Barrandeguy y col., 2010c). Por otra parte, una vez que se ha producido la reactivación de la infección por EHV-3, la tasa de transmisión post-coital es del 100% (Everman y col., 1983).

Si bien la información existente acerca de la seroprevalencia de EHV-3 es escasa, Aurich y col., (2003) reportaron un 27% en caballos austríacos de Noriker Draft y Pagamjav y col., (2011) un 22,9% en equinos de distintas regiones de Mongolia. En Argentina se detectó un 48% de yeguas seropositivas en edad reproductiva durante un estudio realizado a campo en animales SPC (Barrandeguy y col., 2010c). Años más tarde, en Turquía se describió una seroprevalencia de 25,3% en una población de equinos que incluían animales de trabajo, SPC y otros (Ataseven y col., 2014) y recientemente, en Japón se encontró una seroprevalencia de 11,5% en padrillos y 2,3% en yeguas SPC (Kirisawa y col., 2017).

#### **1.4. Replicación viral y patogenicidad**

La replicación de EHV-3 se limita al epitelio estratificado del tejido epidérmico de la piel, márgenes muco-cutáneos y mucosas de la región genital. A diferencia de lo que sucede con EHV-1, EHV-3 no es capaz de atravesar la membrana basal de estos epitelios ni de infectar células mononucleares, limitando así la diseminación sistémica (Allen y Umphenour, 2004; Negussie y col., 2016). La destrucción del epitelio causada por la infección lítica provoca una fuerte respuesta inflamatoria localizada que da lugar a la formación de las lesiones cutáneas características del ECE (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012).

También ha sido descrita la presentación de un cuadro de linfadenopatía ano-rectal, pero no pudo establecerse si dicha inflamación era debida a la infección por EHV-3, al proceso inflamatorio asociado al ECE de la región o a una infección bacteriana secundaria (Barrandeguy y col., 2010a).

La inmunidad inducida por la infección con EHV-3 no ha sido estudiada en detalle; luego de la infección se detecta una respuesta de anticuerpos fijadores de complemento y neutralizantes, que alcanzan niveles máximos entre los días 14 y 21 post-infección (pi) (Allen y Bryans, 1977). Esto mismos autores sugieren que la respuesta inmune humoral del equino contra EHV-3 es menor que la respuesta a infecciones sistémicas por otros herpes virus. Sin embargo, en nuestra experiencia, los niveles de anticuerpos neutralizantes detectados son similares a aquellos inducidos por la infección con EHV-1 (Barrandeguy, datos no publicados).

Existen datos controvertidos sobre la inmunidad post-exposición frente a una re-infección con EHV-3. Algunos autores postulan que la inmunidad generada ante una infección es de corta duración y por esta razón no previene al animal de re-infecciones durante sucesivas temporadas de servicio (Allen y Umphenour, 2004; Uppal y col., 1989). Sin embargo, luego de la infección experimental de yeguas seropositivas y seronegativas se observó que la severidad de las lesiones, la duración y la intensidad de la excreción de virus fueron mayores en aquellas seronegativas (Barrandeguy y col., 2012).

También se especuló que la reactivación viral, en animales con infección latente, podría estar asociada a niveles bajos o decrecientes de anticuerpos neutralizantes, como se observó para el CpHV-1 (Tempesta y col., 1998). Sin embargo, la reactivación espontánea y re-excreción de EHV-3 en animales con niveles altos de anticuerpos neutralizantes fue descrita (Barrandeguy y col., 2010c).

### **1.5. Signos clínicos y lesiones**

Después de un período de incubación variable de entre 2 y 9 días, aparecen las lesiones como pápulas pequeñas (1-2 mm), que a menudo pasan desapercibidas. Posteriormente, progresan a vesículas, pústulas y, luego cuando se produce la destrucción epidérmica, se observan úlceras superficiales de hasta 10 mm (Figura 1.2 y Figura 1.3), que pueden unirse y formar erosiones, y úlceras extensas. Estas lesiones pueden ser pocas o numerosas, y observarse en diferentes estadios clínicos en un mismo animal simultáneamente. También se observa una inflamación localizada, con congestión, eritema y edema de los labios de la vulva y región perineal en yeguas, y del prepucio en padrillos. En los casos sin complicaciones, la curación se completa en 10 a 14 días, pero generalmente quedan cicatrices cutáneas despigmentadas características, que persisten durante muchas semanas (Allen y Umphenour, 2004; Blanchard y col., 1992; Studdert, 1996). La infección bacteriana secundaria con *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* es común e influye en la gravedad y duración de las lesiones epiteliales (Allen y Umphenour, 2004; Studdert, 1996).

En las yeguas puede observarse descarga vulvar, movimientos de la cola, orinar frecuente y cola arqueada. Ocasionalmente, los padrillos con lesiones extensas muestran incomodidad (caminar envarado), pérdida de libido y rechazo a la monta (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012; Studdert, 1996). Signos clínicos generales de infección como fiebre, anorexia o apatía pueden ser más severos en padrillos, pero son excepcionales (Allen y Umphenour, 2004). Durante un brote de ECE en un centro de TE en Argentina, se observó también constipación, tenesmo y evacuación de heces firmes, secas y cubiertas con mucosidad, en asociación a linfadenopatía ano-rectal y lesiones alrededor del ano (Barrandeguy y col., 2010a).



Figura 1.2: Lesiones de ECE en prepucio y mucosa del pene de un padrillo.



Figura 1.3: Lesiones de ECE en la yegua. Progresión secuencial de lesiones presentes en la superficie cutánea y en la mucosa interna de los labios de la vulva, así como también en la base de

la cola (e). De (a) a (g) se observan los distintos estadios clínicos, desde vesícula, pústula, úlcera hasta la cicatrización, incluyendo también complicaciones como miasis externa (d).

## **1.6. Diagnóstico**

Las lesiones genitales de ECE, tanto en yeguas como en padrillos, suelen ser características y el diagnóstico clínico se realiza con facilidad. La confirmación del diagnóstico puede realizarse en el laboratorio por aislamiento viral en cultivos celulares, detección del genoma del virus por PCR convencional o en tiempo real (qPCR), o demostración de un aumento (de al menos 4 veces) de los niveles de anticuerpos, en muestras pareadas de suero tomadas con 15 días de intervalo, entre la fase aguda y convaleciente (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y col., 2008; Dynon y col., 2001; Ehlers y col., 1999; Kleiboeker y Chapman, 2004; León y col., 2008; Seki y col., 2004; van der Meulen y col., 2006a).

La muestra de elección para remitir al laboratorio es material obtenido de las lesiones mediante un hisopado colocado en medio de transporte virológico (medio esencial mínimo suplementado con antibióticos y antimicóticos), o solución fisiológica estéril (Figura 1.4).



Figura 1.4: Toma de muestra de hisopado perineal-vaginal en una yegua (a) y de pene-prepucio de un padrillo (b).

El aislamiento de EHV-3 requiere la inoculación en cultivos celulares derivados de equinos: riñón de feto, tiroides, testículo o células embrionarias de pulmón, o en líneas celulares como EDerm (NBL-6, ATCC CCL-57) o FHK-Tcl3 (CVCL\_7193), cuya susceptibilidad al virus ha sido demostrada hace algunos años (Maeda y col., 2007). Al igual que para otros herpes virus, el efecto citopático (ECP) de EHV-3 se evidencia en la

monocapa a las 24-48 h pi, caracterizándose por la formación de focos de células redondeadas y sincicios, en una monocapa fibroblástica (Figura 1.5).

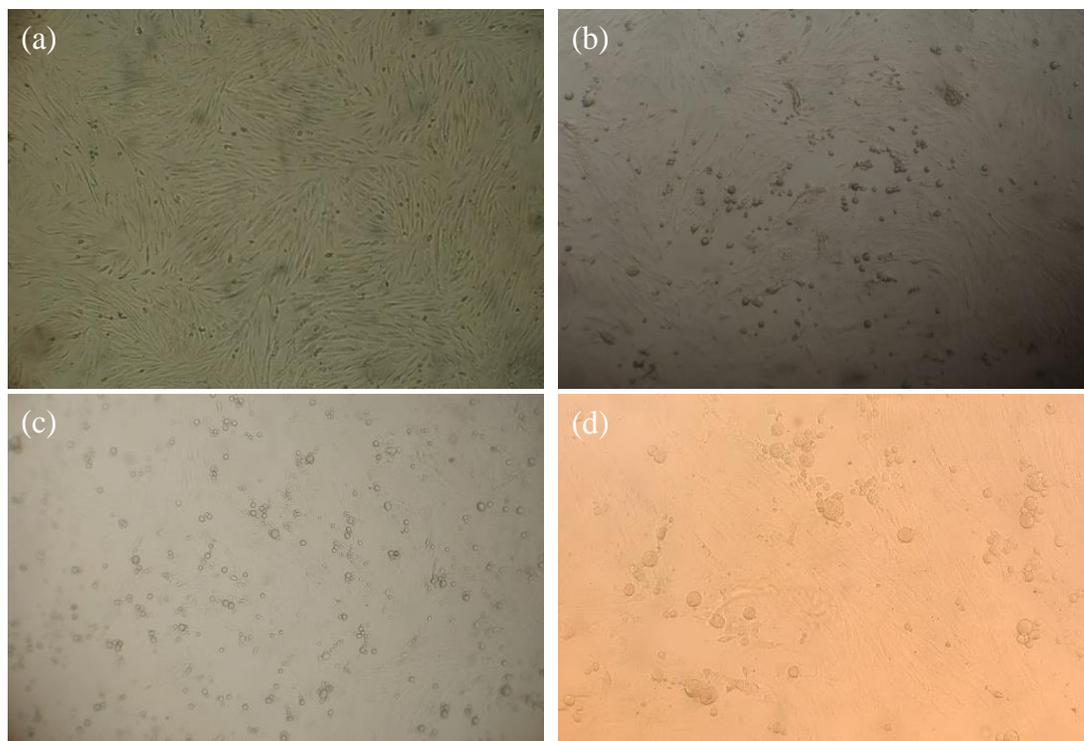


Figura 1.5 Monocapa de células EDerms (NBL-6) sin infectar (control, a) e infectadas con EHV-3 (b, c y d) Fotografías tomadas en el microscopio invertido con un aumento de 40X (a, b y c) y 100X (d).

Ambos diagnósticos, el clínico y el etiológico, tienen limitaciones con consecuencias económicas importantes; el primero no permite segregar de la reproducción a los animales que excretan virus en forma subclínica, y el segundo no es aplicable en condiciones de campo. No existe, actualmente, un método de diagnóstico que pueda realizarse a campo al pie del animal, en el momento de la inspección clínica de las yeguas pre-servicio o previo a las maniobras necesarias para la IA y la TE.

Recientemente, ha sido descrita la utilización de un equipo portátil de PCR isotérmica aislada (iiPCR) (POCKIT™ COMBO, GeneReach, USA), para la detección rápida, simple y sensible de otros patógenos en equinos (Balasuriya y col., 2014; Barrandeguy y col., 2016; Carossino y col., 2016). Esta tecnología, podría considerarse como una alternativa para detectar EHV-3 en muestras de hisopados de yeguas sin lesiones, durante la inspección pre-servicio, para prevenir la transmisión de la infección a

los padrillos durante el servicio, así como también tomar las medidas de biocontención específicas en los animales infectados en centros de reproducción equina.

### **1.7. Prevención, control y tratamiento**

En la actualidad, la prevención del ECE en padrillos requiere del examen clínico y la segregación de las yeguas principalmente, pero también de los padrillos, que muestran lesiones antes del servicio (Figura 1.6a, b). A pesar de esto y teniendo en cuenta que existen animales que excretan virus sin mostrar lesiones típicas, los brotes de ECE durante la temporada reproductiva son frecuentes por lo que es necesario aplicar medidas de control y tratamiento. Las principales medidas de control frente a estos brotes son el reposo sexual de los animales clínicamente afectados hasta el final del período de excreción, el reconocimiento precoz de nuevos casos clínicos y el estricto cumplimiento de los procedimientos de higiene, diseñados para eliminar la transmisión mecánica del virus (Allen y Umphenour, 2004). Para esto, todos aquellos objetos (baldes y elementos de higiene) utilizados durante el servicio, deben ser lavados y esterilizados entre cada uso, siendo también recomendable que cada padrillo disponga de un juego de estos instrumentos (Allen y Umphenour, 2004) (Figura 1.6c). Para el control en los centros de IA y TE, se deben realizar los mismos procedimientos antes descritos en relación a la higiene y a la segregación de los animales con lesiones, detectados en la inspección clínica. Con este fin, el personal que tiene contacto directo con las yeguas y los padrillos debe usar guantes de inspección largos y desechables y guantes de látex cortos que se deben cambiar entre cada animal; el escáner de ultrasonido debe cubrirse con un guante desechable, o desinfectarse cuidadosamente antes de la inspección de cada yegua; y todos los elementos y otros dispositivos utilizados durante la IA, recolección y transferencia de embriones deben ser descartables, o lavados y esterilizados entre cada animal (Barrandeguy y col., 2010a).

No existen vacunas para ECE, ni se ha investigado esta alternativa como mecanismo para prevenir la enfermedad.

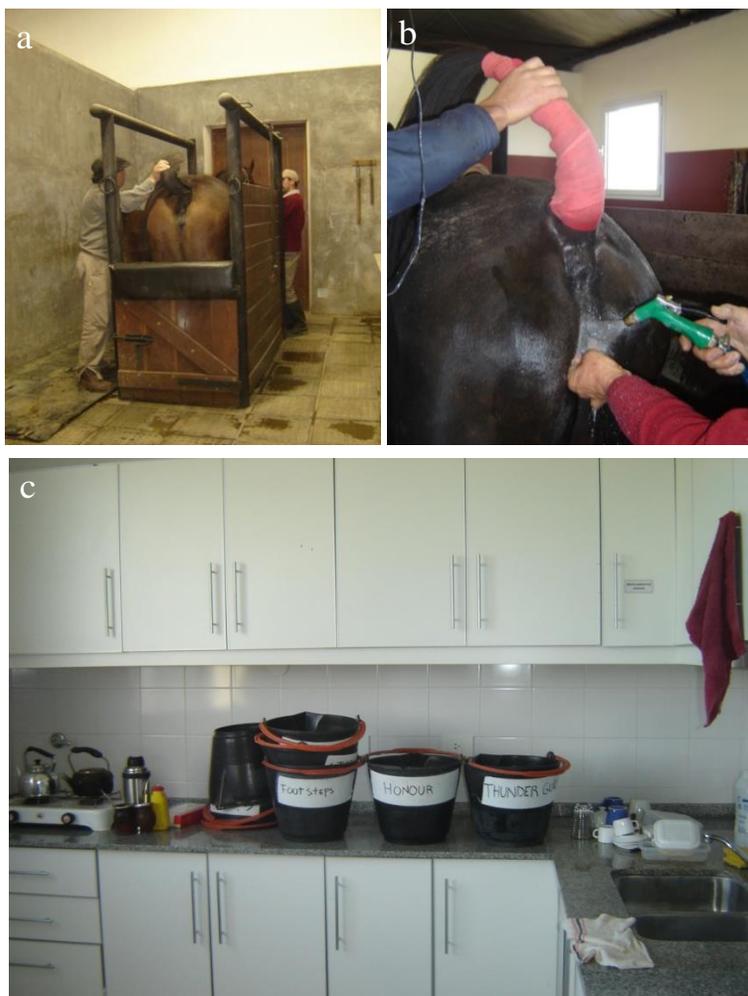


Figura 1.6: (a y b) Preparación de la yegua pre-servicio y examen clínico; (c) instrumentos individuales para la higiene de cada padrillo.

El tratamiento del ECE se basa principalmente en el reposo sexual hasta que las lesiones cicatrizan totalmente. Pero, con el objetivo de acortar el período de reposo sexual y promover una curación rápida y sin complicaciones, se recomienda implementar un tratamiento sintomático que consiste en higienizar diariamente (una o dos veces/día) los genitales con antisépticos/astringentes, reducir la inflamación con agentes antiinflamatorios (glucocorticoides) y prevenir la infección bacteriana secundaria con antimicrobianos de amplio espectro (Allen y Umphenour, 2004). La inspección clínica para reanudar las actividades reproductivas debe ser complementada mediante un análisis de laboratorio para descartar la excreción viral (HBLB, 2017). En relación al uso de compuestos antivirales hace algunos años se ha utilizado aciclovir (ACV) en forma tópica (comercializado para su uso en humanos), para el tratamiento de un potrillo con infección

por EHV-3 en la región periorbital (ACV 3%) y de yeguas con ECE clínico (ACV 5%); y recientemente mediante la administración vía oral (PO) de un pro-fármaco de ACV, valaciclovir (VACV), se trataron padrillos con ECE. Sin embargo, los beneficios de estos tratamientos han sido difíciles de evaluar debido a que los enfoques terapéuticos se realizaron en condiciones de campo durante brotes naturales (Cullinane y col., 1994; Toishi y col., 2017).

La IA en yeguas con ECE no está contraindicada debido a que la infección por EHV-3 no influye en el resultado de la preñez. Sin embargo, en el caso de yeguas de la raza SPC, como la IA no está autorizada, se debe esperar la cicatrización completa de las lesiones asociadas con ECE y comprobar el cese de la excreción de virus, antes del servicio natural (HBLB, 2017; Paccamonti y Pycock, 2009).

La extracción de semen de padrillos con enfermedad activa para ser utilizado en IA no está contraindicada (Youngquist y Threlfall, 2009) pero, debe tenerse en cuenta que EHV-3 puede ser transmitido al eyaculado a través del contacto del pene con la VA (Metcalf, 2001).

### **1.8. La industria hípica y el potencial impacto económico del ECE**

El caballo, 5000 años a.C., sólo revestía interés para las tribus euroasiáticas como fuente de carne y cuero para fabricar ropas y tiendas, y porque sus excrementos se utilizaban como combustible (Outram, 2009). Luego de su domesticación (año 3500 a.C.), el caballo adquirió un papel preponderante como medio de transporte, de comunicación y, sobre todo, de conquista, extendiéndose hacia fines del siglo XIX y principios del siglo XX, a las distintas regiones del mundo conquistadas (Edwards, 1981). Hoy en día, el caballo es el centro de lo que se conoce como industria hípica. Dicha industria, es un segmento significativo de la producción agropecuaria, tanto en la economía nacional como mundial.

La industria hípica abarca un conjunto de actividades dentro de las que se encuentran la cría de distintas razas de caballos y otros équidos, y que incluyen la doma, la cuida y el entrenamiento; los deportes hípicos y otras actividades asociadas, como las tecnologías de la reproducción (la TE/IA y la clonación), el trabajo rural, las manifestaciones culturales y tradicionalistas, el turismo rural, la equino terapia, la seguridad nacional y de fronteras, etc. A su vez, tanto los insumos como los servicios, y las actividades de importación, exportación, la faena y el procesamiento de productos y subproductos, forman parte de dicha industria (UTTA, 2015). Desde los años sesenta esta

---

actividad económica ha presentado un crecimiento sin precedentes en muchos países (Timoney, 2014), y puntualmente en Argentina, donde su promoción y desarrollo se encontraron favorecidos e incentivados en la última década del siglo XX (SENASA, 2017).

En Argentina se crían más de 25 razas equinas con distintas finalidades, registrándose por año más de 22000 nacimientos de animales puros de raza (SPC, Criollos, Silla Argentina, Polo Argentino, Cuarto de Milla y Árabes) en tres registros genealógicos, “Stud Book” Argentino, Asociación Argentina de Fomento Equino y Sociedad Rural Argentina (AACREA, 2004; Anonymous, 2015). Nuestro país es reconocido mundialmente por producir equinos de excelencia, ubicándose en tercer lugar como productor de caballos SPC (UTTA, 2015) y en primer lugar como productor de caballos de polo (SENASA, 2017).

Como se dijo anteriormente, el SPC es una de las principales razas de la Argentina, con 8000 nacimientos anuales. Como las temporadas de servicio son en primavera y únicamente se permite el servicio por monta natural (Stud Book Argentino, 2002), se traen padrillos de excelente genética y “performance” principalmente desde Estados Unidos, Irlanda, Japón y Francia, para servir yeguas madres de los principales establecimientos de cría de Argentina (El cronista, 2004). Estos padrillos, conocidos como padrillos “shuttle” (aproximadamente 100 por año en todo el mundo), realizan la temporada de servicios en los dos hemisferios en el mismo año calendario (Squires, 2009). En nuestro país existen entre 350 y 400 establecimientos de cría, y el valor de un potrillo SPC de dos años es, en promedio, US\$ 5000 (UTTA, 2015).

En lo que respecta a TE y clonación, Argentina junto con Brasil y Estados Unidos se ubican en primera posición en el mundo, produciendo aproximadamente 14000 preñeces por año, producto de la TE de las cuales, en Argentina, el 90 % de las mismas corresponden a caballos de polo. Nuestro país cuenta además con 73 centros registrados de IA y TE principalmente para caballos de salto, polo y en menor medida cuarto de milla, árabe y peruano de paso (Diario de Jerez, 2009; Losinno, 2015).

Considerando entonces el crecimiento de la industria hípica y los cambios en las prácticas de reproducción equina, se puede comprender el impacto económico negativo que tienen los brotes de ECE en la producción equina. En establecimientos en los que el calendario de servicios de los padrillos SPC es muy intenso, las interrupciones en el servicio pueden traducirse, hacia el final de la temporada, en disminuciones significativas en el número de yeguas servidas por los padrillos afectados. Además, pueden ocurrir

retrasos en las fechas de parto o disminución de las tasas de preñez en las yeguas al reducirse las oportunidades de ser servidas debido a la enfermedad (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012).

Del mismo modo, frente a un brote de ECE en centros de IA y TE, las yeguas afectadas (dadoras o receptoras) se muestran reticentes a ser inspeccionadas, inseminadas o transferidas, debido al intenso dolor, con el consecuente perjuicio del normal desenvolvimiento de las actividades reproductivas programadas. El tiempo y los gastos adicionales ocasionados por las precauciones necesarias para manejar a las yeguas dadoras y receptoras debido a la presencia de la enfermedad, también tienen un impacto negativo sustancial (Barrandeguy y col., 2010a).

En la última década, se han reportado brotes de ECE en diferentes países (Aurich y col., 2003; Barrandeguy y col., 2010a, 2010c; Cochard y col., 2002; Ferreira y col., 2010; Kirisawa y col., 2017; Seki y col., 2004; van der Meulen y col., 2006a), incluyendo aquellos ocurridos por transmisión iatrogénica en centros de IA y TE, o por semen contaminado (Barrandeguy y col., 2010a; Metcalf, 2001; Seki y col., 2004; van der Meulen y col., 2006a).

Por estas razones, es necesario revisar las estrategias de prevención y control, por medio de un análisis de la eficacia de compuestos antivirales como una alternativa de tratamiento, tanto preventivo como terapéutico, del ECE, así como también con una mejora del sistema de diagnóstico.

### **1.9. Compuestos antivirales para alfaherpesvirus: mecanismo de acción**

Los herpes virus son virus complejos que codifican entre 70 y 200 genes, de los cuales aquellos implicados en la replicación viral se clasifican como "esenciales" o "no esenciales" en función de si son o no, necesarios para la replicación viral en cultivo de células, respectivamente (Pellet y Roizman, 2007). Las proteínas virales esenciales para la replicación del ADN son, la ADN polimerasa (una proteína de unión al origen), la proteína de unión al ADN monocatenario, y el complejo ADN helicasa-primasa (Pellet y Roizman, 2007); y aquellas no esenciales incluyen las enzimas timidina quinasa (TK) y la ribonucleótido reductasa. Como otros miembros del orden *Herpesvirales*, EHV-3 posee en su ADN los genes que codifican para las enzimas como la ADN polimerasa y la TK. Las enzimas virales, tanto esenciales como no esenciales, difieren de sus homólogos celulares, lo que ha permitido el desarrollo de compuestos que inhiben específicamente

las enzimas virales implicadas en la replicación. La ADN polimerasa de los alfa herpesvirus humanos interacciona con una gama más amplia de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) que las polimerasas celulares (Pellet y Roizman, 2007). La TK viral, fosforila pirimidinas e incluso nucleósidos de purina, lleva a cabo múltiples fosforilaciones de timidina, y utiliza nucleósidos trifosfatos distintos de ATP como fuente de fosfato (Evans y col., 1998; Karlstrom y col., 1986). Por otra parte, la mutabilidad de esta enzima parece ser mayor que la de la TK celular (Coen y Richman, 2007; Evans y col., 1998). Por estas razones, dichas enzimas son el blanco para compuestos antivirales como los análogos de nucleósidos, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la replicación del ADN viral, dando lugar a la finalización de la elongación de la hebra de ADN, y en algunos casos a la síntesis de una cadena de ADN defectuosa, no funcional (Coen y Richman, 2007).

Todos los agentes antivirales disponibles para el tratamiento de las infecciones por alfa herpesvirus en humanos, a excepción de foscarnet y docosanol (De Clercq, 2016), son análogos de nucleósidos, y se pueden clasificar en tres grupos: los análogos de la guanosina acíclica, los análogos de la timidina acíclica y los fosfonatos de nucleósidos acíclicos, que imitan a los desoxinucleósidos desoxiguanosina, trifosfato de timidina y monofosfato de desoxicitidina desoxinucleótido, respectivamente (Figura 1.7). Los análogos de nucleósidos deben ser fosforilados a la forma trifosfato antes de que puedan interactuar con la ADN polimerasa (Coen y Richman, 2007; De Clercq, 2016, 2002).

En el caso de los análogos de guanosina acíclica y de timidina acíclica, la primera fosforilación (y para brivudin, también la segunda) es realizada por la TK viral, lo que explica la acción anti-herpética específica de estos compuestos; mientras que las fosforilaciones subsiguientes se consiguen mediante quinasas celulares (De Clercq, 2002). Por el contrario, los fosfonatos de nucleósidos acíclicos requieren sólo dos pasos de fosforilación para ser convertidos en sus metabolitos activos (Figura 1.8), puesto que su estructura contiene un segmento de fosfonato, que es equivalente a un fosfato. Por lo tanto, estos compuestos son activos contra los virus de ADN que no codifican TK viral específica, o que se han vuelto resistentes a los análogos de nucleósidos a través de la deficiencia de TK (Coen y Richman, 2007; De Clercq, 2002).

En su forma activa (trifosfato para análogos de guanosina acíclica y de timidina acíclica, y difosfato para fosfonatos de nucleósidos acíclicos), los análogos de nucleósidos interactúan con las polimerasas virales al competir con el sustrato natural de dNTP

(inhibición competitiva) o mediante su incorporación como un sustrato alternativo. Cualquiera o ambos de estos mecanismos (inhibición competitiva y/o incorporación) son esenciales para la actividad antiviral (Coen y Richman, 2007; De Clercq, 2002) (Figura 1.8).

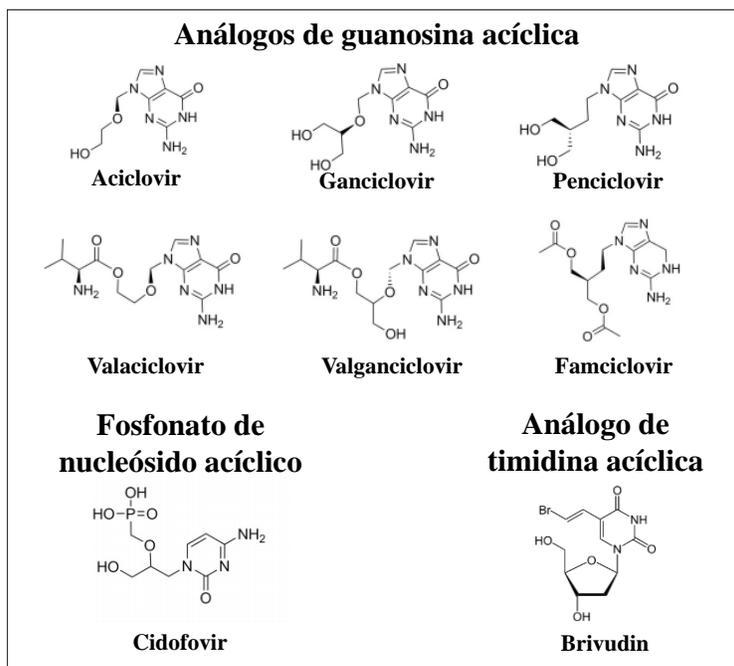


Figura 1.7: Estructura química de los tres grupos de análogos de nucleósidos, análogos de guanósina y timidina acíclica, y fosfonatos de nucleósidos acíclicos.

Como los análogos de la guanósina acíclica [ACV, penciclovir (PCV) y ganciclovir (GCV)] tienen una biodisponibilidad oral limitada, han sido reemplazados por sus pro-fármacos (VACV, famciclovir y valganciclovir, respectivamente) en los tratamientos orales. Estos pro-fármacos sufren una transformación química o biológica *in vivo* que resulta en la liberación del agente biológicamente activo el cual provoca el efecto farmacológico deseado (Sofia, 2013).

A diferencia de los análogos de nucleósidos, foscarnet es un análogo de pirofosfato, que es un producto de la polimerización de ácidos nucleicos, y no requiere activación por parte de enzimas (ni virales, ni celulares) sino que inhibe a la ADN polimerasa directamente mediante la unión al sitio ocupado por pirofosfato, evitando la liberación del mismo. Así, la ADN polimerasa no puede completar el ciclo catalítico con éxito (Coen y Richman, 2007).

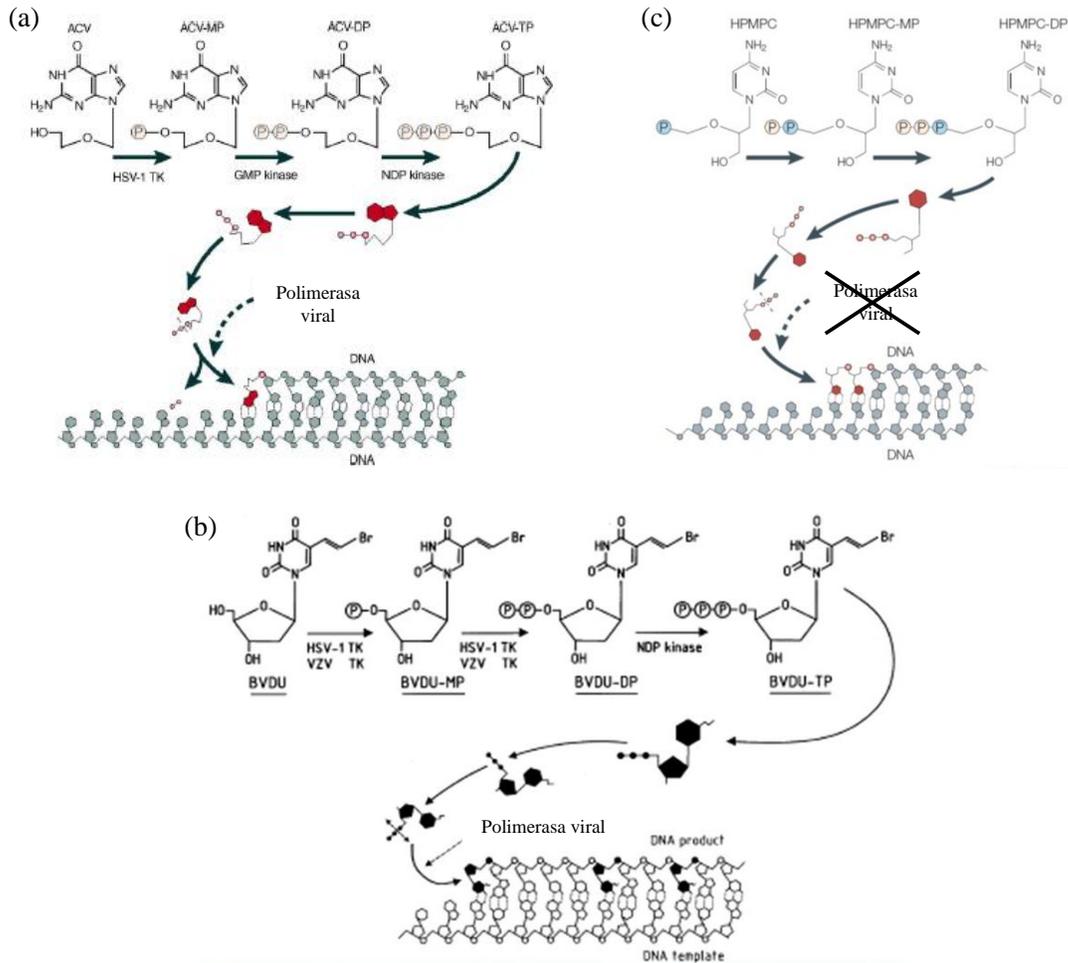


Figura 1.8: Mecanismo de acción de los compuestos antivirales: (a) análogos de guanósina acíclica; (b) análogos de timidina acíclica; (c) de los fosfonatos de nucleósidos acíclicos. En (a), tanto para ACV como para GCV, la TK viral realiza la primera fosforilación del análogo de guanósina acíclica mientras que las restantes fosforilaciones son realizadas por la TK celular. En (b) la TK viral realiza las dos primeras fosforilaciones del compuesto y sólo la última fosforilación la realiza la TK celular. En (c), los fosfonatos de nucleósidos acíclicos, poseen en su estructura un fosfonato el cual es equivalente a un fosfato, por lo que no requieren de la TK viral para la primera fosforilación. Los análogos de guanósina (a) y timidina (b) acíclica, actúan como inhibidores competitivos/sustrato alternativo para la ADN polimerasa dando lugar a la finalización de la elongación o a la formación de una cadena de ADN no funcional, en cambio los fosfonatos acíclicos (c) actúan como inhibidores competitivos y producen la finalización de la elongación del ADN. *Adaptado de Erik De Clercq, 2004a.*

Existen también compuestos que pueden inhibir el ingreso del virus a las células. El compuesto docosanol (n-docosanol; behenyl alcohol), es un alcohol graso saturado y si bien el mecanismo de acción no ha sido extensamente estudiado, se sugiere que inhibe el ingreso del virus a las células mediante la interferencia de la unión entre receptores de

células epiteliales y proteínas de membrana del virus, actuando principalmente sobre virus envueltos, como los herpes virus (De Clercq, 2016).

Asimismo, los lambda ( $\lambda$ ) carragenanos, que son polisacáridos sulfatados sintetizados en gran cantidad por algas marinas conocidas como *Gigartina skottsbergii* (Gigartineae, Rhodophyta), presentan una actividad antiviral natural que se basa en la unión a las glicoproteína virales, inhibiendo su unión al receptor celular (Carlucci y col., 1997). Dicha acción ha sido demostrada *in vitro* por medio de la inhibición del número de placas de lisis ocasionadas por la infección con HHV-1 y HHV-2, alfa herpesvirus bovino 1 (BoHV-1), alfa herpesvirus porcino 1 (SuHV-1) y alfa herpesvirus felino 1 (FeHV-1;) (Carlucci y col., 1999; Damonte y col., 2004; Diogo y col., 2015; Stiles y col., 2017).

## **1.10. Uso de compuestos antivirales en el tratamiento de infecciones por alfa herpesvirus en equinos**

### **1.10.1. Análogos de guanósina acíclica**

El compuesto más estudiado en equinos ha sido ACV, principalmente contra EHV-1. Para este virus, varios autores establecieron la concentración efectiva 50% (concentración necesaria para inhibir la replicación viral en un 50%,  $CE_{50}$ ) *in vitro* (Azab y col., 2010; Garré y col., 2007; Wilkins y col., 2005), mientras que para EHV-4 no resultó ser efectivo ( $CE_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ ).

Se realizaron también estudios de farmacocinética luego de la administración de ACV por vía endovenosa (IV) y PO, en los que se determinó la  $CE_{50}$  en plasma para EHV-1 (Bentz y col., 2006; Garré y col., 2007; Wilkins y col., 2005).

Al igual que en humanos, en equinos la administración PO de ACV resulta en una baja biodisponibilidad y niveles plasmáticos reducidos (Bentz y col., 2006; Garre y col., 2007; Razonable y col., 2011). Por esta razón, se han realizado también estudios con el pro-fármaco de ACV, VACV, por PO. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de distintos trabajos realizados tanto en equinos sanos, como en animales infectados (en forma natural o experimental), arrojan datos controvertidos acerca de la eficacia de este compuesto (Garre, 2008; Garre y col., 2007; Garré y col., 2009; Maxwell y col., 2011, 2009, 2008).

Con respecto a EHV-3, también se determinó la  $CE_{50}$  *in vitro* de ACV y VACV sobre cepas de campo (Tabla 1.1) (Cullinane y col., 1994; Kirisawa y col., 2017; Toishi y col., 2017). Ambos compuestos fueron utilizados para el tratamiento de brotes naturales de

ECE típico en yeguas y padrillos, y en un potrillo con lesiones periorbitales por la infección con EHV-3 (Tabla 1.1). Para los animales tratados con ACV tópico los autores concluyen que la respuesta al tratamiento fue buena (Cullinane y col., 1994), y para aquellos tratados con VACV PO se obtuvieron concentraciones plasmáticas menores a la CE<sub>50</sub>, no observándose una disminución importante del tiempo de cicatrización de las lesiones (Toishi y col., 2017). En ninguno de estos trabajos se describen los parámetros utilizados para la evaluación de los animales tratados, así como tampoco el uso de animales controles, por lo que la evaluación de estos tratamientos resulta difícil.

Con respecto a GCV, hay trabajos que demuestran su efectividad contra EHV-1, EHV-3 (Tabla 1.1) y EHV-4 *in vitro* (Azab y col., 2010; Garré y col., 2007; Smith y col., 1983).

De la misma manera que para ACV, se han realizado estudios de farmacocinética con GCV y con su pro-fármaco, valganciclovir, por PO; así como también se han evaluado distintos tratamientos en animales sanos e infectados experimentalmente con EHV-1 (Carmichael y col., 2013; Maxwell y col., 2011). Estos trabajos muestran resultados alentadores para estos compuestos en el tratamiento contra EHV-1, dado que en animales sanos se consigue igualar/superar en plasma la CE<sub>50</sub> para el virus, y en animales infectados se logra disminuir la severidad de la ataxia, la viremia y la temperatura corporal (Carmichael y col., 2013; Maxwell y col., 2011)

<b>Antiviral</b>		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<b>Referencias</b>
<b>Grupo</b>	<b>Droga</b>	<b>(CE<sub>50</sub>)</b>	<b>Dosis y frecuencia de administración</b>	
<b>Análogo de guanosina</b>	<b>ACV</b>	4,25 µg/ml	3% y 5%	(Cullinane y col., 1994)
		2,3 µg/ml	n.d.*	(Toishi y col., 2017)
	<b>VACV</b>	3 µg/ml	27 mg/kg PO cada 8 h por 2 días y 18 mg/kg cada 12 h por 8 días	(Toishi y col., 2017)
		<b>GCV</b>	0,16 µg/ml	n.d.*

Tabla 1.1: Compuestos antivirales contra EHV-3. \*n.d.: no determinado

### **1.10.2. Análogos de timidina acíclica**

Brivudin (BVUDU) ha sido descrito como uno de los más potentes inhibidores del virus de Varicela Zoster (HHV-3), inhibiendo la replicación del mismo en concentraciones

---

nanomolares (De Clercq, 1997). A su vez, fue hallado efectivo contra SuHV-1 y BoHV-1. Sin embargo, no resultó efectivo contra EHV-1 (De Clercq, 2004b, 2004c, 2002, 1997), lo que podría atribuirse a una fosforilación ineficiente de BVDU por la TK de este virus, como se ha descrito para HHV-2 (De Clercq, 1997).

### **1.10.3. Fosfonatos de nucleósidos acíclicos**

Cidofovir (HPMPC) es activo contra un amplio espectro de virus ADN e independiente de la presencia de la TK viral específica, incluyendo miembros de las familias *Adenoviridae*, *Herpesviridae* y *Poxviridae*. Dentro de la familia *Herpesviridae*, todos sus miembros, incluyendo también a las cepas resistentes a ACV de HHV-1, HHV-2 y HHV-3 deficientes de TK, han demostrado ser susceptibles a HPMPC (De Clercq, 1997).

La eficacia de esta droga ha sido también demostrada en una gran variedad de modelos animales (De Clercq, 1997). Puntualmente, este compuesto fue evaluado en cabras infectadas experimentalmente con CpHV-1 (Tempesta y col., 2008, 2007a).

En referencia a los alfa herpesvirus equinos, la eficacia de HPMPC ha sido, hasta ahora, solamente demostrada *in vitro* contra EHV-1 en un estudio comparativo con varios análogos de nucleósidos (Garré y col., 2007).

### **1.10.4. Foscarnet**

Foscarnet es el compuesto menos potente contra EHV-1 *in vitro* en comparación con otros análogos de nucleósidos siendo a su vez, la susceptibilidad a este compuesto variable entre cepas neuropatogénicas y no neuropatogénicas del virus (Garré y col., 2007).

Por todo lo expuesto, se desprende que existen compuestos, tanto sintéticos (ACV, HPMPC, GCV y BVDU), como naturales ( $\lambda$ -carragenanos), que han demostrado ser eficaces contra infecciones por alfa herpesvirus en humanos y animales. Teniendo en cuenta que EHV-3 es un alfa herpesvirus, del género *Varicellovirus* (Davison, 2010) y que existe la necesidad de contar con alternativas para mitigar las consecuencias económicas de esta infección, se propone considerar a estos compuestos para su evaluación en la prevención y el tratamiento del ECE.

## **2. HIPÓTESIS**

**Hipótesis general de trabajo**

El uso de compuestos antivirales en forma tópica interfiere el ciclo replicativo de EHV-3, por lo tanto reduce la cantidad de virus en el área genital disminuyendo la posibilidad de transmisión de la infección, así como los tiempos de recuperación de los animales enfermos.

La detección de EHV-3, mediante técnicas moleculares de alta sensibilidad, previo al servicio o a las maniobras necesarias para la inseminación artificial y la transferencia embrionaria, minimiza las consecuencias negativas de esta infección en la reproducción equina.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Disminuir el impacto negativo de las infecciones por EHV-3 (ECE) mediante

- a) el uso de compuestos antivirales en forma tópica;
- b) el diagnóstico al pie del animal.

### **3.2. Objetivos particulares**

3.2.1. Comparar la eficacia de distintos compuestos antivirales para reducir o inhibir la replicación de EHV-3 *in vitro*, mediante la determinación de:

- a)- número y tamaño de placas de lisis de EHV-3;
- b)- producción de virus cuantificada por qPCR y titulación en cultivo de tejido (Dosis infectiva cultivo de tejido 50% - DICT50%/ml);
- c)- eficacia de los compuestos frente a cepas de campo de EHV-3.

3.2.2. Determinar *in vivo*, la eficacia del compuesto antiviral seleccionado:

- a)- para prevenir la excreción viral en yeguas experimentalmente infectadas con EHV-3 sin evidencia clínica de la enfermedad (tratamiento preventivo);
- b)- para disminuir o inhibir la excreción viral (tiempo de excreción y carga viral) en yeguas experimentalmente infectadas con EHV-3 y con evidencia clínica de la enfermedad (tratamiento terapéutico).

3.2.3. Adaptar y validar la plataforma tecnológica conocida como iPCR, para el diagnóstico rápido de EHV-3, de forma que pueda ser utilizada como metodología de diagnóstico en los centros de reproducción equina, al pie del animal.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **4.1 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DISTINTOS COMPUESTOS ANTIVIRALES PARA REDUCIR O INHIBIR LA REPLICACIÓN DE EHV-3 IN VITRO**

### **4.1.1 Células**

Se utilizaron monocapas de células EDerm (NBL-6, Cat. No. CCL-57, ATCC). Las mismas se cultivaron con medio de crecimiento [medio Eagle mínimo Dulbecco modificado (MEM-D) y medio esencial mínimo Eagle (MEM-E), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB)]. Se realizaron 14 ensayos preliminares de infección con EHV-3 para evaluar la variabilidad de los resultados utilizando diferentes pasajes de la línea celular.

### **4.1.2 Virus**

#### **4.1.2.a Clon viral E/9283/07 C3A**

Se utilizó una cepa de EHV-3, E/9283/07, aislada de un caso típico de ECE en yeguas de polo durante un brote registrado en un centro TE en febrero de 2007 (Barrandeguy y col., 2008). Con el objetivo de trabajar con una población viral homogénea se originó un clon viral por dilución límite. Este procedimiento fue repetido tres veces dando origen al clon denominado E/9283/07 C3A.

A partir de este, se obtuvo el lote viral de trabajo (E/9283/07 C3A), que fue alicuotado y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . También fue titulado por DICT50%/ml y por unidades formadoras de placa/ml (UFP/ml) (Apéndice 8.1.1 y 8.1.2, respectivamente), y se determinó el tamaño de placas de lisis (Apéndice, 8.1.3) producidas por el mismo. Se realizaron 14 repeticiones de estos ensayos (título viral, número y tamaño de placas de lisis) para determinar la variabilidad intra e interensayo.

Para confirmar la identidad del clon E/9283/07 C3A, se realizó una PCR convencional (Apéndice, 8.2.2) y el fragmento obtenido fue purificado y secuenciado de acuerdo a lo descrito en el apéndice (Apéndice, 8.2.4).

#### **4.1.2.b Cepas de campo**

Se analizaron 25 aislamientos de EHV-3 obtenidos en nuestro laboratorio en el período 2001 – 2009, por medio de las siguientes metodologías:

- Determinación del tamaño de placas de lisis (Apéndice, 8.1.3), comparado con la cepa de referencia de EHV-3<sup>1</sup>;

- Análisis filogenético de la secuencia parcial del gen de la glicoproteína G (gG) (Apéndice, 8.2.4);

- Relación filogenética con aislamientos de distintas regiones en el mundo (Apéndice, 8.2.4).

Del análisis de los resultados (5.1.1.b), se seleccionaron seis de estos aislamientos para ser utilizados en la evaluación de la eficacia de los diferentes compuestos antivirales sobre cepas de campo de EHV-3.

De cada una de estas cepas seleccionadas (n= 6), se produjeron lotes virales de trabajo, los cuales fueron alicuotados, almacenados a -70°C y titulados por DICT50%/ml y por UFP/ml (Apéndice, 8.1.1 y 8.1.2, respectivamente). En la Tabla 4.1 se muestran las características (título y tamaño de placas de lisis) de cada una de estas cepas y el virus utilizado como control para este ensayo (E/9283/07 C3A), sumado a la información de cada aislamiento y a características genéticas del gen gG.

Cepas	Aislamiento	Establecimiento * y Raza	Título infectivo		Características fenotípicas		Diferencias genéticas		
			DICT50%/ml	UFP/ml	Tamaño de placa**	Manifestación clínica	en las posiciones		
							904	1103	1264
<b>Control</b>	E/9283/07 C3A	E- Polo	10 <sup>6,00</sup>	10 <sup>5,53</sup>	Grande	ECE típico	C	A	G
<b>1</b>	E/3900/08-1	A – SPC	10 <sup>5,50</sup>	10 <sup>3,38</sup>	Pequeña	ECE típico	A	C	T
<b>2</b>	E/3900/08-2	A – SPC	10 <sup>4,66</sup>	10 <sup>4,19</sup>	Pequeña	ECE típico	A	C	T
<b>3</b>	E/1333/07-2	B - SPC	10 <sup>5,50</sup>	10 <sup>4,49</sup>	Grande	ECE típico	A	C	T
<b>4</b>	E/976/07-154	A - SPC	10 <sup>5,00</sup>	10 <sup>4,80</sup>	Grande	Subclínico	A	C	T
<b>5</b>	E/1331/07-5	C - SPC	10 <sup>5,00</sup>	10 <sup>4,74</sup>	Grande	ECE típico	C	A	G
<b>6</b>	E/3767/08-11	D – SPC	10 <sup>5,00</sup>	10 <sup>4,77</sup>	Grande	ECE típico	C	A	G

Tabla 4.1: Cepas de campo y control, utilizadas para evaluar la eficacia de los compuestos antivirales.\*A-E, cada letra corresponde a un establecimiento; \*\*Tamaño de placa (media aritmética del tamaño de 20 placas de lisis) comparado con el tamaño de placas de la cepa de referencia (tamaño estándar): “pequeño” es 1,64 veces más grande que la cepa de referencia y “grande” es 2,88 veces más grande.

### 4.1.3 Compuestos antivirales

#### 4.1.3.a Sintéticos

Aciclovir; ACV [ $>$  99% de pureza por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), Cat. No. A4669, Sigma Aldrich®].

<sup>1</sup> Gentilmente cedida por el Dr. Dubovi, Cornell University, USA

Cidofovir; HPMPG (> 98% de pureza por HPLC, Cat. No. C5874, Sigma Aldrich®).

Ganciclovir; GCV (> 99% de pureza por HPLC, Cat. No. G2536, Sigma Aldrich®).

Brivudin; BVDU (94% de pureza por HPLC, Cat. No. B9647, Sigma Aldrich®).

Se utilizó Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Cat. 56510C, Sigma Aldrich), como medio para hidratar dichos compuestos. Una vez rehidratados, los mismos fueron filtrados (con filtro de 0,4  $\mu$  + 0,2  $\mu$ ), y resuspendidos en RPMI-1640, en una concentración de 1 mg/ml (solución madre), y conservados a 4°C hasta su uso. Se realizaron controles para descartar contaminación por bacterias u hongos.

#### 4.1.3.b Naturales

Se utilizó un compuesto natural,  $\lambda$ -carragenano<sup>2</sup> liofilizado (Carlucci y col., 1997), a partir del cual se preparó una solución madre de 1 mg/ml de  $\lambda$ -carragenanos en MEM-D, que se conservó a 4°C hasta su uso.

#### **4.1.4 Ensayos *in vitro***

##### 4.1.4.a Estandarización de la metodología de qPCR en la evaluación de compuestos antivirales

- Curva de calibración

Se realizaron diluciones seriadas en base 10 (desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) a partir del lote viral de trabajo (E/9283/07 C3A). Estas diluciones fueron tituladas por DICT50%/ml y por UFP/ml siguiendo el procedimiento descrito en el apéndice, (8.1.1 y 8.1.2, respectivamente). Posteriormente, se realizó la extracción de ADN de dichas diluciones según lo descrito en el apéndice (8.2.1), las cuales fueron analizadas y cuantificadas por qPCR. Se realizaron 4 repeticiones de este ensayo. La cantidad de virus (genoma viral) determinada por qPCR fue homologada a los resultados obtenidos de titulación por UFP/ml, dado que en los análisis posteriores de los compuestos antivirales se utilizarían principalmente las técnicas de UFP/ml y qPCR.

- Cinética de replicación

Para esto, se infectaron monocapas de células EDerm, cultivadas en placas de 12 pocillos, con 500  $\mu$ l de la dilución de uso de E/9283/07 C3A y luego de 2 h de adsorción, se realizaron tres lavados con MEM-D y se agregaron 2 ml de medio de mantenimiento (MEM-D, MEM-E y 5% de SFB) a cada pocillo. Se tomaron alícuotas del sobrenadante de

---

<sup>2</sup>Cedido gentilmente por la Cátedra de Virología (Dra. Ana Bratanich y Dra. Sabrina Galdonovo), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

los cultivos celulares en el momento previo a la infección (tiempo 0) y a distintos tiempos post-infección (pi): 2 (pre-lavado y post-lavado), 4, 6, 24, 48, 72, 120, 144 y 169 h. Se realizó la titulación por DICT50%/ml, por UFP/ml y por qPCR (Apéndice, 8.1.1, 8.1.2 y 8.2.3, respectivamente). Se realizaron tres repeticiones de este último ensayo.

- Validación diagnóstica de la técnica de qPCR

La validación de la qPCR se realizó sobre una población de referencia de 411 muestras que incluyeron: 20 muestras de EHV-3 provenientes de cultivos celulares, 20 aislamientos de campo, 354 hisopados de yeguas infectadas en forma experimental y 17 aislamientos de otros patógenos equinos; y de las cuales se conocían los resultados de aislamiento viral en cultivo celular. Se establecieron los puntos de corte, tanto por ciclos umbral (Ct), como por número de copias de genoma. De estas muestras, 114 fueron también utilizadas en la validación de la técnica de iPCR (Materiales y métodos, 4.3).

4.1.4.b Ensayos dosis-respuesta de los compuestos antivirales sintéticos contra EHV-3 en cultivos celulares

Placas de 12 pocillos conteniendo monocapas de células EDerm, se infectaron con 500 µl de la dilución de uso de E/9283/07 C3A (dilución con la que se obtienen entre 20 y 30 UFP/pocillo). Luego de 2 h de incubación a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, se agregaron 2 ml de medio de cultivo semisólido [MEM-D, 2% SFB y carboximetilcelulosa (CMC) 0,75%] suplementado con concentraciones crecientes de 0 a 100 µg/ml de ACV, HPMP, GCV y BVDU. Cada concentración de antiviral fue evaluada por cuadruplicado. Células infectadas con el virus sin tratamiento antiviral y células sin infectar, tratadas y sin tratar, fueron utilizadas como control de virus, de citotoxicidad y de células, respectivamente.

A las 72 h de incubación, las células fueron fijadas y teñidas como se describe en el apéndice (8.1.2). Los criterios para evaluar la eficacia de cada compuesto fueron, la determinación del número y del tamaño de placas de lisis generados por EHV-3 (Apéndice, 8.1.2 y 8.1.3). El efecto antiviral sobre el número y el tamaño de las placas de lisis se expresó como porcentaje de inhibición (I%, donde IN% es porcentaje de inhibición del número e IT% es porcentaje de inhibición del tamaño de placas de lisis) y se calculó con las siguientes fórmulas, respectivamente:

$$IN\% = \left[ 1 - \frac{(\text{número de placas de lisis})_{\text{antiviral}}}{(\text{número de placas de lisis})_{\text{control}}} \right] \times 100\%$$

$$IT\% = \left[ 1 - \frac{(\text{tamaño de placas de lisis})_{\text{antiviral}}}{(\text{tamaño de placas de lisis})_{\text{control}}} \right] \times 100\%$$

A fin de minimizar la variabilidad interensayos, en todos los casos los cuatro compuestos se analizaron simultáneamente y se realizaron tres repeticiones. La concentración efectiva 50% (CE<sub>50</sub>) y la 100% (CE<sub>100</sub>) de cada compuesto fueron obtenidas a partir de las curvas dosis-respuesta generadas con los datos obtenidos.

#### 4.1.4.c Ensayos dosis-respuesta de compuestos antivirales naturales ( $\lambda$ -carragenanos) contra EHV-3 en cultivos celulares

Placas de 12 pocillos conteniendo monocapas de células EDerm, se infectaron con la dilución de uso de E/9283/07 C3A (dilución en la que se obtienen entre 20 y 30 UFP/pocillo). En simultáneo con el virus, se agregaron concentraciones crecientes de 0 a 1000  $\mu\text{g/ml}$  de  $\lambda$ -carragenanos en un volumen final (virus y  $\lambda$ -carragenanos) de 500  $\mu\text{l}$  por pocillo. Luego de 1 h de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, el inóculo fue descartado y se agregaron 2 ml de medio semisólido (MEM-D, 2% SFB y CMC 0,75%). Cada concentración de  $\lambda$ -carragenano fue inoculada por cuadruplicado. Células infectadas con el virus sin tratamiento antiviral y células sin infectar, tratadas y sin tratar, se utilizaron como control de virus, de citotoxicidad y de células, respectivamente.

A las 72 h de incubación, las células fueron fijadas y teñidas como se describe en el apéndice (8.1.2). El criterio para evaluar la eficacia de este compuesto fue la determinación del número de placas de lisis generadas por EHV-3, de acuerdo a lo descrito en el apéndice (8.1.2). El efecto antiviral se expresó como IN% y se calculó con la fórmula descrita anteriormente en 4.1.4.a. La CE<sub>50</sub> y la CE<sub>100</sub> fueron obtenidas a partir de la curva dosis-respuesta generada con los datos obtenidos. Se realizaron cuatro repeticiones de este ensayo.

#### 4.1.4.d Ensayos comparativos de distintas concentraciones de los compuestos antivirales sintéticos sobre la producción de EHV-3 en cultivos celulares por qPCR y DICT50%/ml

Luego del análisis de los resultados obtenidos de los ensayos descriptos en el apartado anterior, se seleccionaron tres concentraciones de ACV, HPMPC y GCV, para continuar los ensayos *in vitro* de cuantificación de ADN viral por qPCR y de virus infectivo por DICT50%/ml. Para cada compuesto se seleccionó una concentración en la que se

obtuvo el 100% de inhibición de número y tamaño de placas de lisis, una concentración >50% pero <100%, y una concentración promedio entre la CE<sub>50</sub> de número y tamaño de placas de lisis. Se cuantificó la producción viral en presencia de los compuestos a distintos tiempos pi mediante qPCR y DICT50%/ml.

Para esto, placas de 12 pocillos con monocapas de células EDerm, se infectaron con 500 µl de una dilución de virus que contenía entre 20 y 30 UFP/pocillo. Luego de 2 h de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> se agregaron 2 ml de medio líquido (MEM-D + MEM-E y 5% SFB), suplementado con las concentraciones seleccionadas de ACV (5; 20 y 40 µg/ml), HPMP (2; 20 y 40 µg/ml) y GCV (0,05; 0,5 y 1 µg/ml). Cada concentración de antiviral fue ensayada por triplicado (Diagrama 4.1). A su vez, por cada ensayo, se incluyó una placa control, con células infectadas con el virus sin tratamiento y células sin infectar.

Se obtuvieron alícuotas del sobrenadante de cultivo a las 0, 24, 48 y 72 h pi. Se realizó la extracción y cuantificación del ADN viral por qPCR (Apéndice, 8.2.1 y 8.2.3 ), así como también la titulación de virus infectivo por DICT50%/ml (8.1.1).

Los resultados de la producción viral en presencia de distintas concentraciones de cada compuesto, en los distintos tiempos, se expresan como porcentaje de inhibición de la producción viral (IPV%). A fin de minimizar la variabilidad interensayos, en todos los casos los tres compuestos se analizaron simultáneamente y se realizaron tres repeticiones.

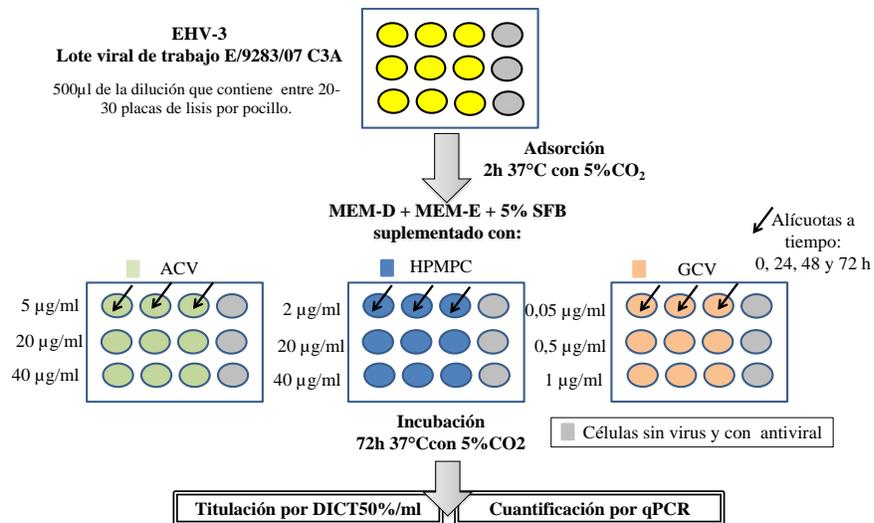


Diagrama 4.1: Ensayos comparativos de distintas concentraciones de los compuestos antivirales sintéticos sobre la producción de EHV-3 en cultivos celulares, por qPCR y DICT50%/ml.

Por último, los resultados de este ensayo sumados a aquellos obtenidos a partir del ensayo descrito en 4.1.4.a, permitieron establecer una concentración para que cada compuesto sea evaluado contra las cepas de campo de EHV-3. La misma fue determinada como la menor concentración en la que cada compuesto produjo más de un 95% de inhibición de la producción de ADN de EHV-3 en cultivos celulares a las 72 h pi.

**4.1.4.e Comparación de la eficacia de ACV, HPMPC y GCV frente a cepas de campo de EHV-3**

Placas de 12 pocillos (n = 2) con monocapas de células EDerm, se infectaron con 500 µl de la dilución de uso (con la cual se obtienen entre 20 y 30 UFP/pocillo) de cada una de las cepas de campo (n: 6) y la cepa control, E/9283/07 C3A. Luego de 2 h, a una de las placas se le agregó 2 ml de medio (MEM-D + MEM-E y 5% SFB), suplementado con ACV 5 µg/ml, HPMPC 2 µg/ml y GCV 0,05 µg/ml; y a la otra placa se le agregó 2 ml de medio semisólido (MEM-D, 2% SFB y CMC 0,75%) suplementado con las mismas concentraciones de los compuestos antivirales. En ambos casos, cada compuesto fue ensayado por triplicado (Diagrama 4.2). Células infectadas con la misma cepa sin tratamiento antiviral, se utilizaron como control.

A partir de las placas incubadas con medio líquido, se tomaron alícuotas del sobrenadante a las 0, 48 y 72 h, generando un pool para cada concentración de cada antiviral a los distintos tiempos. Se realizó la extracción del ADN viral y se cuantificó la producción del mismo mediante qPCR (Apéndice, 8.2.1 y 8.2.3). Luego de las 72 h de incubación, las placas con medio semisólido se tiñeron para determinar número y tamaño de placas de lisis generadas por cada cepa (Apéndice, 8.1.2 y 8.1.3), y se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición en presencia y ausencia de cada compuesto.

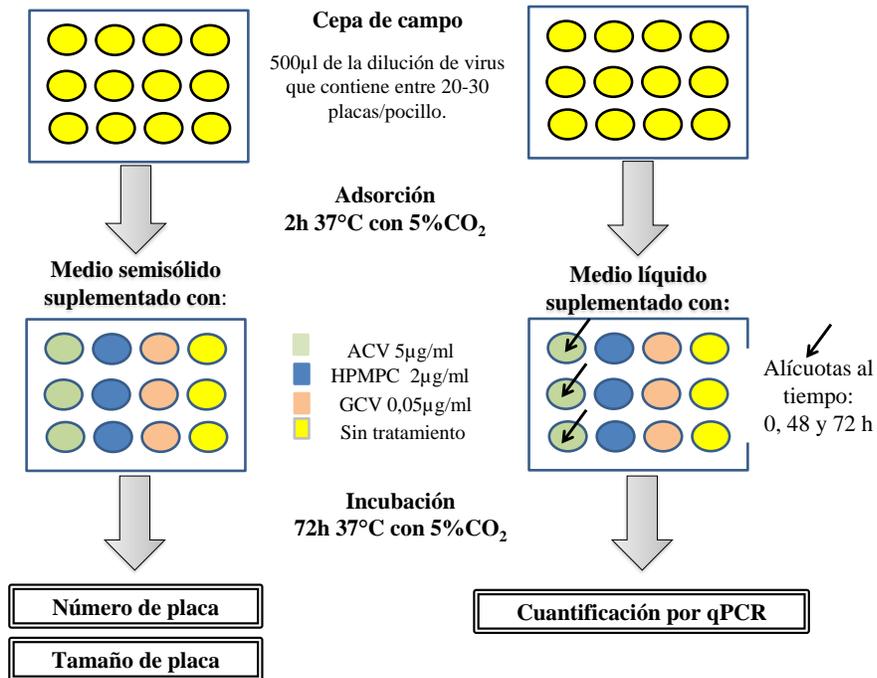


Diagrama 4.2: Comparación de la eficacia de ACV, HPMP y GCV frente a cepas de campo de EHV-3

---

## **4.2 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL COMPUESTO ANTIVIRAL SELECCIONADO PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ECE EN YEGUAS INFECTADAS EN FORMA EXPERIMENTAL CON EHV-3**

### **4.2.1 Animales**

Se utilizaron 20 yeguas de entre tres y cuatro años de edad, de raza Silla Argentina, sin historia clínica de haber padecido ECE y serológicamente negativas a EHV-3. Los animales fueron alojados en un mismo potrero de 77 x 25 metros, con comederos y bebederos comunitarios (Figura 4.1). La alimentación consistió en fardos de pastura consociada y alfalfa *ad libitum* con un suplemento de 4 kg avena en grano por yegua/día.

El manejo grupal diario de los animales se realizaba en un corral de encierre, y los procedimientos diarios individuales (inspección clínica, infección experimental, tratamientos y toma de muestras) en dos bretes construidos *ad hoc* para garantizar el bienestar de los animales y el trabajo seguro de los operadores (Figura 4.1).

#### **Comité de ética**

Este ensayo fue aprobado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de INTA Castelar (Resolución 32/2011).



Figura 4.1:(a) Potrero con bebederos y comederos comunitarios en donde se alojaban las yeguas; (b) corral de encierre y bretes de trabajo.

#### **4.2.2 Virus desafío**

Se utilizó el virus identificado como E/9283/07 C3A, utilizado previamente en los ensayos *in vitro*, el cual fue propagado en células para obtener una suspensión de virus de 150 ml. La misma, fue fraccionada en 28 alícuotas de 5 ml (inóculo), almacenada a -70°C, titulada por DICT50%/ml y por qPCR (Apéndice, 8.1.1 y 8.2.3) y controlada para corroborar la ausencia de contaminantes bacterianos y micóticos.

Luego de realizar la infección de las yeguas, el volumen restante de cada inóculo fue titulado por qPCR en forma individual. A partir de la relación lineal establecida (Figura 5.6) entre el número de copias de genoma, medido por qPCR, y el título infeccioso, medido por DICT50%/ml, se estimaron los títulos infecciosos recibidos por cada yegua.

#### **4.2.3 Compuesto antiviral para su aplicación tópica**

##### 4.2.3.a. Preparación del principio activo

Un frasco ampolla conteniendo 100 mg de ganciclovir (GCV; > 99% de pureza por HPLC, Cat. G2536, Sigma Aldrich®) fue rehidratado con RPMI-1640 suplementado con 5% SFB y 1% antibiótico, filtrado (con filtro de 0,45 µ + 0,2 µ), y resuspendido en 50 ml finales de RPMI-1640 (Figura 4.2). Se realizaron controles de esterilidad bacteriológica y micótica.

Del análisis de los resultados de los ensayos *in vitro*, se determinó que la CE<sub>100</sub> de GCV era 1,25 µg/ml para número de placa y 0,92 µg/ml para tamaño siendo el promedio 1,01 µg/ml. Teniendo en cuenta estudios similares en humanos (Colin, 2007), la CE<sub>100</sub> fue incrementada 100 veces para la formulación del tópico, pasando de 1 µg/ml *in vitro* a 100 µg/ml *in vivo* ( 0,1 g/ 100 g – 0,01% p/p), para contemplar posibles factores que disminuyan la acción del principio activo como pérdida de droga por contacto, inhibición por restos de orina, materia fecal u otros, etc.

##### 4.2.3.b. Preparación magistral del producto farmacéutico: GCV en crema 0,01% p/p

La crema fue preparada al 0,01% p/p (0,1 g/ 100 g) utilizando como excipiente crema base (alcohol etílico 15%, cera blanca 1%, propilenglicol 10%, lauril sulfato sódico 2% y agua purificada csp 1000 g). Brevemente, 100 mg de GCV resuspendidos en 50 ml de RPMI-1640 con un peso de 51,7 g (4.2.3.a), fueron agregados a 948,3 g de crema base (peso final: 1000 g). Mediante el colorante del medio RPMI-1640, rojo fenol, se pudo observar la correcta homogenización del compuesto antiviral con la crema base. Crema base sin el agregado de GCV fue preparada (crema placebo). Ambas formulaciones (GCV

0,01% p/p y placebo) fueron dispuestas en potes multidosis de 1 kg con válvula cremera y se mantuvieron refrigerados a 4°C desde su preparación hasta el final de la experiencia. A partir del pote multidosis, se realizaba la dosificación (5 g por aplicación), en un recipiente *ad hoc* (Figura 4.2).



Figura 4.2: (a) Preparación del principio activo; (b) preparación del producto farmacéutico: GCV en crema 0,01% p/p

#### **4.2.4 Diseño experimental**

Las yeguas fueron identificadas del 1 al 20, con una tiza especial para marcación temporaria de animales en la parrilla costal izquierda (Figura 4.3), y distribuidas en 5 grupos al azar de 4 animales cada uno (Tabla 4.2).



Figura 4.3: Identificación de los animales en la parrilla costal izquierda con tiza *ad hoc*.

Grupo	Identificación individual	Infección	Tratamiento	
			Aplicación	Producto farmacéutico
<b>Control (C)</b>	3	Si	No	nc*
	9			
	14			
	18			
<b>Preventivo 4h (P<sub>4</sub>)</b>	2	Si	1 aplicación 4 h pi (día 0)	GCV 0,01% p/p
	10			
	11			
	20			
<b>Preventivo 4/24h (P<sub>4/24</sub>)</b>	6	Si	2 aplicaciones 4 y 24 h pi (día 0 y 1)	GCV 0,01% p/p
	8			
	17			
	19			
<b>Terapéutico con GCV (T<sub>GCV</sub>)</b>	5	Si	2 aplicaciones diarias ECE clínico	GCV 0,01% p/p
	7			
	12			
	13			
<b>Terapéutico placebo (T<sub>p</sub>)</b>	1	Si	2 aplicaciones diarias ECE clínico	Placebo
	4			
	15			
	16			

Tabla 4.2: Diseño experimental para la evaluación de la eficacia de GCV 0,01% p/p en yeguas experimentalmente infectadas con EHV-3.\*nc: No corresponde.

### Infección con EHV-3

Se siguió el protocolo descrito por Barrandeguy y col., (2012); brevemente, las yeguas fueron sujetas individualmente en los bretes de trabajo. Se obtuvieron muestras de sangre por punción yugular, y de piel y mucosas de la región perineal y vaginal mediante la utilización de un hisopo *ad hoc*, que denominaremos en este trabajo hisopado perineal-vaginal o HPV. Ambos materiales obtenidos constituyeron las muestras de tiempo experimental inicial (día 0). Luego, se realizó la higiene de la región perineal y genital por medio del lavado con una gasa humedecida en agua corriente para eliminar restos de materia fecal, orina, tierra, etc., y posterior secado con papel tipo “tissue”. Una vez preparada la zona, se procedió a la infección propiamente dicha de los labios de la vulva y zona perineal de las 20 yeguas, utilizando un hisopo de gasa (Figura 4.4) embebido en 5 ml de virus desafío (inóculo) conteniendo EHV-3.

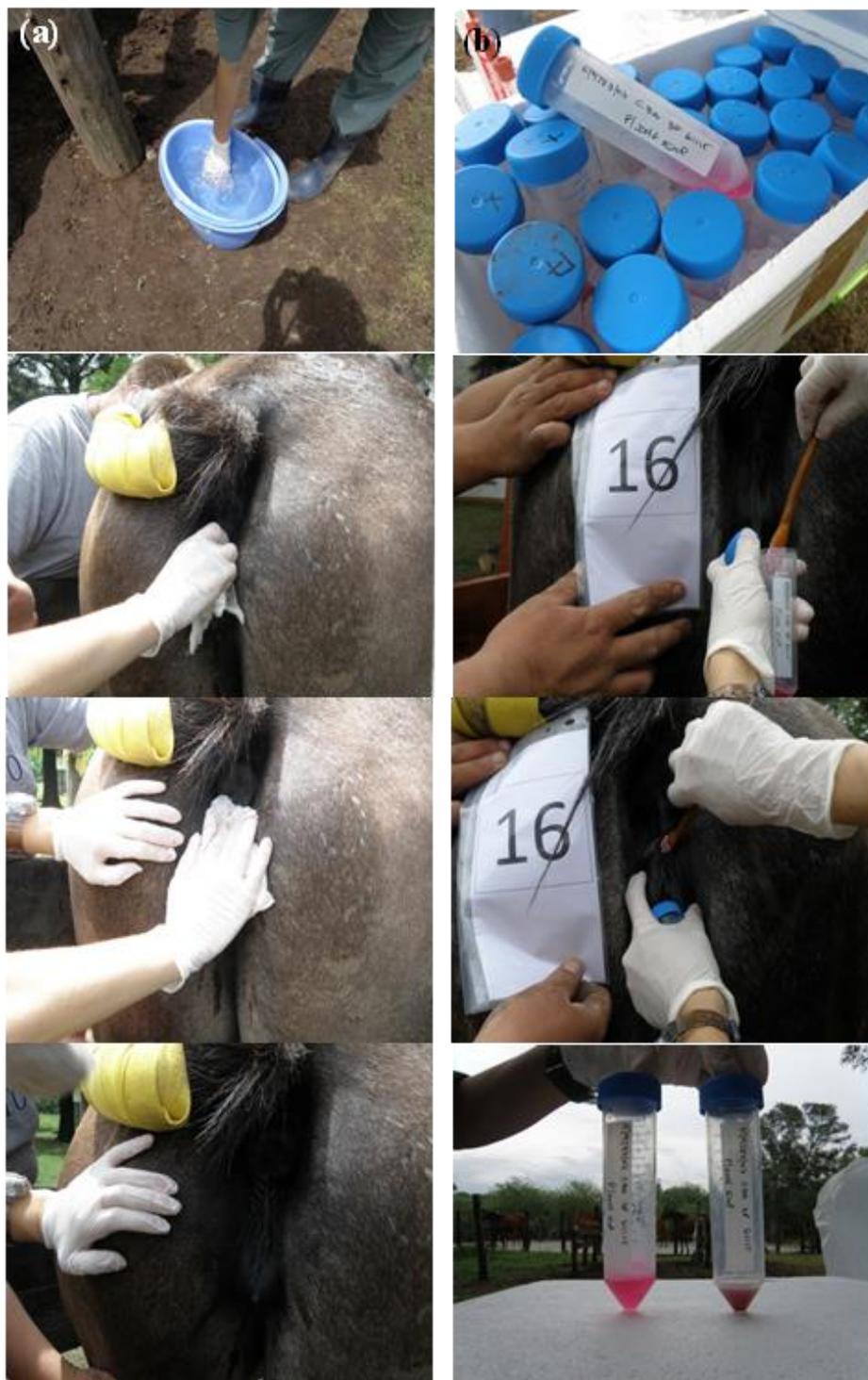


Figura 4.4: (a) Preparación de la zona genital y perineal para la infección con EHV-3, (b) Inoculación tópica por medio de un hisopo conteniendo EHV-3.

### Tratamientos

#### *Tratamiento preventivo*

Se realizó la aplicación de 5 g de crema GCV 0,01% p/p a las 4 h pi en el grupo P<sub>4</sub>, y a las 4 y 24 h pi en el grupo P<sub>4/24</sub>. Los animales del grupo C no fueron tratados, conformando el control.

#### *Tratamiento terapéutico*

El tratamiento consistió en dos aplicaciones diarias de 5 g de crema GCV 0,01% p/p en los animales del grupo T<sub>GCV</sub> y la misma dosis de crema placebo en los animales del grupo T<sub>P</sub>, desde la observación de lesiones evidentes (“score” > 10) de ECE hasta el registro de “score” clínico 0. Los animales del grupo C no fueron tratados, conformando el control.

#### **4.2.5 Evaluación clínica, toma de muestras y análisis de laboratorio**

El seguimiento de los animales, desde el día 0 hasta el día 36 pi, consistió en el registro diario de temperatura rectal, evidencia de signos clínicos generales (decaimiento, inapetencia, prurito u otros) y presencia y características de lesiones de ECE en la piel y mucosa de la zona perineal y genital, con registro fotográfico de las mismas. Estos datos fueron valorados aplicando el sistema de “scoring” descrito por Barrandeguy y col., (2012) (Tabla 4.3). Con respecto a la temperatura rectal, valores entre 37,5 y 38,2°C fueron considerados dentro de los parámetros normales (Castaño-Bello, 1998).

Diariamente, se tomaron muestras de HPV en medio de transporte para virus (MEM-D, MEM-E, 5% SFB, 1% antibiótico, 0,2% anti-fúngico), y una vez por semana muestras de sangre sin anticoagulante en tubos al vacío (BD Vacutainer®) (Figura 4.5).

A partir de los HPV, se detectó y cuantificó el ADN de EHV-3 (número de copias) por qPCR (Apéndice, 8.2.1 y 8.2.3), y se realizó aislamiento viral en cultivo celular (Apéndice, 8.1.4). Las muestras de suero fueron analizadas por neutralización viral para la detección y cuantificación de anticuerpos contra EHV-3 (Apéndice, 8.3).

<b>Tumefacción - congestión</b>	0 = ausente
	1= presente
<b>Descarga vulvar</b>	0 = ausente
	1= serosa
	2= mucosa
	3= purulenta
<b>Dolor</b>	0 = ausente
	1= presente
<b>Tipo de lesión</b>	0 = ausente
	1= pápulas
	2= vesículas
	3= pústulas
	4= úlceras
<b>Tamaño de lesión</b>	0 = ausente
	1= pequeñas (hasta 1 cm)
	2= grandes (mayor a 2 cm)
<b>Cantidad de lesiones</b>	0 = ausente
	1= hasta 4
	2= más de 4
<b>Extensión de la lesión</b>	0= en el área de inoculación
	1= fuera del área de inoculación
<b>Otras</b>	0 = ausente
	1= infección bacteriana secundaria o miasis

Tabla 4.3: Sistema de “scoring” aplicado durante la evaluación *in vivo* de la eficacia de GCV 0,01% p/p



Figura 4.5: Obtención de muestras (HPV en medio de transporte virológico y sangre sin anticoagulante) y toma de temperatura rectal.

### 4.3 ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA CONOCIDA COMO iiPCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHV-3 A CAMPO

Mediante una relación colaborativa pre-existente con la empresa GeneReach (Taiwan – USA) se adaptó y validó la tecnología de PCR isotérmica aislada (iiPCR), metodología práctica, rápida y altamente sensible de detección de agentes infecciosos (Balasuriya y col., 2014; Barrandeguy y col., 2016; Carossino y col., 2016), para la detección de EHV-3 en animales previo al servicio.

#### 4.3.1 Tecnología iiPCR

Durante la reacción de iiPCR, se produce un calentamiento isotérmico en la parte inferior de los microtubos capilares, especialmente diseñados para realizar la convección térmica en un compartimento aislado, generando el gradiente de temperatura necesario para que se produzca la hibridación, la extensión y la amplificación de una reacción de PCR (Figura 4.6).

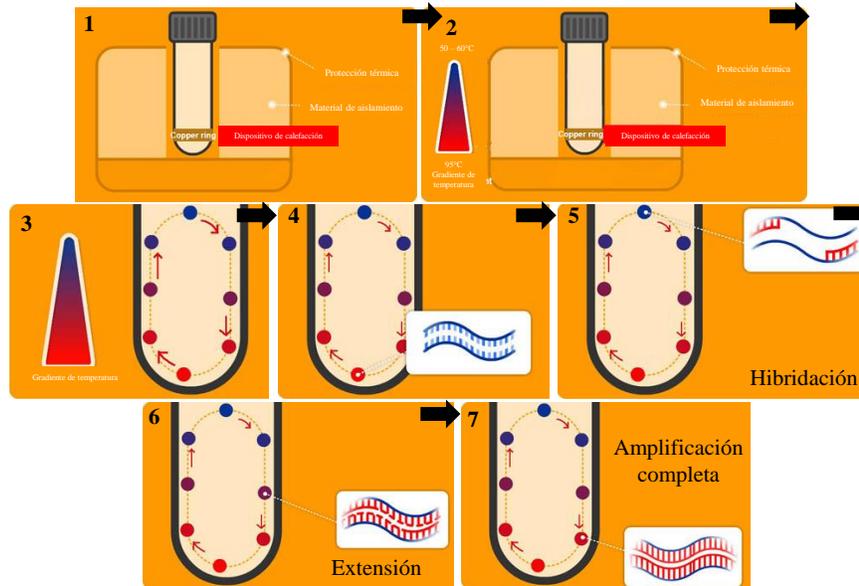


Figura 4.6: Reacción de iiPCR: (1) tubo capilar ubicado en un compartimento aislado, con un dispositivo de calefacción; (2) la convección de temperatura se produce por el calentamiento de la parte inferior del tubo (anillo de cobre); (3) la convección térmica impulsa el movimiento del contenido del capilar dando lugar a la reacción de PCR; (4) desnaturalización del ADN; (5) hibridación con los cebadores; (6) extensión de una nueva hebra de ADN (7) la amplificación completa del ADN se produce en un ciclo completo de convección térmica.

La manualidad de este ensayo es muy fácil de llevar a cabo; brevemente, la mezcla que incluye los cebadores y la sonda, viene dispuesta en microtubos para cada reacción, que deben ser rehidratados con el “buffer”. Se utiliza un microtubo de mezcla por cada muestra a analizar, y dos para los controles (positivo y negativo). Una vez inoculada la muestra, todo el contenido del microtubo debe ser transferido a los microtubos especialmente diseñados, y los mismos son dispuestos en el equipo de iiPCR (Figura 4.7).

Las señales obtenidas luego del ciclado son detectadas y procesadas por un dispositivo óptico (Tsai y col., 2012), y los resultados se muestran de manera automática en la pantalla del equipo, en 60 minutos, que sumado al tiempo destinado a la extracción, dan un total de 1:30 h de espera de resultados.



Figura 4.7: Secuencia de pasos para el ensayo de iiPCR mediante el uso del dispositivo POCKIT™.

Se diseñaron los cebadores y la sonda necesarios para la detección de un fragmento del gen codificante de la glicoproteína viral G; y se estableció el programa de ciclado. Dicha información, está protegida por un acuerdo de confidencialidad establecido con la empresa GeneReach.

#### **4.3.2 Muestras**

Para la validación de la técnica se seleccionaron 114 muestras de referencia, positivas y negativas a EHV-3, analizadas por qPCR (Apéndice, 8.2.3), y que incluían: 85 muestras de hisopados perineales-genitales de yeguas y padrillos con y sin manifestación clínica de ECE provenientes de casos de campo (n: 42) y de infecciones experimentales (n: 43), nueve muestras de EHV-3 provenientes de sobrenadante de cultivo celular y 20 aislamientos de otros patógenos equinos.

Para establecer la sensibilidad analítica de la iiPCR, se utilizó el lote viral de trabajo E/9283/07 C3A, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas en base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) en MEM-D.

Para determinar la especificidad analítica de la iiPCR, se incluyeron en la validación muestras positivas de otros patógenos equinos (virus y bacterias), una cepa de referencia y seis aislamientos de campo de EHV-1, una cepa de referencia y tres aislamientos de campo de EHV-4, una cepa de referencia de EHV-2, la cepa vacunal (ARVAC®, Zoetis) de Arteritis viral equina (AVE) conteniendo virus vivo modificado y un semen positivo a AVE, un aislamiento de campo de *Salmonella entérica* sv. Abortusequi y 2 aislamientos de *Streptococcus equi* Beta hemolytico Group C Lancefield.

Se realizó la extracción de ADN de las 114 muestras, de las diluciones del lote viral E79283/07 C3A, y de las muestras positivas a otros patógenos, siguiendo el procedimiento descrito en el apéndice 8.2.1.

#### **4.3.3 Detección de EHV-3 por iiPCR y qPCR**

Para determinar la sensibilidad analítica de la iiPCR, se realizó una comparación en paralelo con la qPCR, previamente estandarizada en nuestro laboratorio según se detalló en 4.1.4.a, sobre las diluciones seriadas en base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) del E/9283/07 C3A. Se realizaron tres determinaciones independientes para cada dilución.

Las cepas de referencia (EHV-1, EHV-4, EHV-2), la cepa vacunal ARVAC® (Zoetis) y los aislamientos de campo de virus y bacterias descritos anteriormente, fueron también analizadas por ambas metodologías para establecer la especificidad analítica.

Las muestras fueron analizadas una única vez por cada metodología, y los ensayos fueron acompañados por una curva patrón del control positivo en el caso de la qPCR y por una determinación del mismo control en la iiPCR.

## **4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **4.4.1 Validación diagnóstica de la técnica de qPCR para la detección de EVH-3**

Para determinar la sensibilidad analítica de la técnica, se realizó un análisis con el modelo de regresión lineal y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

La cinética de replicación viral, se estudió mediante un análisis de regresión lineal cuadrática del título viral (expresado como  $\text{Log}_{10}$ ) obtenido por DICT50%/ml y qPCR en función del tiempo, y luego se calculó el coeficiente de correlación por el método de Spearman.

Para la validación diagnóstica de la técnica, que incluyó la estimación del punto de corte, su sensibilidad y especificidad, se realizó un análisis ROC, acrónimo en inglés de “Receiver Operating Characteristic Curve”, de los resultados obtenidos. Se utilizó como técnica de referencia al aislamiento en cultivo celular.

### **4.4.2 Comparación de la eficacia de distintos compuestos antivirales para reducir o inhibir la replicación de EHV-3 *in vitro***

#### **4.4.1.a. Ensayos dosis-respuesta de compuestos antivirales y ensayos comparativos entre los compuestos antivirales sintéticos a distintas concentraciones por qPCR y DICT50%/ml.**

La concentración efectiva 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) tanto para número como para tamaño de placas de lisis; así como la cuantificación viral determinada por qPCR y por DICT50%/ml fueron analizados mediante una regresión no lineal que ajusta con una curva de dosis (Log Inhibición)-respuesta sigmoidea simétrica utilizando el modelo de “Hill-slope”. A partir de estos resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía de las  $\text{CE}_{50}$  promedio para número y tamaño de placa de lisis obtenido en cada tratamiento.

A su vez, para el análisis de las diferentes concentraciones de cada antiviral seleccionadas para determinar la inhibición de la producción viral a lo largo del tiempo mediante qPCR y DICT50%/ml, se calculó el área bajo la curva (AUC) promedio de ambos parámetros, y las mismas fueron comparados estadísticamente por ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Complementariamente, se realizó un ANOVA de medidas repetidas en el tiempo.

#### **4.4.1.b. Comparación de la eficacia de los compuestos frente a cepas de campo de EHV-3**

Con respecto al análisis de los compuestos frente a las seis cepas de campo, para los tres parámetros analizados (número y tamaño de placas de lisis y cuantificación por qPCR y DICT50%/ml), se realizó un ANOVA de dos vías (tratamiento y cepa).

#### **4.4.3 Evaluación de la eficacia del compuesto antiviral seleccionado, en yeguas infectadas en forma experimental con EHV-3**

Con los datos obtenidos del registro de “score” clínico y de la cuantificación de la producción de virus por qPCR a partir de los hisopados obtenidos de las yeguas, se calcularon las respectivas AUC (Tempesta y col., 2008, 2007b), las cuales fueron posteriormente comparadas por ANOVA de una vía, seguido de un análisis post-ANOVA de Bonferroni. Paralelamente se realizaron análisis de medidas repetidas en el tiempo para comparar respuesta inmune, “score” clínico y excreción viral medida por qPCR. La infectividad a distintos días post-infección se analizó por el Test de Fisher.

#### **4.4.4 Validación de la plataforma tecnológica conocida como iiPCR para el diagnóstico de EHV-3 a campo**

Para determinar la sensibilidad analítica de la técnica, se realizó un análisis con el modelo de regresión lineal.

Para la validación diagnóstica de la técnica, que incluyó la estimación del punto de corte, su sensibilidad y especificidad asociadas, se realizó un análisis ROC, de los resultados obtenidos a partir de las 114 muestras utilizadas en la validación, mediante la qPCR y la iiPCR.

Mediante la comparación de curvas ROC y el índice Kappa ( $\kappa$ ) se evaluó la sensibilidad y especificidad relativa y el grado de concordancia de la iiPCR respecto de la técnica de qPCR (Cortés-Reyes y col., 2010; Eliasson y col., 2017), y se estableció un punto de corte con sensibilidad y especificidad comparadas.

La metodología estadística aplicada tanto en la validación de la técnicas de qPCR como en la de iiPCR, se basó en las recomendaciones para validación de ensayos de PCR de la Organización Mundial de Sanidad Animal (World Organization for Animal Health, 2012, 2006).

En todos los casos, se utilizaron los programas MedCalc, versión 12.7.0.0, para Windows XP/Vista/7/8, [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org), InfoStat (versión 2010), Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina y Graphpad Prism version 5.00 para

Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). En todas las comparaciones, el nivel de significancia se fijó en un valor de  $p = 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

**CAPÍTULO 1**  
**ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA**

### 5.1.1 Virus

#### 5.1.1.a Clon viral E/9283/07 C3A

El título infeccioso promedio de los 14 ensayos fue de  $10^6$  DICT50%/ml y de  $10^{5,53}$  UFP/ml (DE: 0,2). La dilución de uso del virus E/9283/07 C3A, apropiada para obtener entre 20 y 30 placas/pocillo, para los ensayos *in vitro*, fue 1/10000 ( $10^{-4}$ ).

La identidad nucleotídica entre la secuencia del clon viral E/9283/07 C3A y las secuencias de EHV-3 disponibles en el Genbank (KM051845.1; AF081188.1; GQ336877.1) fue del 95 y 100% (Figura 5.3).

#### 5.1.1.b Cepas de campo de EHV-3

- *Determinación del tamaño de placas de lisis*

Al determinar el tamaño de las placas de lisis de cada cepa de campo de EHV-3 se diferenciaron dos grupos, con respecto a la cepa de referencia; un grupo de cepas que producían placas de lisis 1,64 veces más grandes (denominadas en este trabajo “pequeñas”) y otro que producían placas 2,88 veces más grandes (denominadas en este trabajo “grandes”) (Figura 5.1).

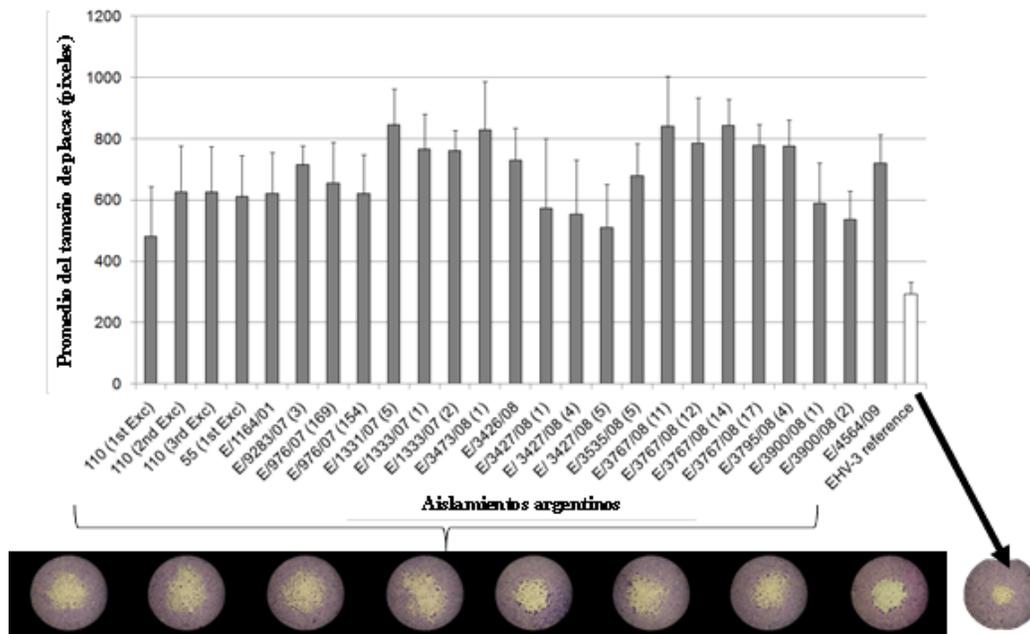


Figura 5.1: Tamaños de placas de lisis de los 25 aislamientos de campo de EHV-3 y de la cepa de referencia, determinado a las 72 h pi (el valor graficado corresponde a la media del tamaño determinado para 20 placas por cada aislamiento). Las barras grises corresponden a las cepas de campo (aislamientos) mientras que la barra blanca corresponde a la cepa de referencia de EHV-3, cedida gentilmente por el Dr. Dubovi, Cornell University

- *Análisis de la región del gen gG*

A partir de los 25 aislamientos de campo de EHV-3, se obtuvo la secuencia nucleotídica de una región parcial del gen gG (496 pb), desde el nucleótido 802 al 1298. Por medio de un análisis de alineamientos múltiples, las cepas de Argentina se agruparon en dos variantes génicas que difieren en 3 bases en las posiciones 904, 1103 y 1264 de la región parcial del gen gG: cepas CAG y ACT. Al compararse las secuencias con aquellas disponibles en el GenBank de Australia (CAT), Estados Unidos y Brasil (ATT), se observó que también existe una diferencia con las cepas argentinas en las mismas posiciones (Figura 5.2).

La sustitución en la posición 904 es una mutación silente, sin embargo las otras dos mutaciones producen cambios en la secuencia aminoacídica: ácido aspártico (D) a alanina (A) en el residuo aminoacídico 368 y serina (S) a alanina (A) en el 422.

Identificación	Posición		
	904	1103	1264
AF081188	AGCTGCGGCAA	TGCCGACGGAG	GAGTCTCGAG
55 (1 <sup>er</sup> Exc)	....C....	....A....	....G....
110 (1 <sup>er</sup> Exc)	....C....	....A....	....G....
110 (2 <sup>er</sup> Exc)	....C....	....A....	....G....
110 (3 <sup>er</sup> Exc)	....C....	....A....	....G....
E/1164/01	....C....	....A....	....G....
E/9283/07 (3)	....C....	....A....	....G....
E/976/07 (169)	....C....	....A....	....G....
E/1331/07 (5)	....C....	....A....	....G....
E/3767/08 (11)	....C....	....A....	....G....
E/3767/08 (12)	....C....	....A....	....G....
E/3767/08 (14)	....C....	....A....	....G....
E/3767/08 (17)	....C....	....A....	....G....
E/3795/08	....C....	....A....	....G....
GQ336877	....A....	....A....	....T....
EHV-3 reference	....A....	....A....	....T....
E/976/07 (154)	....A....	....C....	....T....
E/1333/07 (1)	....A....	....C....	....T....
E/1333/07 (2)	....A....	....C....	....T....
E/3426/08	....A....	....C....	....T....
E/3427/08 (1)	....A....	....C....	....T....
E/3427/08 (4)	....A....	....C....	....T....
E/3427/08 (5)	....A....	....C....	....T....
E/3473/08 (1)	....A....	....C....	....T....
E/3535/08 (5)	....A....	....C....	....T....
E/3900/08 (1)	....A....	....C....	....T....
E/3900/08 (2)	....A....	....C....	....T....
E/4564/09	....A....	....C....	....T....

Figura 5.2: Secuencia génica en las posiciones 904, 1103 y 1264 de la región parcial del gen gG de los 25 aislamientos argentinos de EHV-3.

Por medio del análisis filogenético realizado con los aislamientos argentinos y aquellos de Australia, Estados Unidos y Brasil, se observó que existen dos “clusters” diferenciados (Figura 5.3).

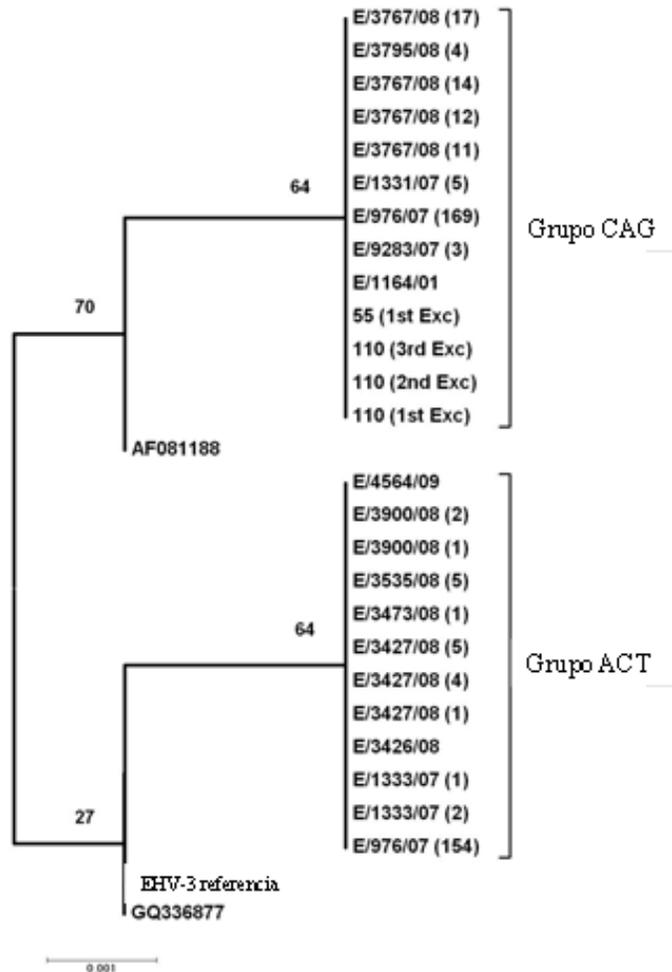


Figura 5.3: Relación filogenética entre aislamientos de campo argentinos y cepas de EHV-3 aisladas en otras partes del mundo. El árbol filogenético fue generado por Neighbour-Joining utilizando la secuencia parcial del gen gG de 496 pb. Valores de Bootstrap se muestran por 1000 réplicas. Barra, 0,001 sustituciones por nucleótido.

Se observó que dentro de la variante génica ACT, existían cepas que producían placas de lisis “pequeñas” y “grandes”, mientras que para la variante CAG, todas las cepas producían placas de lisis “grandes”. A la luz de estos resultados, se decidió entonces que para probar la eficacia de los compuestos antivirales se utilizarían dos cepas correspondientes a cada variante (pequeñas-ACT; grandes-ACT y grandes-CAG) (Tabla 4.1)

### 5.1.2 Variabilidad intraensayo e interensayo

Los resultados de título viral, número y tamaño de placa de lisis obtenidos en los 14 ensayos realizados se muestran a continuación en la Tabla 5.1.

Nro de repetición	Pasaje Ederm	Número de placas*	Título (ufp/ml)	Tamaño de placas** (pi)
1	34	24,0	350000,0	641716,9
2	34	17,0	490000,0	697714,6
3	34	30,0	590000,0	566170,4
4	34	29,0	560000,0	760318,4
5	33	17,0	350000,0	300246,6
6	33	18,0	370000,0	257086,6
7	32	10,0	170000,0	221445,5
8	32	11,0	160000,0	189786,8
9	30	9,0	190000,0	179711,0
10	30	8,0	230000,0	192126,8
11	30	16,0	310000,0	311222,6
12	30	21,0	430000,0	319552,4
13	30	23,0	460000,0	381675,9
14	30	23,0	470000,0	372881,3

Tabla 5.1: Resultados de los ensayos de titulación del virus E/9283/07 C3A por UFP/ml. Se muestran únicamente los resultados obtenidos en cada ensayo para la dilución 1/10000, en la cual se obtuvieron entre 20 y 30 placas de lisis por pocillo. \*Promedio del recuento de placas obtenido en la dilución 10<sup>-4</sup> de 3 réplicas \*\*Promedio del área de entre 20-30 placas de lisis de las 3 réplicas.

El número de placas de lisis óptimo para su registro fotográfico y recuento se obtuvo con la dilución viral 10<sup>-4</sup> (1/10000), datos que se detallan en la Tabla 5.1. El número de placas obtenidas en las diluciones más concentradas (entre 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-3</sup>) fue muy elevado y no permitió el conteo individual de las mismas, mientras que en la dilución 10<sup>-5</sup> se registró un número muy reducido de placas (menos de 20 en total).

Se realizó un “control chart” mediante el programa MedCalc, para determinar el rango de admisión para el número de placas de lisis, el título infeccioso (UFP/ml), y el tamaño de las placas, obtenidos por la infección de células EDerm con EHV-3 en la dilución 1/10000 (Figura 5.4).

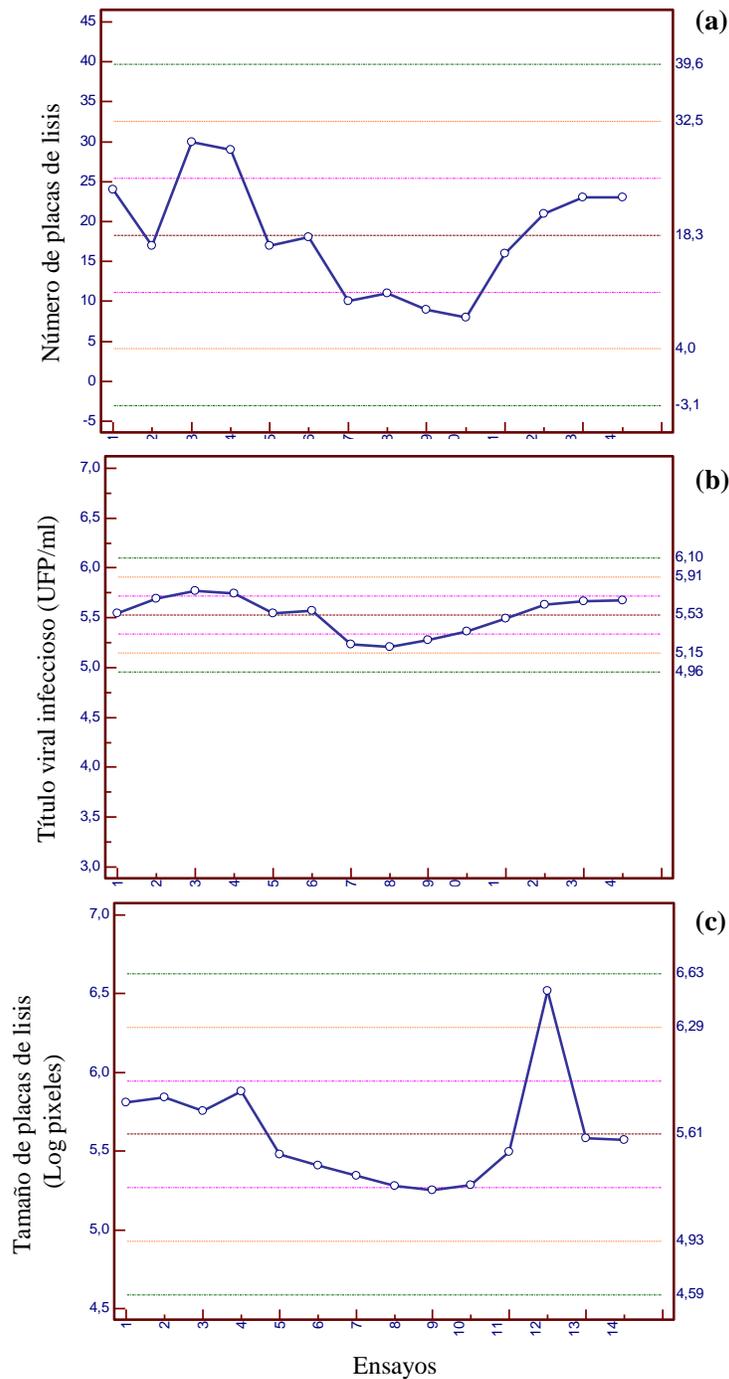


Figura 5.4: “Control chart” para: (a) número de placas de lisis; (b) título infeccioso, expresado como UFP/ml; y (c) tamaño de placas de lisis, expresado como  $\text{Log}_{10}$ ; obtenidos por la infección con E/9283/07 C3A en la dilución 1/10000 en cultivo de células EDerm.

Se determinó que la media esperada para considerar conforme el número de las placas de lisis fue de 18,3, considerando como dispersión admitida 2 DE ( $32,5 > 18,3 > 4$ )

(variabilidad interensayos), mientras que la variabilidad intraensayo, medida como el DE de las tres réplicas de cada ensayo, se encuentra entre 0,6 y 11,1 placas de lisis. Para el título infeccioso medido por UFP/ml, se estableció que el rango de admisión sería  $10^{5,91} > 10^{5,53} > 10^{5,15}$  UFP/ml, y para el tamaño de las placas de lisis fue de 346736,85 pixeles considerando como dispersión admitida 2 DE ( $977237,22 > 346736,85 < 123026,87$ ) (variabilidad interensayos), mientras que la variabilidad intraensayo se encontraba entre 59176,54 y 190398,70 pixeles.

Para evaluar la variabilidad interensayo en relación al pasaje de células utilizado, se realizó un ANOVA y se observó que existe diferencia significativa (ANOVA de una vía,  $p < 0,001$ ) de acuerdo al pasaje de células utilizado para el recuento de placas de lisis. A partir del rango de admisión determinado para el recuento de placas de lisis, se determinó que el rango de admisión para el pasaje de células sería entre el 30 y el 34 inclusive (Figura 5.5).

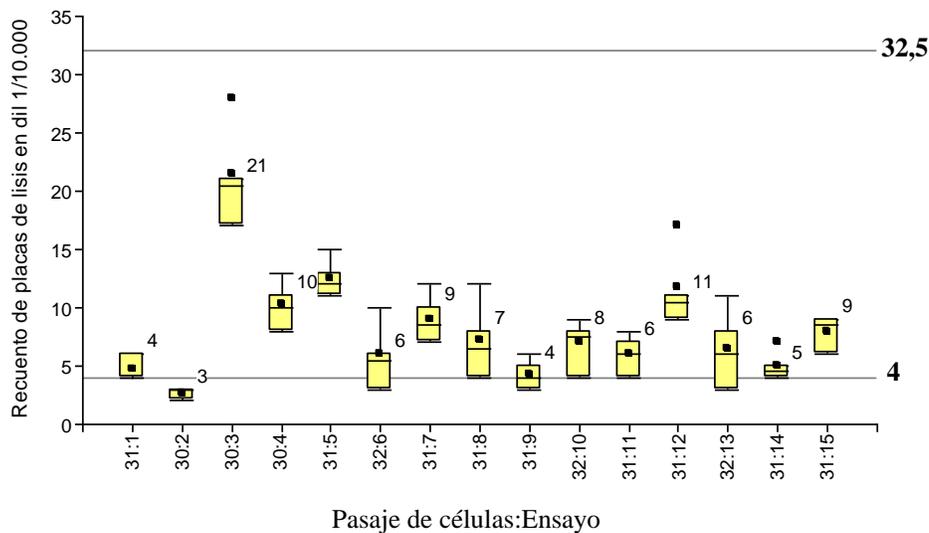


Figura 5.5: Recuento de placas de lisis en relación al pasaje de células utilizados. Se marca entre líneas el rango de admisión para el número de placas de lisis, determinado con anterioridad, entre 4 y 32,5.

Debido a la alta variabilidad interensayo observada tanto en los resultados de número como de tamaño de placas de lisis, se concluyó que era necesario incluir un control de virus en la dilución de uso establecida (control negativo, virus sin antiviral) en cada ensayo, para que al analizar los resultados obtenidos, estos sean referidos a su control interno. Así como también era necesario realizar tres réplicas de ensayo para cada

compuesto antiviral a analizar y en cada réplica evaluar a todos los compuestos en paralelo.

A su vez, por la alta variabilidad intraensayo observada para ambas determinaciones (tamaño y número de placa), se concluyó que se realizarían por lo menos tres réplicas (pocillos inoculados) por concentración de antiviral a ensayar, en cada ensayo.

### **5.1.3 Estandarización de la metodología de qPCR en la evaluación de compuestos antivirales**

#### **5.1.3.a Curva de calibración**

Los resultados de título infeccioso de E/9283/07 C3A fueron de  $10^6$  y  $10^{5,36}$  determinado por DICT50%/ml y UFP/ml, respectivamente. A su vez, mediante el ensayo de qPCR se determinaron los ciclos umbral (Ct) para cada dilución analizada. Dichos resultados, obtenidos a partir de los 4 ensayos realizados, se muestran a continuación en la Tabla 5.2

Diluciones E/9283/07 C3A	UFP/ml	qPCR			
		Ct/ Resultado	Ct/ Resultado	Ct/ Resultado	Ct/ Resultado
$10^{-1}$	23000	22,4/+	23,5/+	Ne*	23,5/+
$10^{-2}$	2300	Ne*	Ne*	25,5/+	Ne*
$10^{-3}$	230	28/+	29,8/+	28,5/+	30,5/+
<b><math>10^{-4}</math></b>	<b>23</b>	<b>34,5/+</b>	<b>35,1/+</b>	<b>33,5/+</b>	<b>35/+</b>
$10^{-5}$	2,3	38/+	38,3/+	37/+	Indet/-
$10^{-6}$	0,23	Indet/-	Indet/-	Ne*	Indet/-
R <sup>2</sup>		0,9	0,85	0,9	0,85

Tabla 5.2: Resultados del análisis por qPCR, en paralelo con DICT50%/ml de diluciones seriadas (base 10) del lote viral de trabajo E/9283/07 C3A. \*Ne: No establecido; Indet: Indeterminado; (-): Negativo; (+): Positivo; R2: coeficiente de determinación.

Se detectó genoma viral en todas las réplicas de la dilución  $10^{-4}$  (4/4) y en el 75% de las de  $10^{-5}$  (3/4), no detectándose genoma viral en la dilución  $10^{-6}$ . Se determinó que la técnica de qPCR detecta hasta 2,3 partículas infecciosas de EHV-3 en sobrenadante de cultivos celular.

En la comparación de la cinética de replicación viral, medida por DICT50%/ml y por qPCR, se observó una diferencia de 1 Log a favor de la titulación por DICT50%/ml. Sin embargo, al realizar el análisis de regresión lineal, se demostró la linealidad de los resultados con una significancia de  $p < 0,0001$  y  $R^2$  de 0,88 (Figura 5.6), mostrando ambas metodologías un coeficiente de correlación de Pearson = 0,94 ( $p < 0,0001$ ).

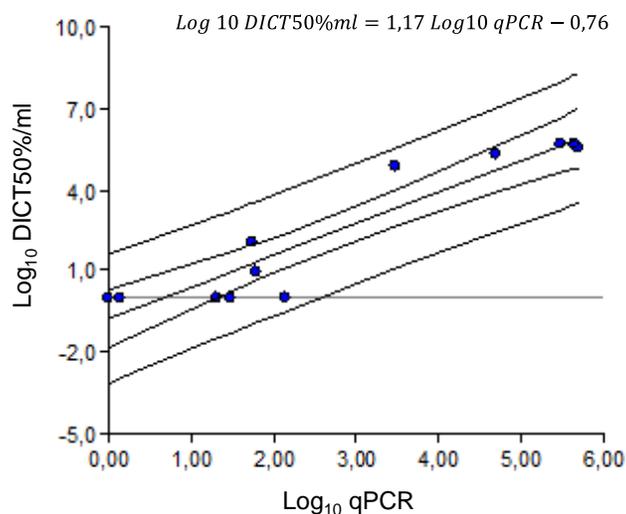


Figura 5.6: Relación entre título viral por qPCR y DICT50%/ml.

Al no encontrarse diferencia significativa para la detección de virus por ambas técnicas, se decidió utilizar la qPCR para la titulación de los sobrenadantes de células infectadas y tratadas/no tratadas en los estudios de los compuestos antivirales *in vitro* e *in vivo*. Se estableció que en cada ensayo de qPCR se debe incluir una curva patrón con el virus control, utilizando como información el título expresado en UFP/ml, para determinar la concentración de virus en las muestras por qPCR.

#### 5.1.3.b Cinética de replicación

En las Figura 5.7 y Figura 5.8, se muestran los resultados del análisis de regresión lineal cuadrática en función del tiempo para el título viral por DICT50%/ml ( $R^2= 0,85$ ) y qPCR ( $R^2= 0,74$ ), respectivamente.

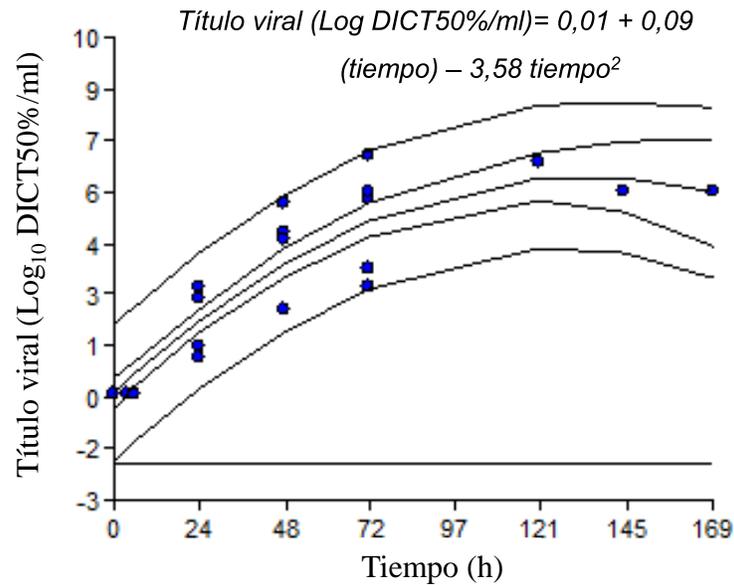


Figura 5.7: Cinética de replicación viral de EHV-3 medida por DICT50%/ml.

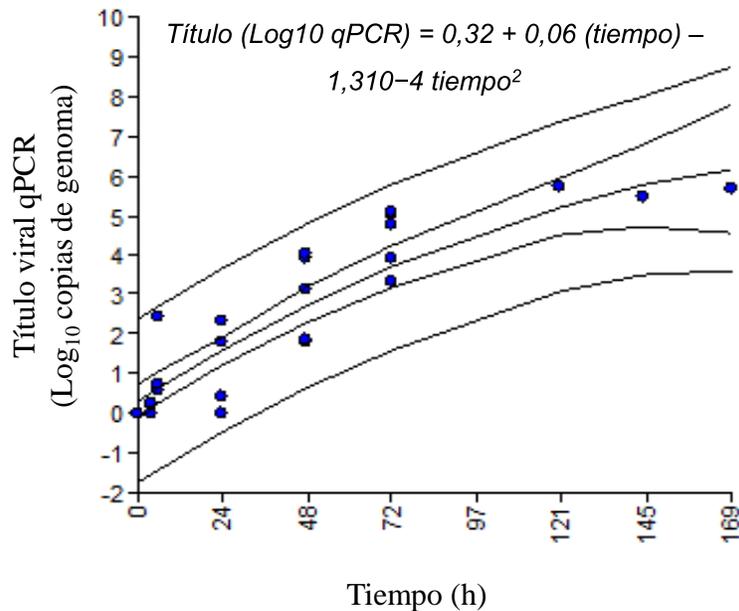


Figura 5.8: Cinética de replicación viral de EHV-3 medida por qPCR.

Por otra parte, mediante el método de Spearman, se encontró una correlación altamente significativa entre ambas técnicas ( $p < 0,000001$ ) con un  $R^2 = 0,74$ .

**5.1.3.c Validación diagnóstica de la técnica de qPCR**

Partiendo de 411 muestras con resultados de aislamiento viral en cultivo celular, se realizó un análisis de AUC para los resultados de la cuantificación ( $\text{Log}_{10}$  de copias de genoma) por qPCR, que arrojó un resultado de 0,99, con un nivel de significancia de  $p < 0,0001$ , lo que significa que la técnica clasificaría correctamente 99 determinaciones en un total de 100. Se estableció también el punto de corte para esta variable por medio de un análisis ROC, el cual se encuentra en  $10^{2,93}$  copias de genoma viral, con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 96,6%.

Realizando el mismo análisis para los valores de Ct, se estableció un AUC de la curva ROC de 0,99 ( $p < 0,0001$ ), que indica que de 100 ensayos de qPCR, los resultados se clasifican correctamente en el 99% de ellos, y mediante un análisis ROC para la variable Ct, se estableció el punto de corte en 31,04, con una sensibilidad de 99,5% y una especificidad del 91,5%.

Al realizar la concordancia entre los resultados de aislamiento viral en cultivo celular y qPCR, tanto por  $\text{Log}_{10}$  de copias de genoma como por Ct, se determinó un valor  $\kappa$  de 0,967 y 0,966, respectivamente, indicando una concordancia muy buena entre ambas metodologías.

Mediante estos puntos de corte (copias de genoma y Ct), se logra clasificar como positivas a las muestras que resultan también positivas por aislamiento viral en cultivo celular. Este fue el punto de corte utilizado para los ensayos de determinación de la excreción viral en yeguas infectadas con EHV-3 y tratadas bajo distintos protocolos (Diagrama 5.1).

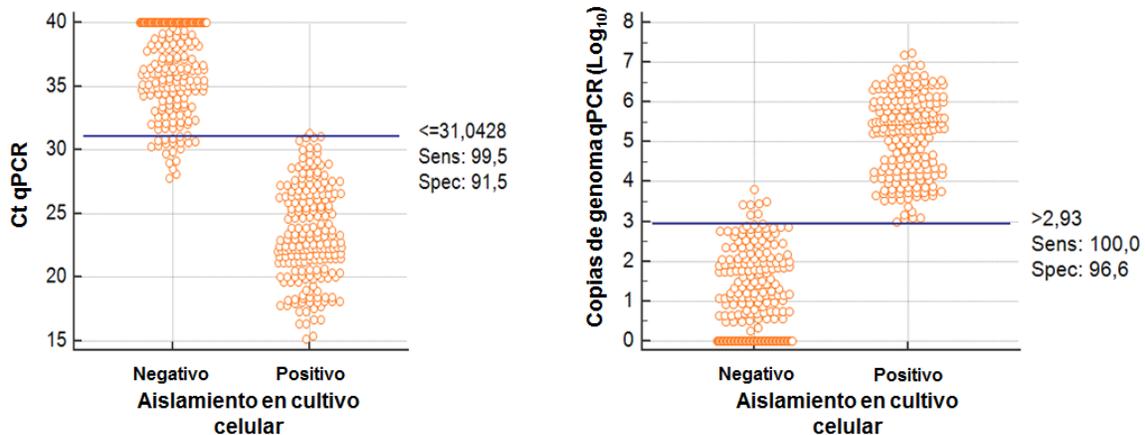


Diagrama 5.1: Comparación de las 411 muestras incluidas en la validación del ensayo de qPCR, en referencia a los resultados de aislamiento en cultivo celular, y de acuerdo al punto de corte establecido por Ct (panel a la izquierda) y copias de genoma (panel a la derecha).

De la misma manera, se estableció también un punto de corte con mayor sensibilidad para este ensayo, para ser utilizado con fines diagnósticos (al igual que la iiPCR) para asegurarnos de detectar hasta trazas del virus, pudiendo este no ser infeccioso. Este valor se estableció en un Ct de 38,5 con un AUC de la curva ROC de 1, y un  $p = 0,0000$ . Es decir, que con este punto de corte se logra un 100% de concordancia entre el ensayo de iiPCR y qPCR.

De las 411 muestras que se utilizaron para la determinación de los puntos de corte, 114 fueron también analizadas por la técnica de iiPCR (5.4.2). Al analizar los resultados de iiPCR comparados con la qPCR de baja y alta sensibilidad (Ct 38,5 y Ct 31,04, respectivamente), se observó que 19 muestras quedaban ubicadas en una zona entre ambos puntos de corte o “zona gris” (Diagrama 5.2). De estas 19, 12 resultaron negativas por aislamiento viral en cultivo celular (Tabla 5.3), y las otras siete fueron indeterminadas.

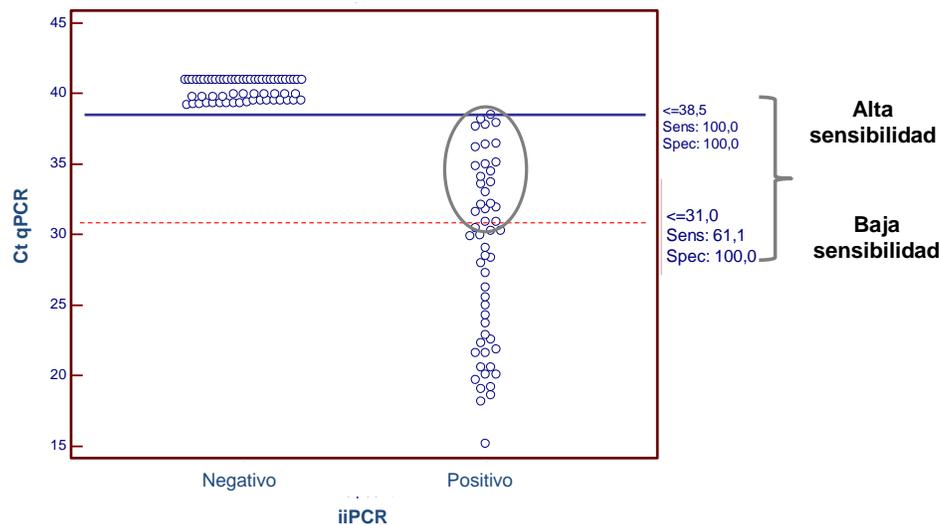


Diagrama 5.2: Comparación de clasificación de muestras según qPCR con punto de corte de baja y alta sensibilidad (Ct 31,04 y Ct 38,5, respectivamente), asociada a al diagnóstico por iiPCR y a la detección de virus por aislamiento en cultivo celular. Se muestra la zona gris entre ambos puntos de corte, en donde quedan ubicadas 19 muestras.

Identificación de la muestra	iiPCR		Ct	qPCR		Aislamiento en cultivo celular
	Índice	Resultado		Clasificación con Ct 31,04	Clasificación con Ct 38,05	
E/7438/15-14	2,47	+	33	-	+	-
E/7438/15-2	5,17	+	30,3	+	+	-
E/7438/15-20	4,22	+	29,9	+	+	-
E/7438/15-17	3,45	+	30,3	+	+	-
E/7438/15-5	3,31	+	34,5	-	+	-
E/7438/15-12	4,61	+	30	+	+	-
E/7438/15-13	4,48	+	34,1	-	+	-
E/7441/15-3	1,69	-	33,7	-	+	-
E/7441/15-9	3,1	+	30,5	+	+	-
E/7441/15-14	4,51	+	36,2	-	+	-
E/7441/15-17	2,83	+	34,9	-	+	-
E/7441/15-19	3,4	+	35	-	+	-

Tabla 5.3: Resultados obtenidos por iiPCR, qPCR y aislamiento en cultivo celular de las 12 muestras que se encontraron ubicadas en la zona gris de Ct determinado por qPCR y que fueron analizadas por las tres metodologías.

De esta manera, para asegurar un diagnóstico sería aconsejable utilizar el punto de corte de Ct 38,5, no así en situaciones en donde se pretende detectar el punto de resolución de la infección y de la clínica asociada, en las cuales si bien no se puede detectar trazas de copias de genoma, las mismas no resultan infecciosas.

**CAPÍTULO 2**

**COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DISTINTOS COMPUESTOS  
ANTIVIRALES PARA REDUCIR O INHIBIR LA REPLICACIÓN DE EHV-3 *IN*  
*VITRO.***

### 5.2.1 Ensayos dosis-respuesta de los compuestos antivirales sintéticos contra EHV-3 en cultivos celulares

Las concentraciones efectivas 50% (CE<sub>50</sub>) de aciclovir (ACV), cidofovir (HPMPC), ganciclovir (GCV) y brivudin (BVDU), para reducir el número (N) y tamaño (T) de placas de lisis inducidas por la infección de células EDerm con EHV-3 se muestran en la Figura 5.9.

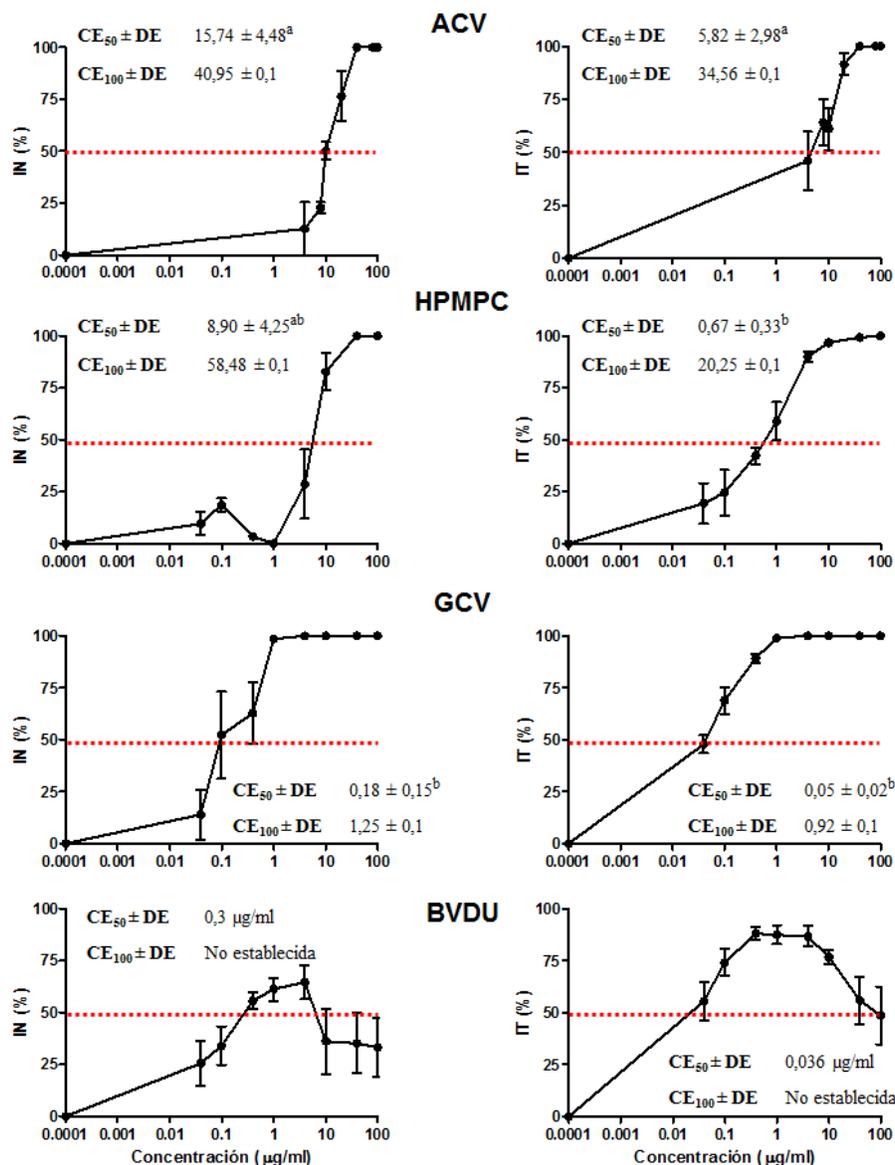


Figura 5.9: Dosis-respuesta para número (N) y tamaño (T) de placas de lisis en presencia de ACV, HPMPC, GCV y BVDU. Para cada compuesto, se muestra la CE<sub>50</sub> y CE<sub>100</sub> obtenidas con sus respectivos DE. Para CE<sub>50</sub> con diferente letra en superíndice se indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, CE<sub>50N</sub> p = 0,00261 y CE<sub>50T</sub> p = 0,012).

GCV ( $CE_{50N}= 0,18 \mu\text{g/ml}$ ,  $CE_{50T}= 0,05 \mu\text{g/ml}$ ) y BVDU ( $CE_{50N}= 0,3 \mu\text{g/ml}$ ,  $CE_{50T}= 0,036 \mu\text{g/ml}$ ) resultaron los compuestos más eficientes en reducir el número y el tamaño de placas de lisis de EHV-3 en un 50%. HPMPc mostró una eficacia intermedia ( $CE_{50N}= 8,90 \mu\text{g/ml}$  y  $CE_{50T}= 0,67 \mu\text{g/ml}$ ), mientras que ACV resultó ser el compuesto menos eficiente en reducir los parámetros evaluados ( $CE_{50N}= 15,74 \mu\text{g/ml}$  y  $CE_{50T}= 5,82 \mu\text{g/ml}$ ).

ACV, HPMPc y GCV fueron capaces de inhibir el 100% del efecto viral (número y tamaño de placas de lisis), pero BVDU no logró alcanzar la  $CE_{100}$  para ninguno de los parámetros evaluados, con concentraciones de hasta  $100 \mu\text{g/ml}$  (Figura 5.9). Por estas razones, se excluyó del estudio al compuesto BVDU y se continuó con la evaluación *in vitro* de ACV, HPMPc y GCV

Al realizar un ANOVA para la  $CE_{50N}$  y la  $CE_{50T}$  de estos tres compuestos, GCV resultó el compuesto más eficiente en reducir la replicación del virus en un 50% respecto del número de placas, mientras que ambos, GCV y HPMPc, fueron los más eficientes en reducir en un 50% el tamaño de las placas de lisis.

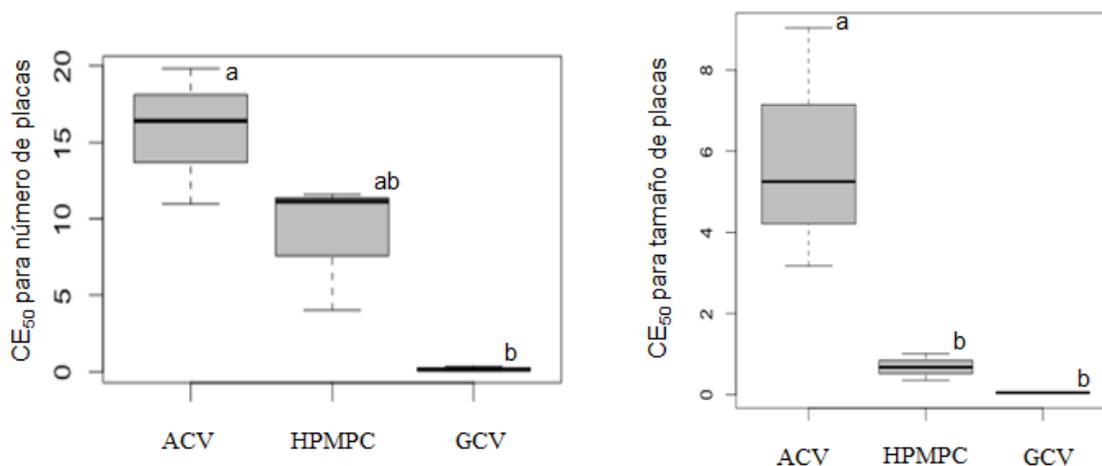


Diagrama 5.3: “Box and whisker” para la  $CE_{50}$  de número de placas (ANOVA de una vía,  $p = 0,00261$ ) y  $CE_{50}$  de tamaño de placas (ANOVA de una vía,  $p = 0,012$ ) de lisis, frente al tratamiento con ACV, HPMPc y GCV  $CE_{50N}$  y de  $CE_{50T}$

De este análisis se desprende, que el compuesto con actividad antiviral contra EHV-3 significativamente mayor, tanto para número como para tamaño de placas, fue GCV, seguido de HPMPc y por último ACV (Diagrama 5.3, Figura 5.10). Los tres compuestos fueron más eficientes en reducir el tamaño que el número de las placas de lisis inducidas por EHV-3. No se observaron efectos tóxicos sobre las células, incluso en concentraciones tan elevadas como  $100 \mu\text{g/ml}$ .

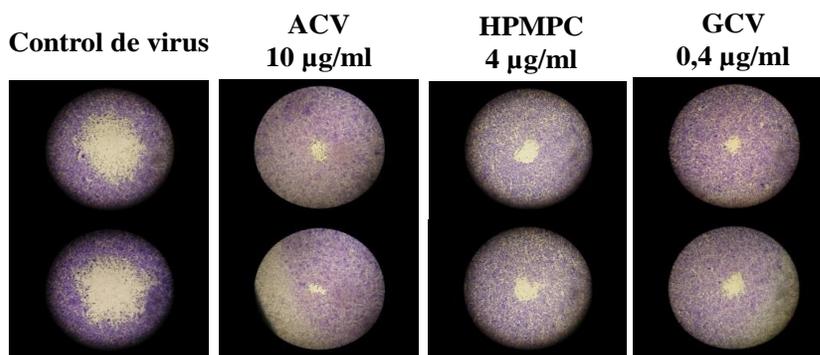


Figura 5.10: Células EDerms fijadas y teñidas con CV 0,1% en formol 10%. Se muestran 2 fotografías de placas de lisis producidas por la infección con EHV-3 de células, sin tratamiento (control de virus), y tratadas con ACV 10 µg/ml, HPMPC 4 µg/ml y GCV 0,4 µg/ml.

### 5.2.2 Ensayos dosis-respuesta de compuestos antivirales naturales ( $\lambda$ -carragenanos) contra EHV-3 en cultivos celulares

La  $CE_{50}$  para el número de placas de lisis de los  $\lambda$ -carragenanos fue 6,22 µg/ml, pero la  $CE_{100}$  no pudo ser determinada incluso utilizando concentraciones de hasta 1 g/ml del compuesto (Figura 5.11 y Figura 5.12).

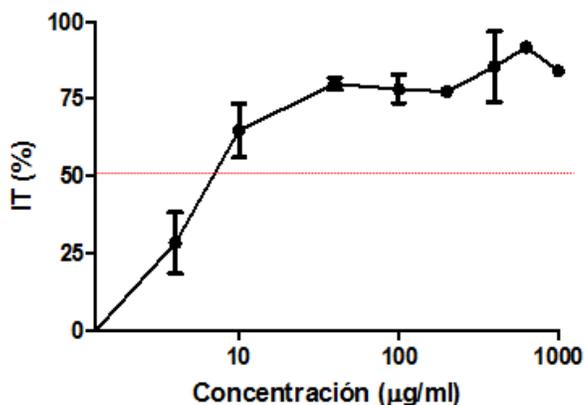


Figura 5.11: Dosis-respuesta para número de placas de lisis en presencia de  $\lambda$ -carragenanos.

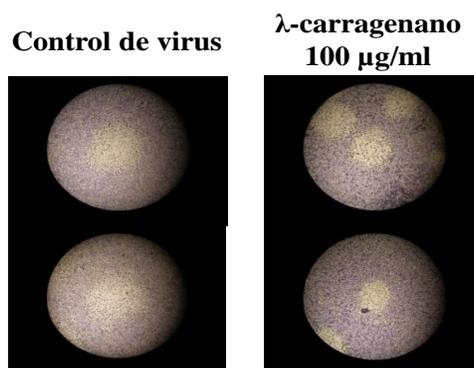


Figura 5.12: Células EDerm fijadas y teñidas con CV 0,1% en formol 10%. Se observan 2 fotografías de placas de lisis producidas por la infección con EHV-3, sin tratamiento (control de virus) y tratadas con  $\lambda$ -carragenanos 100 $\mu$ g/ml.

A partir de estos resultados, y aplicando el mismo criterio considerado para el compuesto sintético BVDU, los  $\lambda$ -carragenanos fueron excluidos de posteriores estudios.

### **5.2.3 Ensayos comparativos de distintas concentraciones de los compuestos antivirales sintéticos sobre la producción de EHV-3 en cultivos celulares, por qPCR y DICT50%/ml**

Los compuestos ACV, HPMPC y GCV, inhibieron totalmente la replicación de EHV-3 a las 72 h post-infección (pi), al menos en una de las concentraciones analizadas. En la Figura 5.13 se muestra la producción de virus (por qPCR y por DICT50%/ml) a los distintos tiempos pi, obtenida mediante el tratamiento con distintas concentraciones estos tres compuestos.

Con 20  $\mu$ g/ml de ACV, 2  $\mu$ g/ml de HPMPC y 0,5  $\mu$ g/ml de GCV se obtiene un 98% de IPV a las 48 h y un 99% a las 72 h pi, por qPCR. Concentraciones menores de ACV (5  $\mu$ g/ml) y GCV (0,05  $\mu$ g/ml) producen un 97% y 96% de IPV, respectivamente, a las 72 h pi. En cuanto a la producción viral calculada por DICT50%/ml, se obtiene una IPV del 98% a las 48 h con 0,05  $\mu$ g/ml de GCV; y del 100% con 5  $\mu$ g/ml de ACV y 2  $\mu$ g/ml de HPMPC.

Al realizar un ANOVA factorial de medidas repetidas en el tiempo, se determinó que las concentraciones de 20 y 40  $\mu$ g/ml de ACV; 2, 20 y 40  $\mu$ g/ml de HPMPC y 0,5 y 1  $\mu$ g/ml de GCV redujeron significativamente la replicación viral por qPCR, mientras que por DICT50%/ml, concentraciones menores de ACV (5  $\mu$ g/ml) y GCV (0,05  $\mu$ g/ml) también redujeron significativamente la replicación viral (Tabla 5.4).

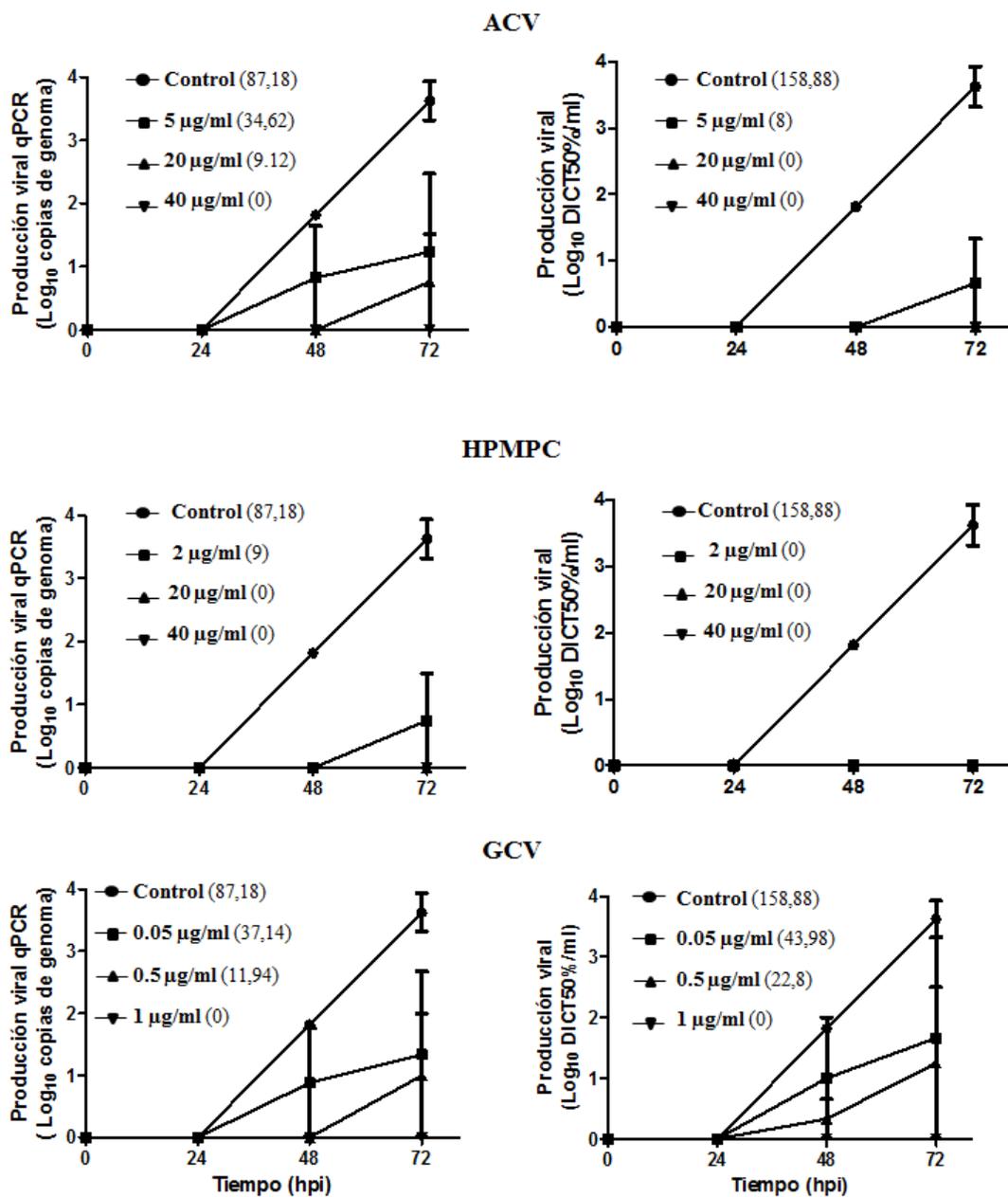


Figura 5.13: Cuantificación de la producción viral por qPCR y DICT50%/ml, en presencia de ACV, HPMPC y GCV, y en ausencia de tratamiento (control), a distintos tiempos pi. Para los tres compuestos a distintas concentraciones, el panel de la izquierda ilustra la producción viral medida por qPCR y el de la derecha, por DICT50%/ml. Entre paréntesis se muestran los resultados de AUC promedio para cada concentración de cada compuesto a lo largo del tiempo.

Compuesto	Concentración	Promedio AUC	valor p*	Promedio AUC	valor p*
		Log qPCR	qPCR	Log DICT50%/ml	DICT50%/ml
ACV	5 µg/ml	0,52	0,2416	0,17	< 0,0001
	20 µg/ml	0,19	0,0081	0	< 0,0001
	40 µg/ml	0	0,0009	0	< 0,0001
HPMPC	2 µg/ml	0,19	0,0078	0	< 0,0001
	20 µg/ml	0	0,0009	0	< 0,0001
	40 µg/ml	0	0,0009	0	< 0,0001
GCV	0,05 µg/ml	0,55	0,3496	0,66	0,0003
	0,5 µg/ml	0,25	0,0154	0,39	< 0,0001
	1 µg/ml	0	0,0009	0	< 0,0001
Control virus (+)	-	1,36	-	2,22	-
Control células (-)	-	0	0,0009	0	< 0,0001

Tabla 5.4: Análisis de varianza factorial de medidas repetidas en el tiempo ( $p < 0,05$ ) para el AUC de ACV, HPMPC y GCV, cada uno a distintas concentraciones. \*El valor p que figura en la tabla para las distintas concentraciones de cada compuesto fue determinado contra el virus sin tratamiento (control de virus, +).

La concentración óptima de cada compuesto para ser utilizadas en los ensayos frente a seis cepas de campo de EHV-3 *in vitro*, fue establecida como aquella que produjo más de un 95% IPV en cultivos celulares infectados con EHV-3 a las 72 h pi. Se utilizaron entonces, 5 µg/ml de ACV, 2 µg/ml de HPMPC y 0,05 µg/ml de GCV.

#### **5.2.4 Comparación de la eficacia de ACV, HPMPC y GCV frente a cepas de campo de EHV-3.**

La susceptibilidad de los seis aislamientos de EHV-3 frente al tratamiento con 5 µg/ml de ACV, 2 µg/ml de HPMPC y 0,05 µg/ml de GCV fue concordante con los resultados previamente obtenidos para la cepa viral de trabajo, E/9283/07 C3A.

En cuanto al tamaño de las placas de lisis, se demostró que existe interacción entre los compuestos analizados y las cepas de campo evaluadas (ANOVA de dos vías,  $p = 0,0048$ ). Por esta razón, el efecto de los tres compuestos sobre el tamaño de placas fue estudiado de manera independiente para cada cepa (Figura 5.14). Para las cepas 1, 2 y 5, los tres compuestos redujeron significativamente el tamaño de las placas de lisis (ANOVA de dos vías,  $p < 0,05$ ). En el caso de la cepa 3, se observó una inhibición, la cual no fue significativa, mientras que para las cepas 4, 6 y control, sólo ACV (5 µg/ml) demostró una reducción significativa del tamaño de placas (ANOVA de dos vías,  $p < 0,05$ ).

En el caso de la reducción del número de placas y de la producción de virus determinada por qPCR, no se observó interacción entre las cepas de campo y los

compuestos antivirales (Figura 5.15 y Figura 5.16, respectivamente). ACV y GCV fueron los compuestos más eficientes en reducir significativamente el número de placas (ANOVA de dos vías,  $p < 0,0001$ ), pero sólo ACV resultó el compuesto más eficiente en reducir significativamente la replicación viral a las 48 h, seguido de GCV y HPMPc (ANOVA de dos vías,  $p = 0,0002$ ).

En la Tabla 5.5 se muestra una síntesis de los resultados obtenidos al evaluar la eficiencia de los tres compuestos antivirales frente a distintas cepas de campo de EHV-3. Si bien ACV y GCV, mostraron ser eficaces en inhibir el número y tamaño de las placas de lisis y la producción de ADN viral, GCV resultó ser más eficiente al requerir menor concentración, 0,05 µg/ml, para obtener similar resultado que con 5 µg/ml de ACV.

	<b>ACV</b> <b>5 µg/ml</b>	<b>GCV</b> <b>0,05 µg/ml</b>	<b>HPMPC</b> <b>2 µg/ml</b>
<b>%IT</b>	84-100%	84-92%	76-85%
<b>%IN</b>	76-96%	58-93%	13-47%
<b>%IPV a las 48 h.</b>	88-100%	87-100%	58-100%

Tabla 5.5: Eficiencia de los compuestos antivirales analizados *in vitro*, frente a la infección de cultivos celulares con diversas cepas de campo de EHV-3. Los valores se expresan en porcentaje de inhibición de la replicación viral medida en términos de %IT, %IN y %IPV. %IT: Porcentaje de inhibición del tamaño de placas de lisis; %IN: porcentaje de inhibición del número de placas de lisis; %IPV: porcentaje de inhibición de la producción de virus.

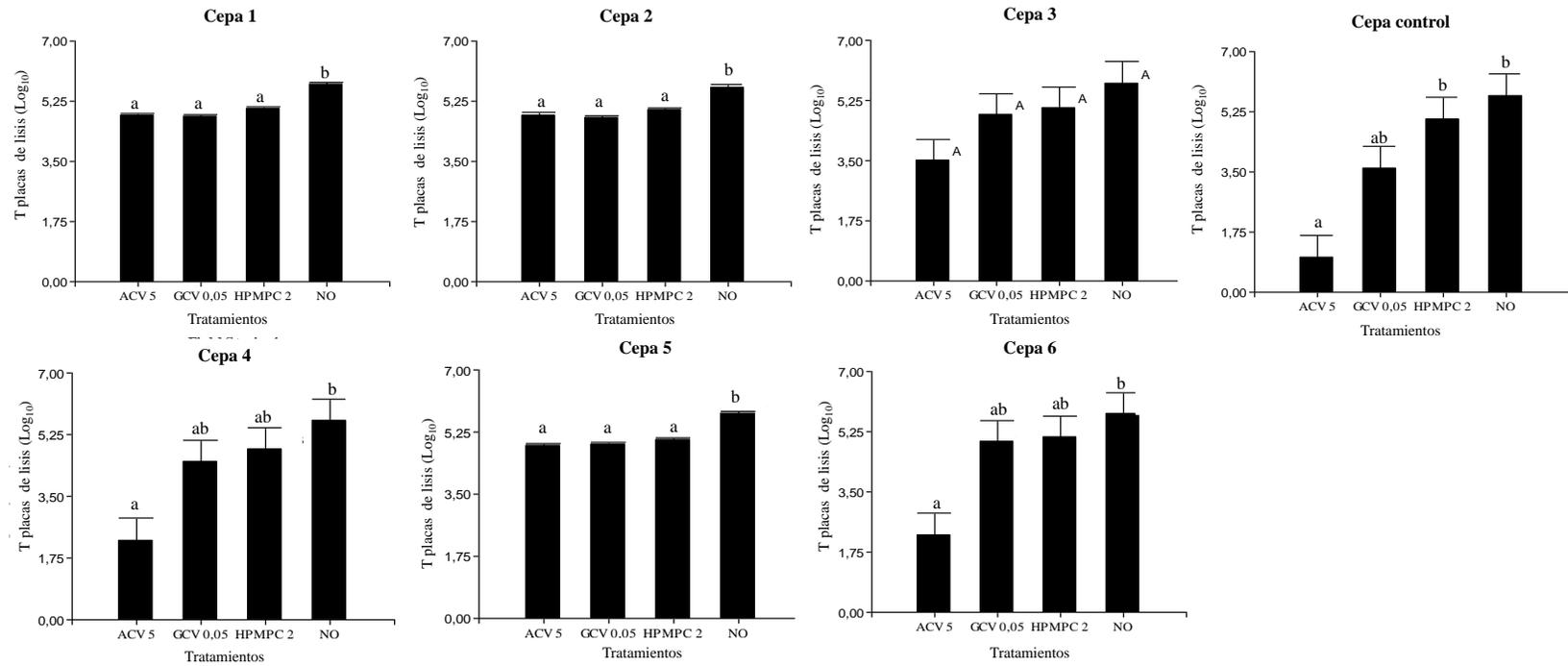


Figura 5.14: Efecto de ACV 5 µg/ml (ACV 5), GCV 0,05 µg/ml (GCV 0,05) y HPMP 2 µg/ml (HPMP 2) sobre el tamaño (T) de las placas de lisis inducidas por la infección de células EDerm con distintas cepas de campo de EHV-3 (n: 6) y una cepa control (E/9283/07 C3A). Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula sobre las columnas (ANOVA de dos vías; Test de Tukey; p < 0,05).

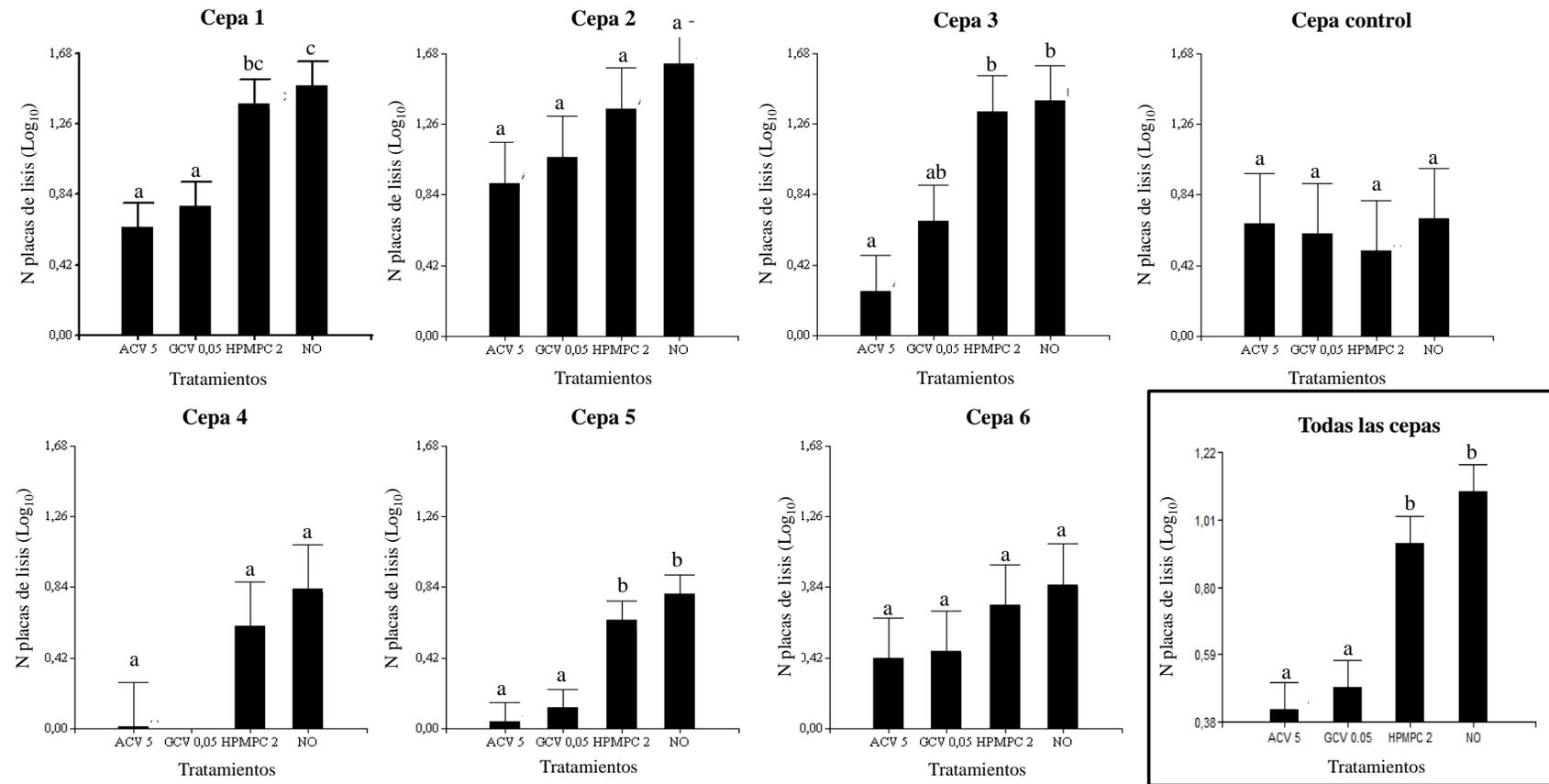


Figura 5.15: Efecto de ACV 5  $\mu\text{g/ml}$  (ACV 5), GCV 0,05  $\mu\text{g/ml}$  (GCV 0,05) y HPMPC 2  $\mu\text{g/ml}$  (HPMPC 2) sobre el número (N) de placas de lisis inducidas por la infección de células EDerm con distintas cepas de campo de EHV-3 (n: 6) y una cepa control (E/9283/07 C3A). Se muestra en un recuadro el efecto promedio de los tratamientos sobre las 6 cepas de campo y la cepa control. Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula sobre las columnas (ANOVA de dos vías; Test de Tukey;  $p < 0,0001$ ).

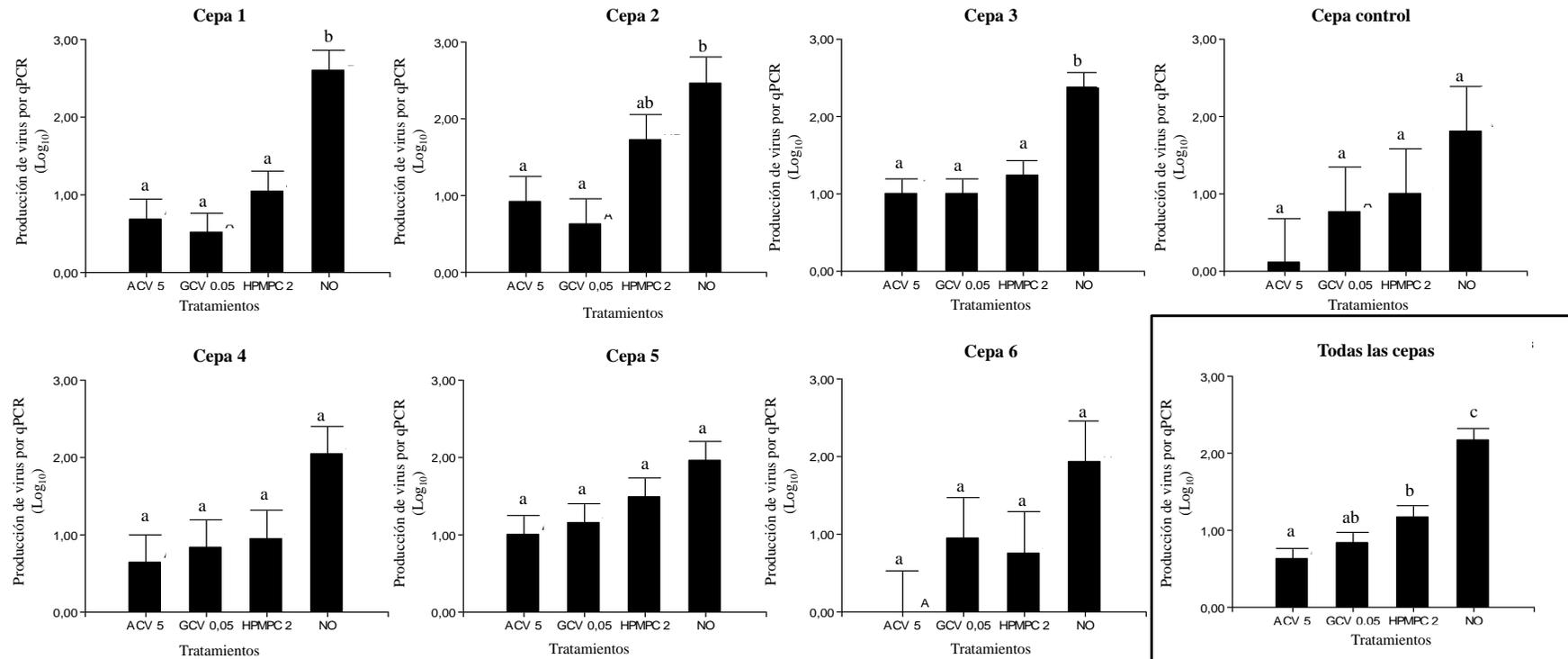


Figura 5.16: Efecto de ACV 5 µg/ml (ACV 5), GCV 0,05 µg/ml (GCV 0,05) y HPMPFC 2 µg/ml (HPMPFC 2) sobre la producción de virus determinada por qPCR en células EDerm infectadas con distintas cepas de campo de EHV-3 (n: 6) y una cepa control (E/9283/07 C3a). Se muestra en un recuadro el efecto promedio de los tratamientos sobre las 6 cepas de campo y la cepa control. Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula sobre las columnas (ANOVA de dos vías; Test de Tukey; p < 0,05).

**CAPÍTULO 3**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE GANCICLOVIR PARA LA PREVENCIÓN Y**

**EL TRATAMIENTO DE ECE EN YEGUAS INFECTADAS EN FORMA**

**EXPERIMENTAL CON EHV-3**

### 5.3.1 Infección experimental con EHV-3

Todas las yeguas incluidas en este ensayo recibieron una dosis viral homogénea (ANOVA de una vía,  $p < 0,0001$ ), como quedó demostrado mediante la titulación del volumen residual de los inóculos administrados a cada individuo y expresado como el promedio de los cuatro animales de cada grupo (Tabla 5.6).

Grupo	Inóculo residual	
	qPCR	DICT50%/ml*
C	$10^{5,96}$	$10^{6,22}$
P <sub>4</sub>	$10^{6,09}$	$10^{6,36}$
P <sub>4/24</sub>	$10^{5,96}$	$10^{6,22}$
T <sub>GCV</sub>	$10^{6,05}$	$10^{6,32}$
T <sub>P</sub>	$10^{6,02}$	$10^{6,28}$

Tabla 5.6: Títulos promedios del inóculo administrado a cada grupo determinados por qPCR, expresados en  $\text{Log}_{10}$ , y estimados por DICT50%/ml. \*DICT50%/ml fue estimado por la ecuación de la recta  $\text{Log}_{10} \text{DICT50}\% \frac{\text{ml}}{\text{ml}} = 1,17 \text{Log}_{10} \text{qPCR} - 0,76$ , con un R<sup>2</sup> de 0,88 (ANOVA de una vía,  $p < 0,0001$ ).

### 5.3.2 Lesiones y cuadro clínico

Luego del desafío viral, todas las yeguas desarrollaron lesiones típicas de ECE (pápulas, vesículas, pústulas y úlceras), y ninguna de ellas mostró signos clínicos de enfermedad sistémica (apatía, anorexia o decaimiento). Dichas lesiones, comenzaron a observarse en los 5 grupos entre el día 1 y 2 post-infección (pi) y las mismas se extendieron hasta el día 19 pi en los grupos P<sub>4</sub>, T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub>, hasta el día 21 pi en el grupo C y hasta el día 28 pi en el grupo P<sub>4/24</sub> (Figura 5.18).

Para el grupo C, la severidad del cuadro clínico, expresada como “score”, fue aumentando en forma progresiva desde el día 1 hacia el 8 pi, momento en el que se registró un valor de “score” de 11, alcanzando el máximo el día 12 pi con 11,25. A partir de este día, la severidad de las lesiones fue disminuyendo hasta la resolución completa (cicatrización) el día 21 pi (Figura 5.18).

Para los grupos tratados en forma preventiva (P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>), el patrón de severidad de las lesiones fue variable. El grupo P<sub>4</sub>, alcanzó el valor máximo el día 8 pi con un “score” de 8,25, alcanzando la resolución completa hacia el día 19 pi. Es importante destacar que al día 12 pi la severidad del cuadro clínico de este grupo, se redujo 1,87 veces respecto a la severidad del grupo C (ANOVA de una vía,  $p = 0,033$ ). En términos clínicos, la severidad

del cuadro disminuyó a la mitad entre el grupo C y el P<sub>4</sub> al día 12 pi. Contrariamente, para el grupo P<sub>4/24</sub>, la severidad de las lesiones fue elevada al día 8 (“score”= 8,25) pero se alcanzó el valor máximo al día 12 pi con un “score” de 9,25, que luego disminuyó a 0 hacia el día 28 pi (Figura 5.18).

En el caso de los grupos tratados una vez detectada la manifestación clínica de ECE (terapéuticos, T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub>), ambos grupos mostraron su máxima expresión clínica el día 8 pi (Figura 5.18). Ese mismo día, la puntuación máxima detectada para el grupo T<sub>GCV</sub> (“score”= 10,75) fue menor que aquella registrada para el grupo T<sub>P</sub> (“score”= 12), y la severidad de las lesiones fue 1,7 y 1,2 veces menor en estos grupos, T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub>, respectivamente, que en el grupo C, pero en ninguno de los casos las diferencias fueron significativas (Figura 5.18) (ANOVA de una vía, p= 0,3459). Hacia el día 19 pi, ambos grupos resolvieron las lesiones (“score”= 0).

Al comparar el “score” clínico medido como el área promedio bajo la curva (AUC) de los 5 grupos entre sí, a lo largo del tiempo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados en forma preventiva (P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>), los tratados en forma terapéutica (T<sub>P</sub> y T<sub>GCV</sub>) y el grupo C (Diagrama 5.6). (ANOVA de una vía; p= 0,322).

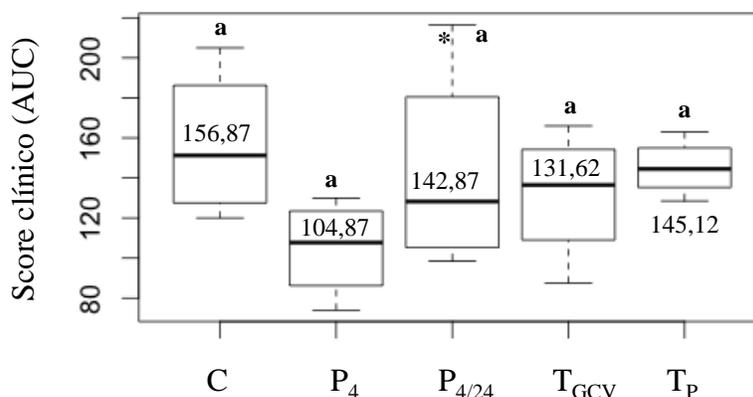


Diagrama 5.4: “Box and whisker” del AUC para el “score” clínico global en los 5 grupos analizados. No se observó diferencia significativa entre los grupos (ANOVA de una vía, p = 0,322). El \* muestra el valor del AUC para la yegua 6 (AUC = 216,50).

Pero, al analizar los datos individuales de AUC para el “score” de cada animal, se observó que la yegua 6 (grupo P<sub>4/24</sub>), mostró un valor de AUC= 216,50, muy por encima de la media de cada grupo, incluido el grupo control (Diagrama 5.4). Se decidió entonces excluir a este animal del análisis estadístico, y realizar el análisis nuevamente agrupando a las yeguas de los grupos controles (G1= C y T<sub>P</sub>, n= 8) y las yeguas de los grupos preventivos (G2= P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>, n= 7). En este análisis, se encontraron diferencias

significativas en la severidad total de las lesiones entre los animales controles y aquellos tratados en forma preventiva (ANOVA de una vía,  $p= 0,0088$ ) (Diagrama 5.5).

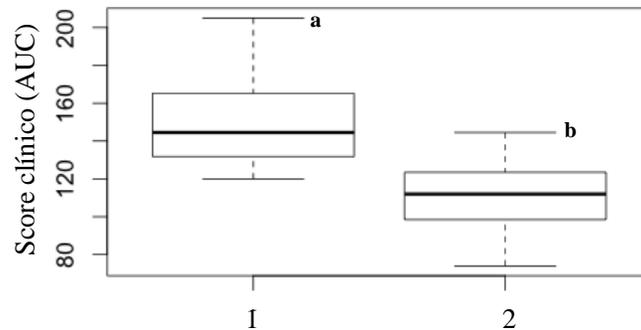


Diagrama 5.5: “Box and whisker” del AUC del “score” clínico global, de los grupos control y preventivos, excluida la yegua 6. Las diferencias significativas se muestran en letras (ANOVA de una vía,  $p = 0,0088$ ). 1: grupos control (C y T<sub>P</sub>), 2: grupos tratados de forma preventiva (P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>).

A su vez, se comparó la severidad total de las lesiones en términos de AUC para el “score” de los controles (G1 = C y T<sub>P</sub>), los tratamientos preventivos (G2 = P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>) y el grupo tratado terapéuticamente, T<sub>GCv</sub>. Se observó diferencia significativa en el “score” total entre animales no tratados (C y T<sub>P</sub>) y tratados de manera preventiva (P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>). Mientras que el grupo tratado en forma terapéutica, T<sub>GCv</sub>, presentó una severidad intermedia durante la manifestación clínica de ECE ( $p= 0,034$ ) (Diagrama 5.6).

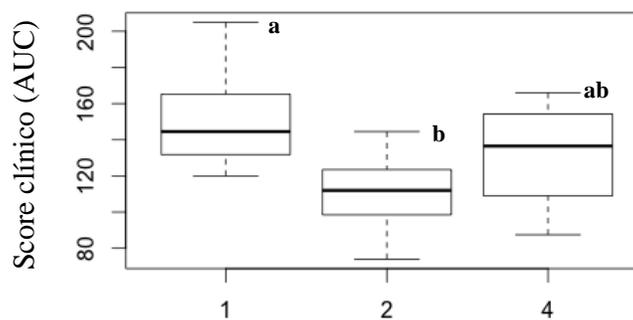


Diagrama 5.6: “Box and whisker” del AUC del “score” clínico global, de los grupos control, preventivos y terapéutico. Las diferencias significativas en el “score” global se muestran en letras ( $p = 0,034$ ). 1: grupos control (C y T<sub>P</sub>); 2: grupos tratados de manera preventiva (P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>); 4: grupo tratado en forma terapéutica (T<sub>GCv</sub>).

Otro parámetro registrado fue la temperatura rectal de los animales bajo estudio (Figura 5.18), definiendo como hipertermia valores por encima de 38,2°C.

Los valores basales (promedios por grupo) en el día de inicio de la experiencia (día 0) fueron 37,7°C para los grupos C, P<sub>4</sub> y T<sub>GCV</sub>, 37,9°C para el grupo T<sub>P</sub> y 38°C para el grupo P<sub>4/24</sub>.

En el grupo C, se registraron dos picos de hipertermia, uno el día 4 pi de 38,6°C que luego descendió a los valores normales, y el otro el día 12 pi de 38,5°C. Este segundo aumento en la temperatura corporal, coincidió con el valor máximo de “score” y de excreción viral en este grupo.

En el grupo P<sub>4</sub>, se registró un aumento en la temperatura rectal a 38,3°C entre los días 12 y 16 pi; mientras que en el grupo P<sub>4/24</sub>, el aumento de la temperatura por encima de los valores normales fue hacia el día 12 pi (38,4°C) los cuales se mantuvieron hasta el día 23 pi (38,3°C). Se puede observar que el aumento de la temperatura en este grupo se asoció con el registro de “score” máximo (día 12 pi), y con la extensión del cuadro clínico.

De manera similar al grupo C, el grupo T<sub>GCV</sub> mostró dos picos de hipertermia durante la experiencia. El pico inicial ocurrió en el día 4 pi, el cual fue menor (38,3°C) comparado con el segundo ocurrido el día 12 pi, en el cual se registró una temperatura máxima de 38,7°C. Por último, para el grupo T<sub>P</sub>, se registró un aumento de la temperatura rectal desde el día 16 pi hasta el 23 pi, con un pico máximo de 38,4°C el día 20 pi.

Antes y después de los días mencionados para cada grupo, los valores de temperatura se mantuvieron dentro de los parámetros normales.

### **5.3.3 Excreción viral**

La excreción de virus (expresado en copias de genoma) en las muestras de hisopados perineales-vaginales (HPV) de los 5 grupos, se muestra en la Figura 5.18. Es importante destacar que los valores detectados en el día 1 podrían corresponder a virus residual del inóculo.

Para el grupo C, los valores de excreción viral alcanzaron su valor máximo al día 12 pi ( $10^{7,21}$  copias de genoma) y a partir de ese día comenzaron a disminuir, hasta hacerse indetectable el día 28 pi. Sin embargo, hacia el día 20 pi, la excreción viral de este grupo se encontró, por debajo del punto de corte determinado para la qPCR ( $10^{2,93}$  copias de genoma).

En el caso de los grupos tratados de manera preventiva (P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>), para el día 4 pi, se observó que la excreción de ambos grupos (P<sub>4</sub>=  $10^{5,20}$  y P<sub>4/24</sub>= $10^{5,57}$ ) se redujo en un logaritmo respecto de aquella registrada en el grupo C ( $10^{6,58}$ ), pero al día de máxima

excreción (12 pi) no se observó diferencia significativa entre los mismos ( $P_4 = 10^{6,7}$  y  $P_{4/24} = 10^{7,21}$ ) comparados con el grupo C ( $10^{7,21}$ ). Los valores de excreción viral detectados por qPCR para el grupo  $P_4$  se encontraron por debajo del punto de corte determinado para este ensayo hacia el día 16 pi (5.1.3.c), mientras que para el grupo  $P_{4/24}$ , eso sucedió hacia el día 20 pi. En este grupo, es importante destacar que la extensión del período de excreción viral concuerda con la extensión del cuadro clínico y la hipertermia observada.

Analizando la excreción viral total en términos de AUC, y corrigiendo los valores de copias de genoma obtenidos en relación al punto de corte establecido ( $10^{2,93}$ ), si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados en forma preventiva y el control, el grupo  $P_4$  presentó una reducción de 1,4 veces en el AUC total de excreción (medido en copias de genoma) respecto del grupo C, mientras que el  $P_{4/24}$  presentó una excreción similar al control.

Para los grupos tratados en forma terapéutica ( $T_{GCV}$  y  $T_P$ ), se observó que ambos grupos excretan títulos similares de virus ( $T_{GCV} 10^{6,11}$  y  $T_P 10^{6,39}$ ) a los 4 días pi, pero luego, en el grupo  $T_{GCV}$  la excreción comienza a disminuir, mientras que en el grupo  $T_P$  (al igual que en el grupo C), la excreción aumenta hasta llegar a su punto máximo el día 12 pi, encontrándose diferencia significativa entre el grupo  $T_{GCV}$  ( $10^{2,93}$ ) y los grupos  $T_P$  ( $10^{6,1}$ ) y C ( $10^{6,5}$ ) (ANOVA de una vía,  $p = 0,0137$ ).

En referencia al AUC de excreción total corregido por el punto de corte de la qPCR, se observó una disminución significativa entre el grupo  $T_{GCV}$  y los controles ( $T_P$  y C) (ANOVA de una vía,  $p = 0,0294$ ) (Figura 5.17).

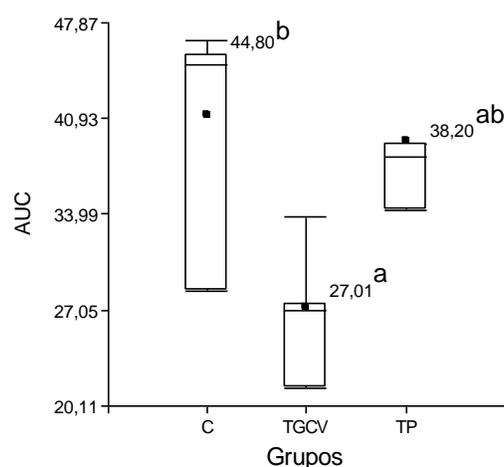


Figura 5.17: Área bajo la curva total de excreción viral determinada por qPCR y corregida por el punto de corte ( $10^{2,93}$  copias de genoma). Para cada grupo, se muestran las medias de AUC

obtenidas. Con diferentes letras se muestran las diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p = 0,0294$ ).

Por otra parte, los grupos que recibieron el tratamiento terapéutico tuvieron un período de re-excreción viral asintomática al final de la experiencia. En el grupo  $T_{GCV}$ , que había resuelto la infección hacia el día 12 pi una de las yeguas (identificación: 5) volvió a excretar virus el día 36 ( $10^{3,94}$  copias de genoma). De la misma manera, para el grupo  $T_P$ , en donde la excreción se había resuelto hacia el día 16, en los días 23 y 36 pi se detecta un animal (identificación= 15) con excreción viral elevada.

#### **5.3.4 Infectividad del virus, previamente detectado por qPCR en los hisopados de las yeguas bajo estudio**

A partir de las muestras de HPV tomadas a distintos tiempos pi, se realizó un ensayo de infectividad en células para determinar si la detección de copia de genoma viral por qPCR se correspondía con la presencia de virus infectivo (Figura 5.19). Para el grupo C, el 100% de las yeguas excretaron virus infectivo entre el día 1 y 12 pi, al día 20 pi sólo un 25%, y a partir del día 23 pi no se detectaron animales que excretaran virus infectivo.

Para el grupo  $P_4$ , el período de excreción de virus con capacidad de infectar células, abarcó desde el día 1 al 12 pi. Al día 16 pi, se observaron diferencias en la infectividad con respecto al grupo C, y diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p = 0,0306$ ) con el grupo  $P_{4/24}$ , ya que ningún animal del grupo  $P_4$  excretaba virus infectivo en ese momento.

En el grupo  $P_{4/24}$ , se detectaron animales que excretaban virus infectivo desde el día 1 pi, y el 100% de los animales excretaron virus entre los días 2 y 12 pi, disminuyendo luego este porcentaje hasta el día 23 pi.

Los animales del grupo  $T_{GCV}$ , excretaron virus infectivo entre el día 1 y 8 pi, mientras que al día 12 no se registraron animales positivos. Esta diferencia fue significativa al comparar este grupo con los grupos C y  $T_P$  (ANOVA de una vía  $p = 0,0005$ ), en los cuales se observó al mismo día un 100% de infectividad. Al día 16 pi, si bien se observan diferencias con estos mismos grupos, las mismas no son significativas, ya que para esta fecha los tres grupos se encuentran resolviendo la infección. Al día 36 pi, se registró nuevamente un animal positivo en este grupo, resultado que corrobora la excreción viral detectada por qPCR.

Por último, y de la misma manera que el grupo C, el 100% de los animales del grupo T<sub>P</sub> excretó virus infectivo entre los días 1 y 12 pi, pero a diferencia de lo ocurrido en el grupo C (75%), al día 16 sólo un 25% resultaron positivos. No se detectó excreción de virus infectivo durante los días 20 y 28 en ninguno de los animales, pero los días 23 y 36 se registró un 25% de animales que excretaban virus infectivo, coincidiendo nuevamente con los resultados de excreción viral determinados por qPCR.

### **5.3.5 Respuesta de anticuerpos neutralizantes inducida por la infección por EHV-3**

Todas las yeguas incluidas en el estudio desarrollaron una respuesta específica de anticuerpos neutralizantes contra EHV-3 luego de la infección experimental (Figura 5.18). A los 7 días pi, los grupos C y P<sub>4</sub> seroconvirtieron con un aumento significativo de anticuerpos (1,15 y 1,2, respectivamente) al compararlos con el grupo P<sub>4/24</sub>, en el cual sólo el 25% (1/4) de las yeguas respondió con un título bajo (0,90).

Con respecto a los grupos tratados en forma terapéutica (T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub>), también se observa una diferencia, aunque no significativa, en la respuesta de anticuerpos. El grupo T<sub>GCV</sub> (1,01) presentó una respuesta 0,87 veces más baja que el grupo C (1,15), mientras que el grupo placebo (T<sub>P</sub>) desarrolló una respuesta superior al control (1,31).

El pico en la respuesta de anticuerpos se registró en todos los grupos hacia el día 14 pi, donde los títulos (medias por grupo) variaron entre 2,63 y 2,71. A partir esta fecha, los títulos de anticuerpos alcanzados por el grupo C (2,71) y los grupos P<sub>4</sub>, T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub> (2,63), se mantuvieron en órdenes similares hasta el día 28 pi. Sin embargo, para el grupo P<sub>4/24</sub>, entre los días 21 y 28 pi se observa una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el título de anticuerpos comparado con el grupo C.

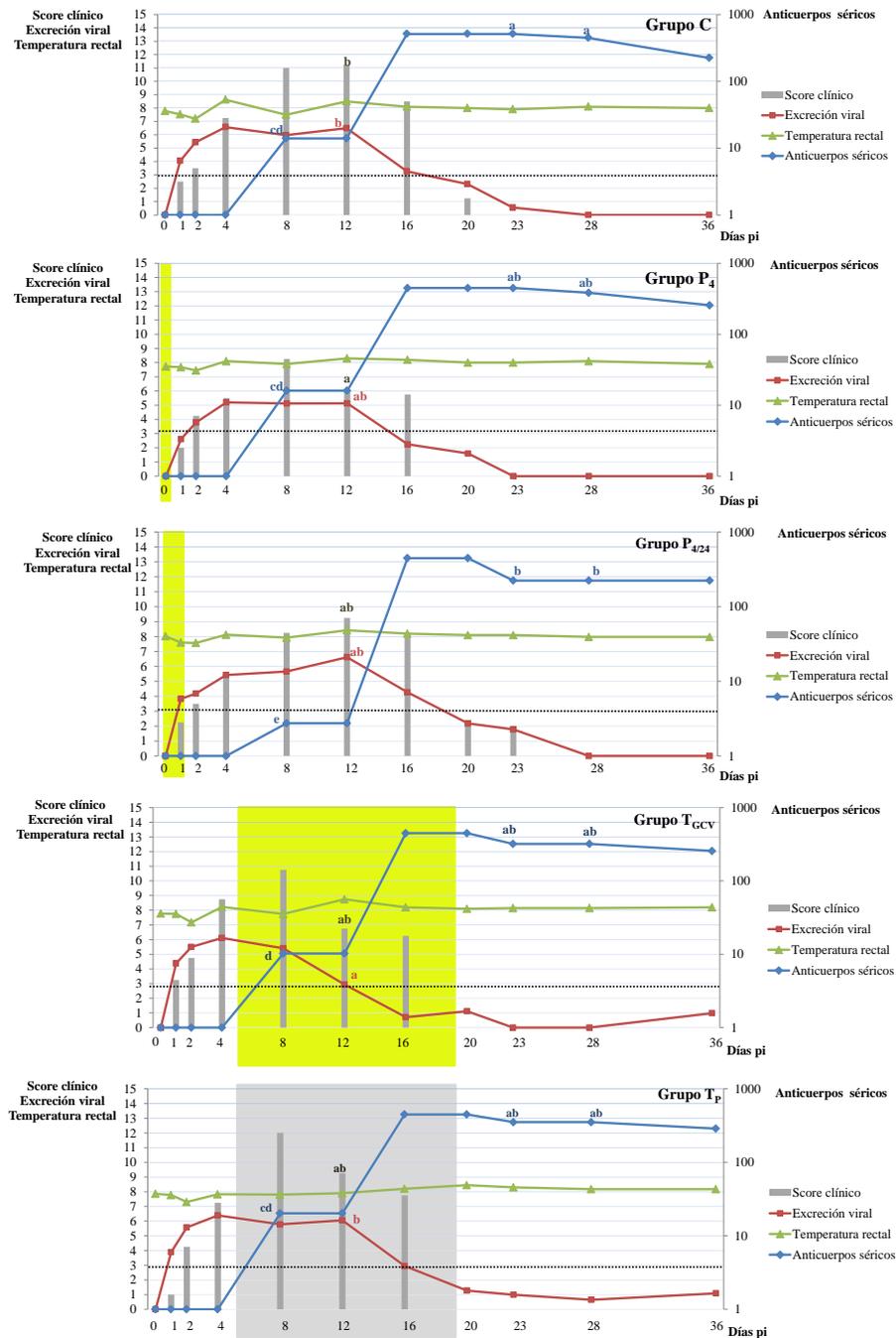


Figura 5.18: Evolución del ECE en yeguas infectadas con EHV-3 sin la aplicación de un tratamiento (grupo C), tratadas de manera preventiva (grupos P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>) y tratadas de manera terapéutica (T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub>). En el eje vertical primario se grafica el “score” clínico (valor absoluto), la excreción viral medida en copias de genoma por qPCR y la temperatura rectal en °C, donde 0 es igual a 30°C y 15 es igual a 45°C. El recuadro coloreado marca la duración del tratamiento: en color verde representa el uso de GCV 0,01% p/p en la crema y en color gris representa a la crema placebo (sin GCV). Las diferencias significativas se muestran en imprenta minúscula, para el “score” al día 12 pi en gris (ANOVA de una vía, p = 0,033), para la excreción viral al día 12 en color rojo (ANOVA de

una vía,  $p= 0,0137$ ) y para la respuesta de anticuerpos a los días 7, 23 y 28 pi en color azul (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ).

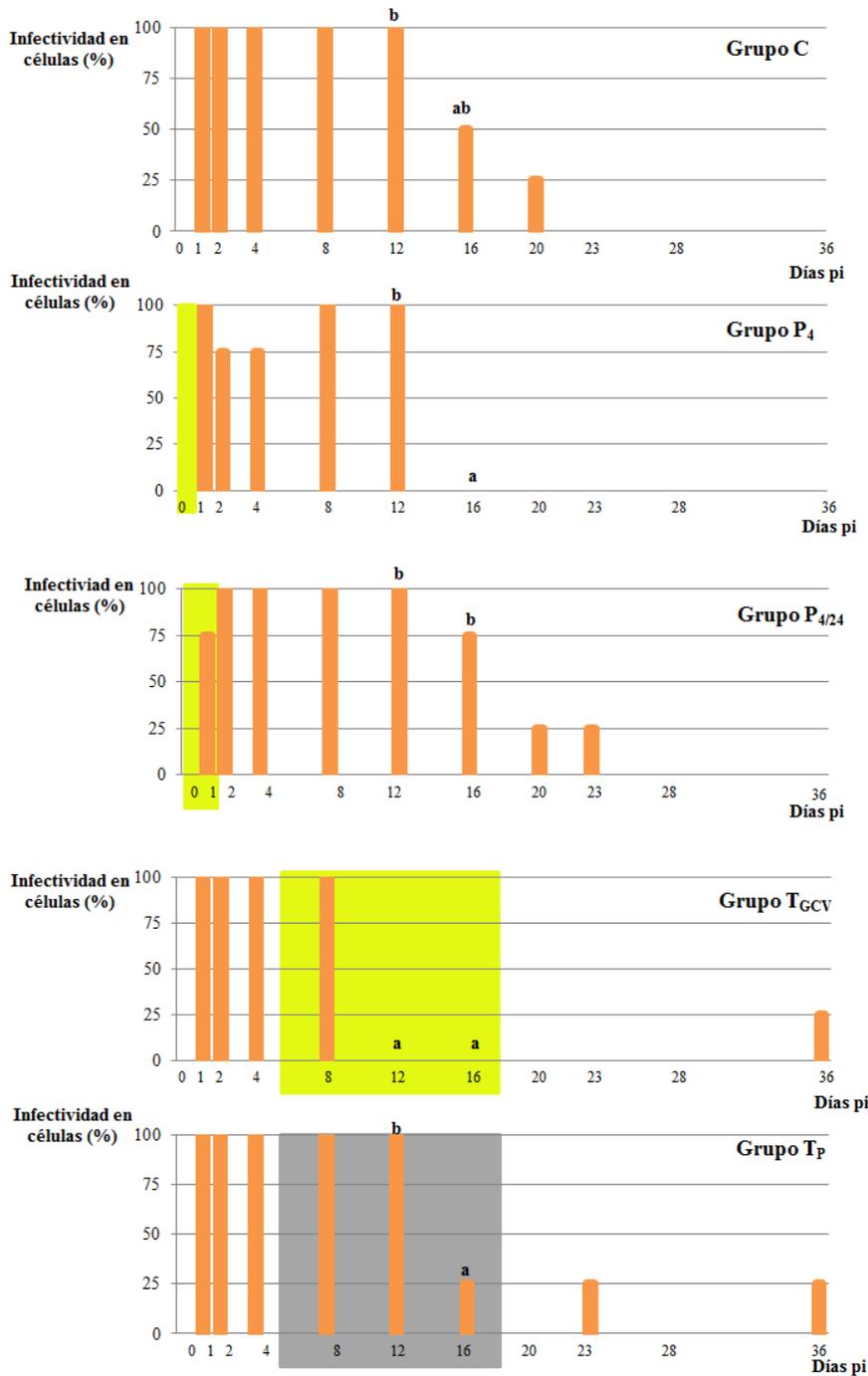


Figura 5.19: Infectividad de los HPV, tomados de yeguas infectadas con EHV-3 sin la aplicación de un tratamiento (grupo C), tratadas de manera preventiva (grupos P<sub>4</sub> y P<sub>4/24</sub>) y tratadas de manera terapéutica (T<sub>GCV</sub> y T<sub>P</sub>) y expresada en porcentaje de yeguas del grupo que excretan virus. Las barras indican el porcentaje de yeguas por grupo que excretan virus con capacidad de infectar células susceptibles. Las diferencias significativas en los días 12 y 16 pi se muestran en imprenta

minúscula ( $p = 0,0005$  y  $p = 0,0306$ , respectivamente para cada día). El recuadro coloreado marca la duración del tratamiento: en color verde representa el uso de GCV 0,01% p/p en la crema y en color gris representa a la crema placebo (sin GCV).

**CAPÍTULO 4**

**ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA  
CONOCIDA COMO iPCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHV-3 A CAMPO**

### 5.4.1 Sensibilidad y especificidad analítica de la iiPCR

La iiPCR, al igual que la qPCR, detectó genoma viral en todas las réplicas de la dilución  $10^{-4}$  (3/3) y en el 60% de las de la dilución  $10^{-5}$  (2/3), no detectando genoma viral en la dilución  $10^{-6}$ . Se determinó que la técnica de iiPCR detecta hasta 2,3 partículas infecciosas de EHV-3 en sobrenadantes de cultivos (Tabla 5.7).

Diluciones de virus	UFP/ml	iiPCR				qPCR							
		R*	Índice	R*	Índice	R*	Ct	R*	Ct				
$10^{-2}$	2290,86	+	4,638	+	4,1355	NR**	NR**	+	28,5	+	28,4	+	28,5
$10^{-3}$	229,08	+	4,8651	+	3,3434	+	4,9622	+	32,16	+	31,96	+	31,82
<b><math>10^{-4}</math></b>	<b>22,91</b>	+	<b>3,5152</b>	+	<b>4,8534</b>	+	<b>3,1682</b>	+	<b>36,39</b>	+	<b>36,18</b>	+	<b>36,47</b>
$10^{-5}$	2,3	+	4,7004	+	1,7502	-	1,0781	+	39,42	+	38,21	-	ND***
$10^{-6}$	0,2	-	1,0628	-	1,0453	-	1,097	+	39,32	+	39,28	-	ND***
Control Positivo		+	4,9554			NR**					NR**		
Control Negativo		-	1,0989			NR**					NR**		

Tabla 5.7: Sensibilidad analítica de la iiPCR. En negrita se indica el límite de detección para el genoma de EHV-3. R\*: resultado; NR\*\*: no realizado; ND\*\*\*: no detectado.

El número de copias de genoma presente en las muestras analizadas mostró una distribución normal y homogeneidad de varianza, y por medio de un análisis de regresión, se observó que existe una correlación lineal entre los resultados obtenidos por la iiPCR y el título viral infeccioso presente en la muestra ( $p < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,85$ ) (Figura 5.20).

Se estableció que el punto de corte de la iiPCR corresponde a un índice de 1,188 ( $\approx 1,2$ ).

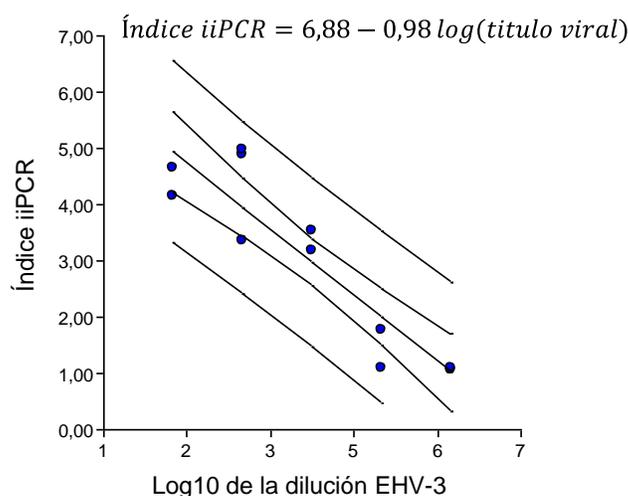


Figura 5.20: Relación entre índice de iiPCR y Log<sub>10</sub> de la dilución de EHV-3

Con respecto a la especificidad analítica de la iiPCR, todas las cepas de referencia y aislamientos de otros patógenos equinos analizados resultaron negativos tanto por iiPCR como por qPCR (Tabla 5.8; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Identificación	Patógeno	iiPCR		qPCR	
		R*	Índice	R*	Ct
HVE-1 G2254 7812	EHV-1**	-	1,13	-	ND*** ND***
E/9940/11	EHV-1	-	1,14	-	ND*** ND***
E/2487/ 1	EHV-1	-	1,13	-	ND*** ND***
E/3913/13	EHV-1	-	1,12	-	ND*** ND***
E/5798/14	EHV-1	-	1,06	-	ND*** ND***
E/6801/15	EHV-1	-	1,04	-	ND*** ND***
E/7869/16-1	EHV-1	-	1,11	-	ND*** ND***
HVE-4 171104	EHV-4**	-	1,16	-	ND*** ND***
E/9433/10-1	EHV-4	-	1,07	-	ND*** ND***
E/3675/13-2	EHV-4	-	1,03	-	ND*** ND***
E/6161/14/1	HVE-4	-	1,07	-	ND*** ND***
HVE-2 P4 30040	EHV-2**	-	1,07	-	ND*** ND***
2223012	<i>Salmonella enterica</i> sv. Abortusequi	-	1,06	-	ND*** ND***
22858	<i>Streptococcus equi</i>	-	1,11	-	ND*** ND***
21325	<i>Streptococcus equi</i>	-	1,19	-	ND*** ND***
ARVAC 95050813	AVE****	-	1,15	-	ND*** ND***
E/9728/11	AVE	-	1,12	-	ND*** ND***
<b>Control Positivo</b>		+	<b>4,85</b>		
<b>Control Negativo</b>		-	<b>1,09</b>		

Tabla 5.8: Resultados obtenidos por iiPCR y qPCR de aislamientos de campo y cepas de referencia de otros patógenos equinos. R\*: resultado; \*\*Cepas de referencia cedidas gentilmente por Dr. Dubovi, Cornell University; ND\*\*\*: No detectado; \*\*\*\*Cepa vacunal de arteritis viral equina (AVE).

**5.4.2 Detección de EHV-3 mediante iiPCR y qPCR**

Del total de muestras incluidas en la validación diagnóstica de la técnica (n=114), correspondientes a 85 muestras de hisopados, así como también cepas de referencia, controles y otros patógenos equinos, se estableció que la concordancia entre ambas metodologías fue muy buena (índice de kappa,  $\kappa = 0,982$ ).

A su vez, a partir del punto de corte establecido para la iiPCR (índice = 1,2) y mediante análisis ROC se determinó que la técnica posee una sensibilidad de 100% (IC 95%= 93,3-100%) y una especificidad de 98,36% (95% IC = 91,2-100%) (Figura 5.21).

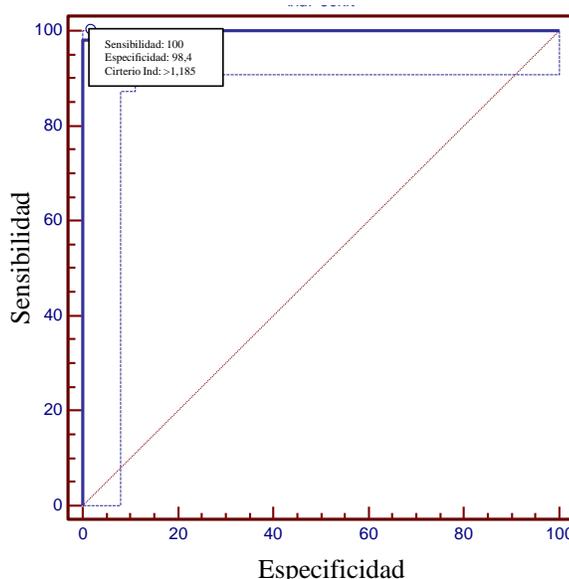


Figura 5.21: Comparación mediante análisis ROC de la clasificación por índice de iiPCR y clasificación inicial de las muestras.

Con respecto a las 85 muestras de hisopados incluidas en el análisis, 45 resultaron positivas y 39 negativas por ambas metodologías (Tabla 5.9). Sólo una muestra resultó positiva por iiPCR y negativa por qPCR. Dicha muestra, correspondió a un hisopado tomado de una yegua experimentalmente infectada y en su último día de excreción.

		qPCR		
		Positivas	Negativas	Total
iiPCR	Positivas	45	1	46
	Negativas	0	39	39
	Total	45	40	85

$\kappa = 0,982$ ;  $p < 0, 05$ ; concordancia muy buena

Tabla 5.9: Concordancia entre las técnicas de iiPCR y qPCR para la detección de EHV-3 en hisopados perineales.

## **6. DISCUSIÓN**

El ECE, causado por la infección con EHV-3, afecta a yeguas y padrillos en todo el mundo. Esta enfermedad, si bien es benigna y resuelve sin complicaciones en dos semanas, repercute negativamente sobre la industria hípica (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y Thiry, 2012; Studdert, 1996). Este trabajo de tesis incluye el estudio de diferentes alternativas para la prevención y el tratamiento del ECE, mediante el uso de compuestos antivirales, y el diagnóstico rápido al pie del animal. Se analizarán secuencialmente los resultados obtenidos relacionados a la eficacia de los diferentes compuestos antivirales *in vitro*; a la prueba *in vivo* con el compuesto ganciclovir administrado en forma preventiva y terapéutica en yeguas adultas experimentalmente desafiadas con EHV-3, y por último, a la validación de la iPCR como metodología de diagnóstico rápido, para su utilización al pie del animal.

### **6.1 COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DISTINTOS COMPUESTOS ANTIVIRALES PARA REDUCIR O INHIBIR LA REPLICACIÓN LA REPLICACIÓN DE EHV-3 IN VITRO**

Inicialmente, se realizó una comparación simultánea de la eficacia de los compuestos sintéticos aciclovir (ACV), cidofovir (HPMPC), ganciclovir (GCV) y brivudin (BVDU), y del compuesto natural  $\lambda$ -carragenano, mediante el análisis de la inhibición en el número y el tamaño de placas de lisis inducidas por la infección *in vitro* con EHV-3 en cultivos celulares. Cabe destacar, que las células EDerm utilizadas para estos ensayos no evidenciaron cambios morfológicos que pudieran asociarse con un efecto tóxico de los compuestos, incluso utilizando altas concentraciones como 100  $\mu\text{g/ml}$ , las cuales se encuentran por muy debajo de las concentraciones citotóxicas observadas para células de origen equino en trabajos anteriores (Garré y col., 2007).

La finalidad de este análisis inicial, *in vitro*, fue conocer la eficacia de los distintos compuestos contra EHV-3 y, a partir de esos resultados, seleccionar el compuesto antiviral que lograra inhibir la replicación de EHV-3. Así, tanto BVDU como los  $\lambda$ -carragenanos fueron excluidos del estudio posterior por no alcanzar dicho requisito. La ineficacia de BVDU, en infecciones con HHV-2 y EHV-1 había sido previamente descrita (De Clercq, 2004b, 2004c), y en el caso de HHV-2, se debe una fosforilación ineficiente por la TK viral (De Clercq, 2004c). Se presume que este mecanismo podría explicar lo que ocurre en el caso de EHV-3. Por otra parte, en el caso de la acción de los  $\lambda$ -carragenanos sobre EHV-3, se observó que la  $CE_{50}$  fue entre cinco y seis veces mayor a aquellas

determinadas para HHV-1 y 2 y BoHV-1, ligeramente mayor que para FeHV-1, pero la mitad que para SuHV-1 (Carlucci y col., 1999; Damonte y col., 2004; Diogo y col., 2015; Stiles y col., 2017). A pesar de que estos compuestos fueron excluidos de posteriores análisis, este estudio, proporciona mayor información acerca de la eficacia de BVDU y los antivirales naturales, contra EHV-3 *in vitro*.

Con respecto a los otros compuestos analizados, ACV, HPMPC y GCV, aunque con resultados que evidencian mayor o menor eficacia, los tres demostraron ser efectivos para inhibir la replicación viral determinada por la reducción en el número y el tamaño de placas de lisis y de la producción viral en cultivos celulares infectados con EHV-3. La  $CE_{50N}$  de GCV fue coincidente con aquella comunicada previamente por Smith y col., (1983), pero en el caso de ACV, la  $CE_{50N}$  fue muy superior que las descritas hace algunos años por Cullinane y col., (1994) y recientemente por Toishi y col., (2017). Sin embargo, en dichos estudios las cepas utilizadas para probar su eficacia *in vitro* fueron únicamente los aislamientos obtenidos en esos casos, a diferencia de este trabajo de tesis, en donde se trabajó con una única cepa de EHV-3 (clon viral de trabajo) previamente caracterizada y purificada por el método de plaqueo para el asegurar la homogeneidad de la cepa.

Tanto para la inhibición del número, como del tamaño de las placas de lisis, generadas por la infección de EHV-3 en cultivos celulares, GCV fue el compuesto más eficiente, seguido por HPMPC, mientras que ACV fue aquel con valores más elevados para ambos parámetros evaluados.

En concordancia con lo observado para FeHV-1 (van der Meulen y col., 2006b), la  $CE_{50T}$  de los 3 compuestos utilizados para EHV-3 fue siempre menor que la  $CE_{50N}$ , dado que en presencia de un análogo de nucleósido la replicación del virus se inhibe gradualmente disminuyendo el tamaño de las placas, pero para lograr la disminución en el número de placas, la cantidad de compuesto debe ser tan alta para inhibir completamente la replicación de esa única partícula que ocasionó la infección inicial. En el caso de la infección por EHV-1, si bien para HPMPC, la  $CE_{50T}$  es menor que la  $CE_{50N}$ ; para ACV y GCV no se observa diferencia entre los valores  $CE_{50T}$  y  $CE_{50N}$ , siendo los mismos similares para cada compuesto (Garré y col., 2007).

La evaluación de la producción viral en presencia de los compuestos antivirales demostró que a las 72 h, la replicación de EHV-3 *in vitro* se reduce en más de un 95% con 5  $\mu\text{g/ml}$  de ACV, 2  $\mu\text{g/ml}$  de HPMPC y 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de GCV, y se inhibe completamente con

20 µg/ml de ACV, 2 µg/ml de HPMPC y 0,5 µg/ml de GCV. A su vez, a partir de los resultados obtenidos se puede evidenciar que la qPCR es más sensible que la DICT50%/ml, para analizar la eficacia de compuestos antivirales *in vitro*, como fue ya descrito en otros trabajos (Hussein y Field, 2008; Thi y col., 2006).

No se observó diferencia significativa en la susceptibilidad de las distintas cepas de campo para cada uno de los compuestos antivirales analizados. De la misma manera, ha sido descrito que la susceptibilidad de distintas cepas de EHV-1 para ACV y GCV es similar, a pesar de que existen diferencias genómicas entre cepas (neuropatogénicas, G2254 y no neuropatogénicas, A2254) en la posición 2254 del ORF30 (Garré y col., 2007; Nugent y col., 2006). Contrariamente, para HPMPC, se encontraron diferencias de susceptibilidad dependiendo de la cepa (Garré y col., 2007). Este tipo de mutaciones en el gen de la ADN polimerasa, que podrían afectar la susceptibilidad de la enzima, no han sido descritas para EHV-3.

Con respecto al análisis de las cepas de campo, HPMPC fue el compuesto menos efectivo, en relación a los tres parámetros analizados principalmente en lo relacionado con los %IN, los cuales fueron inferiores al 50% para todas las cepas. Esto podría atribuirse a que la concentración seleccionada para este ensayo se encontraba por debajo de la CE<sub>50N</sub>. Sin embargo, los otros parámetros evaluados también presentaron variabilidad entre cepas, aunque no significativa. Para ACV y GCV, la eficacia para los tres parámetros evaluados frente a cepas de campo fue similar entre ellos, pero GCV fue más eficiente al producir similares resultados con menores concentraciones del producto.

Estos resultados no sólo aportan mayor información (Cullinane y col., 1994; Smith y col., 1983; Toishi y col., 2017) acerca de la eficacia de ACV y GCV contra EHV-3, sino que además constituyen el primer reporte del uso de HPMPC contra EHV-3 *in vitro*. A su vez, evaluando distintos parámetros de la replicación de EHV-3 frente al tratamiento con distintos compuestos, tanto con una cepa de referencia como así también con cepas de campo, con ligeras diferencias geno y fenotípicas, se concluyó que GCV en una concentración de 0,05 µg/ml es el más eficiente. A su vez, al analizar el valor (comercial) de los compuestos, si bien ACV es más económico que GCV, en términos de mg de droga, al requerir mayores concentraciones para producir el efecto deseado, GCV resulta ser más económico en la dosis final. Por tal motivo, se decidió continuar con la evaluación *in vivo* de este compuesto en una concentración adaptada para ser formulada cómo tópico para su uso en yeguas adultas infectadas experimentalmente.

## **6.2 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE GANCICLOVIR PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ECE, EN YEGUAS INFECTADAS EN FORMA EXPERIMENTAL CON EHV-3**

En lo que respecta al desafío propiamente dicho, la carga viral utilizada fue homogénea para todos los grupos, y los títulos virales fueron similares a aquellos descritos previamente por Barrandeguy y col., (2012) ocasionando signos clínicos y lesiones de ECE, excreción de virus y respuesta específica de anticuerpos, en el 100% de los animales, tal como ha sido descritos por otros autores (Allen y Umphenour, 2004; Barrandeguy y col., 2012, 2010c, 2008; Kleiboeker y Chapman, 2004; Seki y col., 2004; Slater, 2014).

En referencia a los distintos tratamientos aplicados, se analizarán primero los resultados del grupo C. En el mismo, se observaron lesiones de ECE y excreción de virus infectivo hasta el día 20 pi. La respuesta de anticuerpos se detectó a los 7 días pi, pero fue máxima a los 14 días pi. Estos resultados concuerdan con publicaciones anteriores (Allen y Bryans, 1977; Barrandeguy y col., 2012). Por último, y a diferencia de otros autores (Barrandeguy y col., 2012) hacía el día 4 y 12 pi, y en relación a los dos picos de la excreción viral, se detectaron dos picos de hipertermia en este grupo.

El objetivo propuesto de la aplicación de un tratamiento preventivo era disminuir y/o inhibir la replicación viral y en consecuencia la excreción de EHV-3 en los días posteriores al tratamiento, para proponer su aplicación previa al servicio en la totalidad de las yeguas adjudicadas a un determinado padrillo. De este modo, en el caso de que alguna de estas yeguas estuviera excretando virus de manera subclínica se evitaría el contagio por vía venérea al padrillo.

Para evaluar la eficacia de GCV como tratamiento preventivo, se utilizaron 8 yeguas, grupo P<sub>4</sub> (tratadas a las 4 h post infección) y grupo P<sub>4/24</sub> (tratadas a 4 y a las 24 h pi), y se encontró diferencia significativa en el “score” clínico total, pero no en la excreción de virus total medida por qPCR, de los tratamientos respecto de los controles. Desde el punto de vista epidemiológico, un tratamiento antiviral que arroje similares valores de excreción viral asociados a una disminución en la manifestación clínica, no sólo no sería apropiado sino perjudicial, dado que se ocultarían las lesiones en animales que se encuentran excretando virus. Sin embargo, al analizar la excreción de virus infectivo en cada uno de estos grupos por separado, se observó una diferencia significativa en el período de excreción, dado que al día 16 pi ninguno de los animales del grupo P<sub>4</sub>

excretaba virus infectivo en comparación con un 50% y un 75% de los animales en los grupos C (control) y P<sub>4/24</sub>, respectivamente. Este resultado evidencia el efecto beneficioso del tratamiento realizado en el grupo P<sub>4</sub>, en relación al control. En referencia a la respuesta inmune de estos grupos, se pudo detectar diferencia significativa en el inicio de la misma entre el grupo P<sub>4/24</sub> y los grupos C y P<sub>4</sub>, consistente con el retraso en las curvas de excreción viral, detección de virus infectivo y “score” clínico de este grupo. Contrariamente, el grupo P<sub>4</sub>, el cual recibió un solo tratamiento, presentó una respuesta de anticuerpos de mayor intensidad, incluso que el control, a los 7 días pi, que pudo haber favorecido la resolución más rápida en la excreción de virus infectivo.

Los resultados obtenidos demuestran que en animales tratados en forma preventiva (clínicamente sanos, día 0 y 1 pi), existe una diferencia en la duración de la excreción de virus infectivo y de la respuesta inmune, asociada al momento o cantidad de las aplicaciones del compuesto.

El tratamiento terapéutico se diagramó con la finalidad de acortar los tiempos de recuperación en animales con ECE clínico, así como también para disminuir la excreción de virus infectivo. Tanto para el grupo T<sub>GCV</sub> como para el T<sub>P</sub>, el tratamiento se inició cuando las lesiones de ECE fueron evidentes, homologando lo que un veterinario clínico haría en su práctica médica de rutina. Cabe destacar que dicha severidad se correspondió con un “score” de 10 y que ocurrió entre los días 5 y 7 pi para ambos grupos.

El “score” clínico total del grupo T<sub>GCV</sub> fue menor que el de los grupos no tratados (C y T<sub>P</sub>), pero la diferencia no alcanzó a ser significativa, lo cual podría deberse a que el tratamiento se inició entre los 5 y 7 días pi, cuando los animales ya presentaban un “score” de 10. Esto, concuerda con tratamientos terapéuticos utilizados para otros agentes virales (Tempesta y col., 2008; Vega y col., 2012). Por otro parte, se observó que en el grupo T<sub>GCV</sub> se acortaron los tiempos, ya sea para el día de “score” máximo, que fue el 8 pi (mientras que para el C fue el 12 pi), así como también para la duración de las lesiones, las cuales se registraron hasta el día 16 pi (mientras que en el control fueron hasta el 20 pi). De la misma manera, y en referencia a la excreción de virus, al día 12 pi ninguna de las yeguas de este grupo excretaban virus infeccioso; mientras que en los grupos no tratados (C y T<sub>P</sub>) el 100% de las yeguas excretaban virus infectivo ese mismo día (ANOVA de una vía, p= 0,0005). A su vez, la excreción total de virus determinada por qPCR disminuye significativamente al compararla con los controles. La respuesta de anticuerpos fue similar a la registrada en los grupos no tratados, sin embargo al día 7 pi, el nivel de

seroconversión fue menor. El conjunto de estos resultados demuestran el efecto de GCV sobre la replicación de EHV-3 en yeguas tratadas, disminuyendo significativamente la intensidad de la excreción de virus durante la experiencia y acortando la excreción de virus infectivo en ocho días, comparado con yeguas sin tratar.

Con respecto al grupo placebo, tratado en forma terapéutica sin GCV ( $T_P$ ), los resultados indicarían que la crema *per se* colabora en cierta forma en la resolución de la enfermedad a diferencia de lo expuesto por otros autores (Tempesta y col., 2007b). Para el grupo  $T_P$ , la duración del cuadro clínico fue similar al grupo  $T_{GCV}$ , y el valor de “score” máximo se alcanza igualmente al día 8 pi, aunque con mayor severidad que en el  $T_{GCV}$ . Por otra parte, la excreción de virus infectivo se reduce en cuatro días en relación al control.

Es importante destacar que hacia el final de la experiencia, se detectaron dos animales, uno perteneciente al grupo  $T_{GCV}$  (yegua 5) y otro al grupo  $T_P$  (yegua 15), que comenzaron a excretar virus sin evidencia clínica de la enfermedad. Si bien ambos animales, evidenciaron una disminución mínima del título de anticuerpos hacia la fecha en donde se produjo la nueva detección de excreción viral (desde  $10^{2,40}$  a  $10^{2,10}$ ), este evento se evidenció también en otros animales para esas mismas fechas en los cuales no se detectó re-excreción. Esto confirma, que la re-activación y re-infección se producen, aún en presencia de altos niveles de anticuerpos (Barrandeguy y col., 2010c, 2008), así como también que la presencia de estos anticuerpos colabora en la disminución del cuadro clínico (Barrandeguy y col., 2012). Las razones por las cuales sólo dos animales de los grupos tratados en forma terapéutica sufrieron estos sucesos de re-activación y/o re-infección podrían atribuirse a distintas causas. Se ha descrito la re-activación en condiciones naturales durante el estro de cabras latentemente infectadas con CpHV-1 y con niveles bajos de anticuerpos neutralizantes (Tempesta y col., 1998), situación que si bien no ha sido aún estudiada en yeguas, podría ser posible. La re-activación también podría relacionarse con situaciones de stress naturales sufridas por esos animales en particular, tal como ha sido descrito previamente por Barrandeguy y col., (2010c). Por último, podría deberse a la ausencia o descenso en los niveles de anticuerpos presentes en las mucosas (inmunoglobulina A; IgA). La participación de anticuerpos IgA en la disminución de la excreción viral ha sido descrita en cabras infectadas con CpHV-1 (Camero y col., 2007; Tempesta y col., 2007a).

Este trabajo representa un primer paso, como prueba de concepto, hacia el desarrollo de un tratamiento preventivo y/o terapéutico basado en la aplicación tópica de ganciclovir para controlar la infección por EHV-3.

Si bien no se logró la inhibición completa de la replicación viral post-infección, mediante el tratamiento preventivo se logró reducir significativamente la manifestación clínica de los animales tratados así como también el tiempo de excreción de virus infectivo en uno de los grupos. A su vez, mediante el uso de un tratamiento antiviral durante la manifestación clínica de la enfermedad, disminuyó significativamente la intensidad y el tiempo de excreción de virus infectivo, así como también la manifestación clínica de la enfermedad. Como mejoras para futuros trabajos, debería considerarse la utilización de mayores concentraciones de la droga en el producto farmacéutico. Considerando que desde el punto de vista práctico, un aumento en las aplicaciones/día o en la duración del tratamiento es complicado y difícil de corroborar sobre todo en los casos de tratamiento preventivo, hipotetizamos que aumentando la concentración de GCV a valores entre 0,1% y 1% p/p, como fue expuesto en otros trabajos (Colin, 2007; Tempesta y col., 2008), podría mejorar la respuesta al tratamiento. Por otra parte, el agregado de compuestos antivirales (carragenanos – docosanol) que inhiban la replicación mediante un mecanismo distinto al de los análogos de nucleósidos (sinergia) podría ser una alternativa para mejorar el tratamiento, así como también la inclusión de neutralizantes del virus, como anticuerpos IgY (Vega y col., 2012) o nano anticuerpos (Vega y col., 2013). De la misma manera, debería también evaluarse el agregado de inmunoestimulantes, inmunomoduladores (Camero y col., 2017) u otros factores que favorezcan la cicatrización y/o que aumenten la inflamación (Brito y Hagan, 2014; Heegaard y col., 2016).

### **6.3 ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PLATAFORMA TECNOLÓGICA CONOCIDA COMO iiPCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE EHV-3 A CAMPO**

Mediante la colaboración realizada con la empresa GeneReach, se logró adaptar la tecnología de iiPCR (Chang y col., 2012; Tsai y col., 2012) para el diagnóstico de EHV-3.

A partir de los resultados de la validación, se pudo observar que la iiPCR para la detección de EHV-3 concuerda, con un  $\kappa$  ponderado de 0,982, con la qPCR, metodología que si bien permite el diagnóstico rápido, no es útil desde el punto de vista práctico ya que las muestras deben ser remitidas a un laboratorio de mediana o alta complejidad, que cuente con el equipamiento y esto requiere como mínimo de 8-24hs.

Es muy importante destacar que el punto de corte establecido para el sistema de iiPCR (índice: 1,2) fue homologado al punto de corte de la qPCR en un Ct de 38,5, con un 100% de especificidad y sensibilidad, y una concordancia muy buena. Al realizar la comparación entre la iiPCR, la qPCR de alta especificidad y baja sensibilidad (Ct= 31) y la detección de virus infeccioso, se observó que 12 de 19 muestras fueron clasificadas como positivas por iiPCR y negativas por qPCR y por aislamiento viral en cultivo celular. Por estas razones, el índice establecido como punto de corte para la iiPCR da al ensayo una alta sensibilidad, permitiendo detectar animales que excretan virus en niveles muy bajos, aun cuando el mismo no es infeccioso. El diagnóstico de EHV-3 mediante la técnica de iiPCR resulta entonces altamente confiable para discriminar animales infectados de no infectados en horas previas al servicio o IA/TE.

Este nuevo sistema de diagnóstico permite que los veterinarios a cargo del examen clínico realicen la toma de muestras, la extracción y la detección del ADN de EHV-3 antes del servicio o de la IA/TE, mediante un método de fácil ejecución que posee una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98,36%. El resultado se obtiene en 1,30 h (incluyendo el tiempo de la extracción) de modo que las yeguas en las que se obtiene un resultado positivo pueden excluirse del servicio, hasta el siguiente celo, y de ese modo evitar la transmisión de EHV-3 al padrillo.

La implementación efectiva y sistemática de esta metodología de diagnóstico seguramente redundaría en la disminución del impacto negativo del ECE en centros de monta natural de SPC, así como también en centros de TE/IA.

La tecnología de iiPCR, para otros patógenos equinos está siendo utilizada en nuestro laboratorio desde hace 2 años y también en por lo menos 3 laboratorios de diagnóstico privados (mencionarlos) de nuestro país (Becu, T.; Ivanissevich, A., Dorronsoro, comunicación personal).

Si bien las tecnologías asociadas al diagnóstico molecular han sido y, son actualmente, muy costosas, la metodología propuesta demandaría una inversión mínima inicial, en la adquisición del equipo portátil que incluye todo lo necesario, y los reactivos, que vienen en un formato liofilizado por lo que son de larga duración (2 años) a 4°C. Si tenemos en cuenta el valor de los servicios y/o maniobras reproductivas, así como también la importancia de no perder fechas de monta, los costos de la adopción de la tecnología propuesta beneficiarían significativamente el balance económico.

## **7. CONCLUSIONES**

- Ganciclovir es el compuesto más eficiente en inhibir la replicación de EHV-3 *in vitro*, mientras que aciclovir y cidofovir presentan una menor eficiencia. Brivudin y los lambda-carragenanos no resultan efectivos para inhibir la replicación de EHV-3 *in vitro*.
- El tratamiento con GCV 0,01% p/p en forma preventiva de animales infectados experimentalmente con EHV-3 y clínicamente sanos (día 0 pi), reduce significativamente la severidad del cuadro clínico y la excreción de virus infectivo.
- El tratamiento terapéutico con GCV 0,01% p/p, reduce significativamente la intensidad y el tiempo de excreción de virus infectivo en ocho días, comparado con yeguas sin tratar.
- La tecnología de iPCR como metodología diagnóstica, resulta altamente confiable para discriminar animales infectados de no infectados en horas previas al servicio o IA/TE (resultado en 1:30 h).
- Este trabajo de tesis representa un avance en el desarrollo de un tratamiento preventivo y/o terapéutico, basado en la aplicación tópica de ganciclovir para controlar la infección por EHV-3, y una mejora del sistema de prevención mediante el diagnóstico a campo al pie del animal. En su conjunto, la aplicación de estas alternativas de prevención y tratamiento, disminuirían el impacto negativo del ECE sobre la producción equina.

## **8. APÉNDICE TÉCNICO.**

## **8.1 MULTIPLICACIÓN DE VIRUS EN CÉLULAS**

### **8.1.1 Titulación de virus por DICT50%/ml**

Se prepararon monocapas de células EDerm colocando 30000 células/pocillo en placas de 96 pocillos para obtener una confluencia celular del 90 al 100% a las 24 h. Estas monocapas celulares fueron inoculadas con 100 µl de diluciones seriadas en base 10 (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) del virus a titular por cuadruplicado, e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, durante 72 h. Pasado este tiempo, se realizó la lectura mediante la observación de ECP característico, en un microscopio invertido con un aumento de 10X, registrando pocillos afectados y no afectados. El título infeccioso se calculó por el método de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938).

### **8.1.2 Titulación de virus por UFP/ml**

Se prepararon monocapas de células EDerm colocando 100000 células/pocillo en placas de 12 pocillos (superficie 4,52 cm<sup>2</sup>/pocillo) para obtener una confluencia celular del 90 al 100% a las 24 h. Se retiró el sobrenadante de las monocapas y se inocularon, por triplicado, con 500 µl de diluciones seriadas base 10 (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) del virus a titular y se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 h para permitir la completa adsorción del virus. Posteriormente se retiró el inóculo y se colocaron 2 ml de medio semisólido (MEM-D, 2% SFB y CMC 0,75%). A las 72 h se descartó el sobrenadante y se realizó la fijación y tinción de la monocapa celular con 2 ml de una solución de cristal violeta (CV) 0,1% en formol 10% durante 20 minutos. Este procedimiento permitió visualizar las placas de lisis como círculos incoloros bien definidos (indican multiplicación del virus) del resto de la monocapa celular teñida de violeta (Figura 8.1). Se contaron las placas de lisis generadas en cada réplica inoculada para cada dilución de virus.

El título infeccioso se expresó como el número de UFP/ml y se calculó de acuerdo a lo descrito por Hierholzer and Killington, (1996), de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \text{Promedio número de placas} * \text{recíproca de la dilución} * \text{recíproca del volumen (ml)} \\ & = 10x \text{ UFP/ml} \end{aligned}$$

Ej.: en monocapa infectada con 0.1 ml, se cuentan 50 placas (promedio de 3 pocillos) en la dilución  $10^{-6}$   $50 \times 10^6 \times 10 = 5 \times 10^8$  UFP/ml

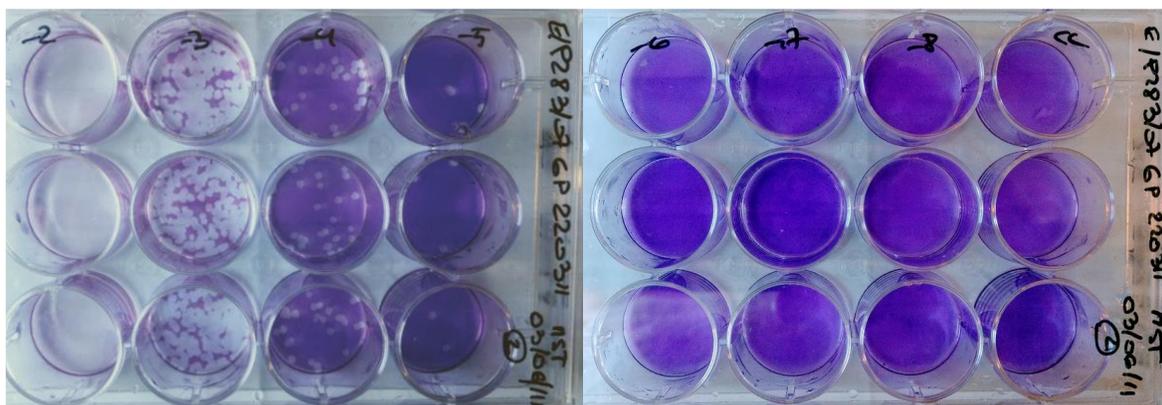


Figura 8.1: Titulación por UFP/ml en monocapa de células EDerm. En la figura se muestran dos placas de 12 pocillos inoculadas con diluciones seriadas base 10 (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-8</sup>) de E/9283/07 C3A.

### 8.1.3 Determinación del tamaño de las placas de lisis

Luego de determinar el número de placas originado por la infección viral en cada dilución de acuerdo a lo que se describió en 8.1.2, se determinó el tamaño de las mismas. Para esto, las placas de lisis se observaron y fotografiaron en un microscopio invertido, con un aumento de 100X (Figura 8.2). El tamaño de cada placa fue determinado utilizando el programa IMAGE J (Wright Cell Imaging Facility, Toronto Western Research Institute, [www.uhnresearch.ca/wcif](http://www.uhnresearch.ca/wcif) - <http://rsb.info.nih.gov/ij>) y expresado como el área, en pixeles. Para obtener el promedio del tamaño de placa se fotografiaron y midieron entre 16 y 20 placas por dilución y por ensayo.

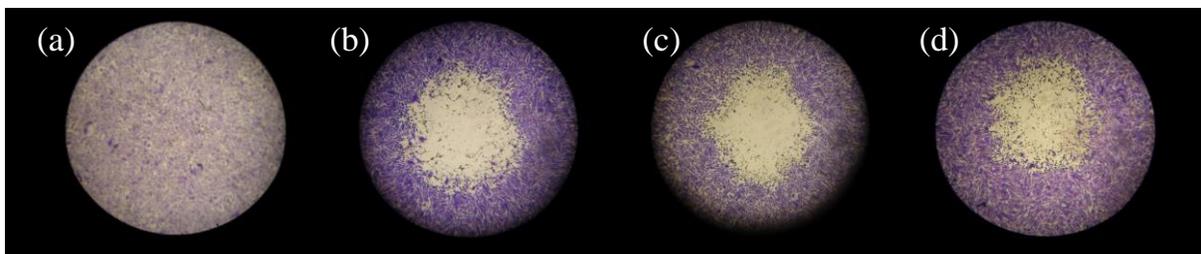


Figura 8.2: Fotografías obtenidas en el microscopio invertido con un aumento de 100X de células EDerm teñidas con cristal violeta al 0,1%: (a) células sin infectar; (b, c, d) placas de lisis producidas por la infección con EHV-3.

### 8.1.4 Aislamiento viral en cultivos celulares

Los HPV fueron centrifugados a 14000 rpm durante 10 minutos para eliminar restos de crema (proveniente de los tratamientos), “detritus” celulares, pelos, materia fecal y otros, siempre presentes en la zona muestreada.

Para esto, placas de 12 pocillos conteniendo monocapas de células EDerm de 24 h con 80% de confluencia, se inocularon con 500 µl de HPV y 500 µl de SFB, para disminuir la toxicidad. Luego de la adsorción (2 h a 37°C, en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>) se realizaron tres lavados con MEM-D y se agregó medio de mantenimiento (MEM-D, MEM-E y 5% de SFB). Las monocapas se observaron por medio de un microscopio invertido con un aumento de 10X y 40X, durante siete días para evaluar la presencia de ECP.

## **8.2 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE GENOMA VIRAL**

### **8.2.1 Extracción de ADN**

Para realizar la extracción de ADN viral en todos los casos se utilizó el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat No. 11 796 828 001, ROCHE®) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **8.2.2 PCR convencional**

Se amplificó una región del gen gG de EHV-3 (Dynon y col., 2001). Brevemente, se realizó una mezcla que contiene agua ultrapura, PCR green buffer 5X con Cl<sub>2</sub>Mg, dNTPs (5 mM c/u), GoTaq ADN Pol (2.5 U/µl) y cebadores “forward” (100 µM) (5'-GCGCTCTCTCGGCCTTGCCAG-3') y “reverse” (100 µM) (5'-GGCGTCTCGAAAAGCGAGAG-3') que amplifican un fragmento del gen gG de EHV-3 de 520 pb. Se realizó el siguiente ciclado: 1 ciclo de 5 minutos a 94° C, 35 ciclos de: 1 minuto 94° C, 1 minuto 55° C, 1 minuto 72° C y 1 ciclo de: 5 minutos a 72° C, 99 h 99 minutos a 4° C. El producto obtenido se evidenció en un gel de agarosa 2%.

### **8.2.3 Cuantificación de ADN viral por qPCR**

Partiendo de una extracción de ADN según lo descrito en 8.2.1, se cuantificó el ADN viral mediante qPCR. Brevemente, se utilizó una mezcla comercial para qPCR (TaqMan Universal Master Mix, Applied Biosystems®) con cebadores que amplifican un fragmento del gen gG de EHV-3 (“forward” 5'-GGGTATCGGCTTTCTCATCTTG-3' y “reverse”: 5'- CCGCAGGACGCAAACG-3') y 1 sonda TaqMan ® específica 5'- 6-FAM-TGTGTCTCCTCATCGGCCTCATTGTCT-TAMRA- 3') en un equipo Applied Biosystems® ABI-7500 para qPCR (Barrandeguy y col., 2008).

#### **8.2.4 Secuenciación del ADN**

Los productos de amplificación correspondientes a la región del gen gG de EHV-3 fueron purificados a partir del producto obtenido de una PCR convencional (8.2.2) utilizando el kit de purificación ilustra ExoProStar (Cat US78210, GE Healthcare Life Science®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras purificadas fueron secuenciadas en ambos sentidos utilizando un secuenciador automáticos (ABI Prism 377, Applied Biosystems®) perteneciente al servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar. La secuenciación fue realizada utilizando el mismo par de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

La matriz para el análisis filogenético se construyó con las secuencias previamente publicadas del gen gG de EHV-3 334/74 [GenBank Accession number AF081188] (Hartley y col., 1999), un aislamiento de Brasil [GenBank Accession number GQ 336877] (Ferreira y col., 2010) y la cepa de referencia de EHV-3.

Las secuencias fueron editadas utilizando el programa Bioedit Sequence Alignment Editor V7.0.9.0 software (Hall, 1999), y alineadas con ClustalX versión 1.81 (Thomson y col., 1997) utilizando los parámetros pre-establecidos. El análisis de distancia se realizó por el método de Neighbour-Joining con los parámetros de Kimura-2 como modelo evolutivo (Tamura y col., 2007). Se utilizó luego un análisis de Bootstrapping con 1000 réplicas.

#### **8.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ESPECÍFICOS CONTRA EHV-3**

De acuerdo a lo descripto previamente por Barrandeguy y col., (2008), se colocaron 50 µl de MEM-D y MEM-E con 10% SFB en todos los pocillos de una placa para cultivo celular de 96 pocillos. Luego se agregaron 50 µl de cada suero problema por triplicado (fila A), y se realizaron diluciones en base 2 desde la fila A hasta la fila H (para analizar cuatro sueros por placa). Finalmente, se agregaron 50 µl de la suspensión viral de trabajo conteniendo 100 DICT50%/50 µl desde A hasta H de dos réplicas de cada suero, y 50 µl de MEM-D y MEM-E con 10% SFB a una de las réplicas de cada suero. Luego de 1 h de incubación a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, se agregaron 100 µl de una suspensión de células EDerm conteniendo 10<sup>6</sup> células/placa. Se utilizaron como controles del ensayo, sueros equinos con título de anticuerpos conocidos (alto, bajo y negativo) contra EHV-3, así como controles de la dilución de uso del virus. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> hasta su lectura a las 72 h. La misma se realizó en un microscopio

invertido con un aumento de 40X. La presencia de ECP indica la ausencia de anticuerpos neutralizantes, así como la ausencia de ECP (monocapa “sana”) la presencia de anticuerpos seroneutralizantes contra el virus.

## **9. REFERENCIAS**

- 
- AACREA, A.A. de C.R. de E.A., (2004). Equinos. Agroalimentos Argentinos II - Sitio Argentino de Producción Animal 231–238.
- Allen, G., Bryans, J., (1977). Replication of equine herpesvirus type 3: kinetics of infectious particle formation and virus nucleic acid synthesis. *Journal of General Virology* 34, 421–430.
- Allen, G., O’Callaghan, D., Randall, C., (1977). Genetic relatedness of equine herpesvirus types 1 and 3. *Journal of Virology* 24, 761–767.
- Allen, G., Randall, C., (1979). Proteins of equine herpesvirus type 3. I. Polypeptides of the purified virion. *Virology* 92, 252–257.
- Allen, G., Umphenour, W., (2004). Equine coital exanthema, en: Coetzer, J., Tustin, R. (Eds.), *Equine Coital Exanthema*. IN *Infectious Diseases of Livestock*, (Ed.). Oxford Press, Cape Town, pp. 860–867. doi:10.1016/j.tvjl.2011.01.016
- Anonymous, (2017). Virus Taxonomy: 2016 Release [WWW Document]. URL <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accedido 5.23.17).
- Anonymous, (2015). El diario del juego [WWW Document]. El riesgoso negocio de los caballos. URL <http://eldiario.deljuego.com.ar/submenuanalisisdelsector/12679-el-riesgoso-negocio-de-los-caballos.html> (accedido 5.31.17).
- Ataseven, V.S., Doğan, F., Dağalp, S.Bi., Tan, M.T., (2014). Serological survey of equid herpesvirus 3 infection in Turkish horses 295–298. doi:10.3906/vet-1311-72
- Atherton, S.S., Sullivan, D., Dauenhauer, S.A., O’Callaghan, D.J., (1982). Properties of the genome of equine herpesvirus type 3. *Virology* 120, 18–32. doi:10.1016/0042-6822(82)90003-4
- Aurich, C., Spargser, J., Nowotny, N., Rosengarten, T., Aurich, J., (2003). Prevalence of venereal transmissible diseases and relevant potentially pathogenic bacteria in Austrian Noriker Draught horse stallions. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90, 124–130.
- Azab, W., Tsujimura, K., Kato, K., Arai, J., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., Tohya, Y., Matsumura, T., Akashi, H., (2010). Characterization of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 4 and in vitro susceptibility of the virus to antiviral agents. *Antiviral Research* 85, 389–395. doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.007
- Balasuriya, U.B.R., Lee, P.Y.A., Tiwari, A., Skillman, A., Nam, B., Chambers, T.M., Tsai, Y.L., Ma, L.J., Yang, P.C., Chang, H.F.G., Wang, H.T.T., (2014). Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR)

- 
- assay using the POKKIT™ nucleic acid analyzer. *Journal of Virological Methods*. doi:10.1016/j.jviromet.2014.06.016
- Barba, M., Stewart, A.J., Shrader, S.M., Koehler, J.W., Johnson, A.K., Caldwell, F.J., (2015). Case Report Keratitis and periocular lesions associated with equine herpesvirus-3 in a 3-month-old filly. *Equine Veterinary Education* 27, 618–622. doi:10.1111/eve.12365
- Barrandeguy, M., Espasandin, G., Alvarez, I., Vissani, A., Cipolini, F., Martinez, D., Chung, S., Tsai, Y., Lee, A., Wang, T., (2016). Detection of Equine Infectious Anemia virus by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POKKIT™ Nucleic acid analyzer, en: *Proceedings of the 10th International Equine Infectious Diseases Conferences*. Elsevier Ltd, Buenos Aires, Argentina, pp. S7–S8. doi:10.1016/j.jevs.2016.02.016
- Barrandeguy, M., Perkins, J., Mac Donough, J., Vissani, A., Olguin, C., Thiry, E., (2010a). Occurrence of Equine Coital Exanthema in Mares from an Embryo Transfer Center. *Journal of Equine Veterinary Science* 30, 145–149.
- Barrandeguy, M., Thiry, E., (2012). Equine coital exanthema and its potential economic implications for the equine industry. *Veterinary Journal* 191, 35–40. doi:10.1016/j.tvjl.2011.01.016
- Barrandeguy, M., Ulloa, N., Bok, K., Fernandez, F., (2010b). Outbreak of rhinitis caused by equid herpesvirus 3. *Veterinary Record* 166, 178.
- Barrandeguy, M., Vissani, A., Olguin, C., Barbara, G., Valenzuela, H., Becerra, L., Tordoya, M., Miño, S., Thiry, E., (2012). Experimental infection with equid herpesvirus 3 in seronegative and seropositive mares. *Veterinary Microbiology* 160, 319–326. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.024
- Barrandeguy, M., Vissani, A., Olguin, C., Becerra, L., Miño, S., Pereda, A., Oriol, J., Thiry, E., (2008). Experimental reactivation of equine herpesvirus-3 following corticosteroid treatment. *Equine veterinary journal* 40, 593–595. doi:10.2746/042516408X333399
- Barrandeguy, M., Vissani, A., Pont Lezica, F., Salamone, J., Heguy, A., Becerra, L., Olguin Perglione, C., Thiry, E., (2010c). Subclinical infection and periodic shedding of equid herpesvirus 3. *Theriogenology* 74, 576–580. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.014
- Baumann, R., Sullivan, D., Staczek, J., O’Callaghan, D., (1986). Genetic relatedness and colinearity of genomes of equine herpesvirus types 1 and 3. *Journal of Virology* 57,

816–825.

- Bentz, B., Maxwell, L., Erkert, R., Royer, C., Davis, M., MacAllister, C., Clarke, C., (2006). Pharmacokinetics of acyclovir after single intravenous and oral administration to adult horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 589–594.
- Blanchard, T., Kenney, R., Timoney, P., (1992). Venereal Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8, 191–203.
- Bouchev, D., Evermann, J., Jacob, R., (1987). Molecular pathogenesis of equine coital exanthema (ECE): temperature sensitivity (TS) and restriction endonuclease (RE) fragment profiles of several field isolates. *Archives of Virology* 92, 293–299.
- Brito, L.A., Hagan, D., (2014). Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *Journal of Controlled Release* 190, 563–579. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.027
- Bryans, J., (1980). Herpesviral diseases affecting reproduction in the horse. *Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice* 2, 303–312.
- Bryans, J., (1968). The herpesviruses in disease of the horse., en: *Proceeding of the 14th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Philadelphia, USA, pp. 119–125.
- Camero, M., Bellacicco, A.L., Tarsitano, E., Decaro, N., Martella, V., Tempesta, M., Buonavoglia, C., (2007). Intravaginal administration of an inactivated vaccine prevents lesions induced by caprine herpesvirus-1 in goats. *Vaccine* 25, 1658–1661. doi:10.1016/j.vaccine.2006.11.002
- Camero, M., Buonavoglia, D., Lucente, M., Losurdo, M., Crescenzo, G., Trerotoli, P., Casalino, E., Martella, V., Elia, G., Tempesta, M., (2017). Enhancement of the antiviral activity against caprine herpesvirus type 1 of Acyclovir in association with Mizoribine. *Research in Veterinary Science* 111, 120–123.
- Carlucci, M., Ciancia, M., Matulewicz, M., Cerezo, A., Damonte, E., (1999). Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Research* 43, 93–102.
- Carlucci, M., Pujol, C., Ciancia, M., Nosedà, M., Matulewicz, M., Damonte, E., (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 20, 97–105.
- Carmichael, R., Whitfield, C., Maxwell, L., (2013). Pharmacokinetics of ganciclovir and

- 
- valganciclovir in the adult horse. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 36, 441–449.
- Carossino, M., Lee, P.-Y.A., Nam, B., Skillman, A., Shuck, K.M., Timoney, P.J., Tsai, Y.-L., Ma, L.-J., Chang, H.-F.G., Wang, H.-T.T., Balasuriya, U.B., (2016). Development and evaluation of a reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction (RT-iiPCR) assay for detection of equine arteritis virus in equine semen and tissue samples using the POCKIT™ system. *Journal of Virological Methods* 234, 7–15. doi:10.1016/j.jviromet.2016.02.015
- Castaño-Bello, H., (1998). Temperature Regulation and Thermal Environment, en: Robertshaw, D. (Ed.), *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Cornell University, Reece WO.
- Chang, H.F.G., Tsai, Y.L., Tsai, C.F., Lin, C.K., Lee, P.Y., Teng, P.H., Su, C., Jeng, C.C., (2012). A thermally baffled device for highly stabilized convective PCR. *Biotechnology Journal*. doi:10.1002/biot.201100453
- Cochard, T., Léon, A., Huet, C., Fortier, G., Pronost, S., (2002). Exanthème coïtal dans un élevage de poneys Fjord. Intérêt du diagnostic par PCR., en: *Proceeding of the Association Vétérinaire Equines Français*. Le Touquet, France, p. 423.
- Coen, D., Richman, D., (2007). Antiviral agents, en: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), *Field's Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 447–486.
- Colin, J., (2007). Ganciclovir ophthalmic gel , 0 . 15 %: a valuable tool for treating ocular herpes. *Clinical Ophtalmology* 1, 441–453.
- Craig, J., Kehoe, D., (1921). Horse pox and coital exanthema. , 126–129. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 34, 126–129.
- Crandel, R., Davis, E., (1985). Isolation of equine coital exanthema virus (equine herpesvirus 3) from the nostril of a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187, 503–504.
- Cullinane, A., McGing, B., Naughton, C., (1994). The use of acyclovir in the treatment of coital exanthema and ocular disease caused by equine herpesvirus 3. e, en: Plowright, W., Nakajima, H. (Eds. . (Eds.), *Equine Infectious Diseases VII*. R & W Publications, Newmarket (Suffolk), p. 55.
- Damonte, E., Matulewicz, M., Cerezo, A., (2004). Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry* 11, 2399–2419.
- Davison, A.J., (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology* 143, 52–69.

doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.014

- De Clercq, E., (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical Microbiology Reviews* 29, 695–747. doi:10.1128/CMR.00102-15.Address
- De Clercq, E., (2004a). Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology* 30, 115–133. doi:10.1016/j.jcv.2004.02.009
- De Clercq, E., (2004b). Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochemical Pharmacology* 68, 2301–2315. doi:10.1016/j.bcp.2004.07.039
- De Clercq, E., (2004c). (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine (BVDU). *Wiley InterScience* 25, 1–20. doi:10.1002/med.20011
- De Clercq, E., (2002). Strategies in the Design of Antiviral Drugs. *Nature Reviews - Drug Discovery* 1, 13–25. doi:10.1038/nrd703
- De Clercq, E., (1997). In Search of a Selective Antiviral Chemotherapy. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 674–693.
- Diario de Jerez, (2009). La transferencia de embriones, tema de debate en La Cartuja.
- Diogo, J. V, Galdo, S., González, M.J., Ciancia, M., Bratanich, A.C., (2015). Research in Veterinary Science Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed ( *Gigartina skottsbergii* ) against BoHV-1 and SuHV-1. *Research in Veterinary Science* 98, 142–144. doi:10.1016/j.rvsc.2014.11.010
- Dwyer, R., (2004). Environmental disinfection to control equine infectious diseases. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 20, 521–530.
- Dynon, K., Varrasso, A., Ficorilli, N., Holloway, S., Reubel, G., Li, F., Hartley, C., Studdert, M., Drummer, H., (2001). Identification of equine herpesvirus 3 (equine coital exanthema virus), equine gammaherpesviruses 2 and 5, equine adenoviruses 1 and 2, equine arteritis virus and equine rhinitis A virus by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal* 79, 695–702.
- Edwards, E., (1981). El desarrollo del caballo, en: Gonzalez, G. (Ed.), *Enciclopedia del caballo*. Blume, Barcelona, pp. 10–26.
- Ehlers, B., Borchers, K., Grund, C., Frolich, K., Ludwig, H., Buhk, H.-J., (1999). Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes* 18, 211–220.
- El cronista, (2004). La Argentina, líder entre los productores de caballos pura sangre de carrera [WWW Document]. URL <https://www.cronista.com/impresageneral/La->

- 
- Argentina-lider-entre-los-productores-de-caballos-pura-sangre-de-carrera-20040906-0003.html (accedido 5.31.17).
- Evans, J.S., Lock, K.P., Levine, B.A., Champness, J.N., Sanderson, M.R., Summers, W.C., Mcleish, P.J., Buchan, A., (1998). Herpesviral thymidine kinases: laxity and resistance by design. *Journal of General Virology* 79, 2083–2092.
- Everman, J., Bergstrom, P., Cornell, D., Morgan, W., Whitlatch, L., (1983). Equine coital exanthema virus infection. *Equine Practice* 5, 39–47.
- Feilen, C., Walker, S., Studdert, M., (1979). Equine herpesvirus type 3 (equine coital exanthema) in New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 55, 443–444.
- Ferreira, C., Costa, E., França, S., de Melo, U., Drumond, D., Bomfim, M., Coelho, F., Resende, M., Palhares, M., Santos, R., (2010). Equine coital exanthema in a stallion. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62.
- Garre, B., (2008). Pharmacokinetics and clinical efficacy of acyclovir in the treatment of equine herpesvirus 1 infections. Ghent University.
- Garré, B., Gryspeerdt, A., Croubels, S., De Backer, P., Nauwynck, H., (2009). Evaluation of orally administered valacyclovir in experimentally EHV1-infected ponies. *Veterinary Microbiology* 135, 214–221. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.062
- Garre, B., Shebany, K., Gryspeerdt, A., Baert, K., Meulen, K. Van Der, Nauwynck, H., Deprez, P., Backer, P. De, Croubels, S., (2007). Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous infusion of acyclovir and after oral administration of acyclovir and its prodrug valacyclovir in healthy adult horses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 4308–4314. doi:10.1128/AAC.00116-07
- Garré, B., van der Meulen, K., Nugent, J., Neyts, J., Croubels, S., De Backer, P., Nauwynck, H., (2007). In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Veterinary Microbiology* 122, 43–51. doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.004
- Gibbs, E., Roberts, M., Morris, J., (1972). Equine coital exanthema in the United Kingdom. *Equine Veterinary Journal* 4, 74–80.
- Girard, A., Greig, A., Mitchell, D., (1968). A virus associated with vulvitis and balanitis in the horse – a preliminary report. *Canadian Journal Comparative Medicine* 32, 603–604.
- Gleeson, L., Sullivan, M., Studdert, M., (1976). Equine herpesviruses: type 3 as an abortigenic agent. *Australian Veterinary Journal* 52, 349–354.

- 
- Hall, A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41, 95–98.
- Hartley, C., Drummer, H., Studdert, M., (1999). The nucleotide sequence of the glycoprotein G homologue of equine herpesvirus 3 (EHV3) indicates EHV3 is a distinct equid alphaherpesvirus. *Archives of Virology* 144, 2023–2033.
- HBLB, (2017). Code of practice for Equine Coital Exanthema (Equine Herpesvirus - 3 Infection) [WWW Document]. (HBLB), Horserace Beating Levy Board. URL <http://codes.hblb.org.uk/index.php/page/156> (accedido 5.23.17).
- Heegaard, P.M.H., Fang, Y., Jungersen, G., (2016). Chapter 5 Novel Adjuvants and Immunomodulators for Veterinary Vaccines 1349, 63–82. doi:10.1007/978-1-4939-3008-1
- Hierholzer, J., Killington, R., (1996). Suspension assay method. *Virology Methods Manual* 39–40.
- Hussein, I.T.M., Field, H.J., (2008). Development of a quantitative real-time TaqMan PCR assay for testing the susceptibility of feline herpesvirus-1 to antiviral compounds. *Journal of Virological Methods* 152, 85–90. doi:10.1016/j.jviromet.2008.05.018
- Jacob, R., Steiner, M., (1988). Molecular pathogenesis of equine coital exanthema: identification and expression of infected cell polypeptides at the restricted temperature during equine herpesvirus 3 infection. *Veterinary Microbiology* 18, 363–371.
- Karlstrom, A.R., Kallander, C.F.R., Abele, G., Larsson, A., (1986). Acyclic Guanosine Analogs as Substrates for Varicella-Zoster Virus Thymidine Kinase 29, 171–174.
- Kirisawa, R., Toishi, Y., Akamatsu, A., Soejima, K., (2017). Isolation of equine herpesvirus 3 ( EHV- 3 ) from equine coital exanthema of two stallions and sero-epidemiology of EHV-3 infection in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79, 636–643. doi:10.1292/jvms.16-0518
- Kleiboeker, S.B., Chapman, R.K., (2004). Detection of equine herpesvirus 3 in equine skin lesions by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 74–79.
- Léon, A., Fortier, G., Fortier, C., Freymuth, F., Tapprest, J., Leclercq, R., Pronost, S., (2008). Detection of equine herpesviruses in aborted fetuses by consensus PCR. *Veterinary Microbiology* 126, 20–29.
- Losinno, L., (2015). Ecuestre online [WWW Document]. La transferencia embrionaria. URL

- 
- <http://www.ecuestre.es/temas-de-cria/noticias/articulo/la-transferencia-embrionaria#>  
(accedido 6.1.17).
- Maeda, K., Yasumoto, S., Tsuruda, A., Andoh, K., Kai, K., Otoi, T., (2007). Establishment of a Novel Equine Cell Line for Isolation and Propagation of Equine Herpesviruses. *Journal of Veterinary Medicine Science* 69, 989–991.
- Maxwell, L., Bentz, B., Bourne, D., Erkert, R., (2008). Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31, 312–320. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x.Pharmacokinetics
- Maxwell, L., Bentz, B., Gilliam, L., Ritchey, J., Eberle, R., Holbrook, T., McFarlane, D., Rezabek, G., MacAllister, C., Goad, C., y col., (2009). Efficacy of valacyclovir against disease following EHV-1 challenge, en: *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine*. p. 176.
- Maxwell, L., Gilliam, L., Pusterla, N., Carmichael, R., Eberle, R., Ritchey, J., Holbrook, T., Gull, T., Rezabek, G., McFarlane, D., MacAllister, C., (2011). Efficacy of delayed antiviral therapy against EHV-1 challenge, en: *Medicine, A.C. o. V.I. (Ed.), Annual Veterinary Medical Forum, American College of Veterinary Internal Medicine*. p. 6.
- Metcalf, E., (2001). The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Animal Reproduction Science* 68, 229–237.
- Monteverde, J., Garbers, G., De Carlo, J., (1960). Exantema coital en yeguas S. P.C. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata* 4, 37–38.
- Negussie, H., Li, Y., Tessema, T.S., Nauwynck, H.J., (2016). Replication characteristics of equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 3 : comparative analysis using ex vivo tissue cultures. *Veterinary Research* 1–11. doi:10.1186/s13567-016-0305-5
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., G. P. Allen, Davis-Poynter, N., (2006). Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of virology* 15, 4047–4060. doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006
- Osborne, V., Bain, R., (1961). Genital infection of a horse with spirochetes. *Australian Veterinary Journal* 37, 190.
- Outram, A.K., (2009). The Earliest Horse Harnessing and Milking. *Science* 323, 1332–1335. doi:10.1126/science.1168594
- Paccamonti, D., Pycock, J., (2009). Infertility and subfertility in the mare., en: Noakes, D.,

- 
- Parkinson, T., England, G. (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Saunders-Elsevier, London, pp. 582–631.
- Pagamjav, O., Kobayashi, K., Murakami, H., Tabata, Y., Miura, Y., Boldbaatar, B., Sentsui, H., (2011). Serological survey of equine viral diseases in Mongolia. *Microbiology and immunology* 55, 289–292. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00312.x
- Parkinson, T., (2009). Fertility, subfertility and infertility in male animals, en: Noakes, D., Parkinson, T., England, G. (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Saunders-Elsevier, London, pp. 705–764.
- Pascoe, R., (1981). The effect of equine coital exanthema on the fertility of mares covered by stallions exhibiting the clinical disease. *Australian Veterinary Journal* 57, 111–114.
- Pellet, P., Roizman, B., (2007). The family herpesviridae: a brief introduction., en: Knipe, D., Howley, P., Griffin, D., Lamb, R., Martin, M., Roizman, B., Straus, S. (Eds.), *Field Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 2480–2499.
- Razonable, R.R., Bobmphvft, J.E.F., Tfsjof, B.O.E., Joijcjupst, Q., (2011). Therapy Antiviral: Antiviral Drugs for Viruses Other Than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clinic Proceedings* 86, 1009–1026. doi:10.4065/mcp.2011.0309
- Reed, L., Muench, H., (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 27, 493–497.
- Seki, Y., Seimiya, Y.M., Yaegashi, G., Kumagai, S.-I., Sentsui, H., Nishimori, T., Ishihara, R., (2004). Occurrence of Equine Coital Exanthema in Pastured Draft Horses and Isolation of Equine Herpesvirus 3 from Progenital Lesions. *Journal of Veterinary Medicine Science* 66, 1503–1508.
- SENASA, (2017). Producción primaria: Equinos [WWW Document]. Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria. URL <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/equinos> (accedido 5.31.17).
- Sijmons, S., Vissani, A., Tordoya, S., Muylkens, B., Thiry, E., Maes, P., Matthijssens, J., (2014). Complete Genome Sequence of Equid Herpesvirus 3. *Genome Announcements* 2, 12–13. doi:10.1128/genomeA.00797-14.
- Slater, J., (2014). Equine herpesviruses, en: Sellon, D., Long, M. (Eds.), *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 151–168.
- Smith, K.O., Galloway, K.S., Hodges, S.L., Ogilvie, K.K., Radatus, B.K., Kalter, S.S., Heberling, R.L., (1983). Sensitivity of equine herpesviruses 1 and 3 in vitro to a new nucleoside analogue, 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxy] methyl] guanine.

- 
- American Journal of Veterinary Research 44, 1032–1035.
- Sofia, M., (2013). Nucleotide prodrugs for the treatment of HSV infection, en: De Clercq, E. (Ed.), *Advances in Pharmacology: Antiviral agents*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 39–66.
- Squires, E., (2009). Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? *Journal of Equine Veterinary Science* 29, 268–273.
- Stiles, J., Guptill-yoran, L., Moore, G.E., Pogranichniy, R.M., (2017). Effects of  $\alpha$ -Carrageenan on In Vitro Replication of Feline Herpesvirus and on Experimentally Induced Herpetic Conjunctivitis in Cats 49, 1496–1501. doi:10.1167/iov.07-1245
- Straus, S., Ostrove, J., Inchauspé, G., Felser, J., Freifeld, A., Croen, K., Sawyer, M., (1988). *Varicella-Zoster Virus Infections: Biology, Natural History, Treatment, and Prevention*. Annual Internal Medicine. 108, 221–237.
- Stud Book Argentino, (2002). Stud Book Argentino [WWW Document]. Reglamento del Stud Book Argentino. URL <http://www.studbook.com.ar/reglamento.htm> (accedido 6.1.17).
- Studdert, M., (1996). Equine coital exanthema (equine herpesvirus 3)., en: Studdert, M. (Ed.), *Virus Infections of Equines*. Elsevier, Amsterdam, pp. 39–46.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Tempesta, M., Buonavoglia, D., Sagazio, P., Pratelli, A., Buonavoglia, C., (1998). Natural reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Veterinary Record* 143, 200.
- Tempesta, M., Camero, M., Bellacicco, A.L., Tarsitano, E., Crescenzo, G., (2007<sup>a</sup>). Potent inhibition of genital herpesvirus infection in goats by cidofovir. *Antiviral Therapy* 12, 977–979.
- Tempesta, M., Camero, M., Bellacicco, A.L., Thiry, J., Crescenzo, G., Neyts, J., Thiry, E., Buonavoglia, C., (2007<sup>b</sup>). Cidofovir is effective against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Antiviral Research* 74, 138–141. doi:10.1016/j.antiviral.2006.11.001
- Tempesta, M., Crescenzo, G., Camero, M., Bellacicco, A.L., Tarsitano, E., Decaro, N., Neyts, J., Martella, V., Buonavoglia, C., (2008). Assessing the efficacy of cidofovir against herpesvirus-induced genital lesions in goats using different therapeutic regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 4064–4068.

---

doi:10.1128/AAC.00725-08

- Thi, T.N., Deback, C., Malet, I., Bonnafous, P., Ait-Arkoub, Z., Agut, H., (2006). Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research* 69, 152–157. doi:10.1016/j.antiviral.2005.11.004
- Thiry, E., (2006). Exanthème coital équin, en: *Virologie Clinique des équidés. Maladies Virales de la Reproduction et du Nouveau-né*. pp. 59–61.
- Timoney, P., (2014). Infectious diseases and international movement of horses, en: Sellon, D., Long, M. (Eds.), *Equine Infectious Diseases*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 544–550.
- Toishi, Y., Tsunoda, N., Kirisawa, R., (2017). Occurrence of equine coital exanthema (ECE) in stallions in Japan and effectiveness of treatment with valacyclovir for ECE. *The Journal of Veterinary Medical Science* 79, 632–635. doi:10.1292/jvms.16-0511
- Tsai, Y., Wang, H., Chang, H., Tsai, C., Lin, C., Teng, P., Su, C., Jeng, C., Lee, P., (2012). Development of TaqMan Probe-Based Insulated Isothermal PCR (iiPCR) for Sensitive and Specific On-Site Pathogen Detection. *PLoS ONE* 7, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0045278
- Uppal, P., Yadav, M., Singh, B., Prasad, S., (1989). Equine coital exanthema (EHV-3 virus) infection in India. *Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B* 36, 786–788.
- UTTA, 2015. *Unión de Trabajadores del Turf y Afines Gestión* 2015 11–15.
- van der Meulen, K., Caij, A., Smets, K., Nauwynck, H., (2006<sup>a</sup>). Equine coital exanthema in a mare in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 75, 286– 289.
- van der Meulen, K., Garré, B., Croubels, S., Nauwynck, H., (2006<sup>b</sup>). In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. *BMC veterinary research* 2, 13. doi:10.1186/1746-6148-2-13
- Vega, C., Bok, M., Chacana, P., Saif, L., Fernandez, F., Parreño, V., (2012). Egg Yolk IgY: Protection against Rotavirus induced Diarrhea and Modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 142, 156–169. doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.003.Egg
- Vega, C., Bok, M., Vlasova, A., Chattha, K., Gómez-Sebastián, S., Nuñez, C., Alvarado, C., Lasa, R., Escribano, J., Garaicoechea, L., Fernandez, F., Bok, K., Wigdorovitz, A., Saif, L., Parreño, V., (2013). Recombinant Monovalent Llama-Derived Antibody Fragments (VHH) to Rotavirus VP6 Protect Neonatal Gnotobiotic Piglets against Human Rotavirus-Induced Diarrhea. *PLoS pathogens* 9, 1–17.

- Wilkins, P.A., Papich, M., Sweeney, R., (2005). Pharmacokinetics of acyclovir in adult horses 15.
- World Organization for Animal Health, (2012). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases, en: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. pp. 34–51.
- World Organization for Animal Health, (2006). Validación y control de calidad de los métodos d reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, en: Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. OIE, pp. 25–32.
- Youngquist, R., Threlfall, W., (2009). Infertility and diseases of the reproductive tract of stallions., en: Youngquist, R., Threlfall, W. (Eds.), Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Elsevier Ltd, Philadelphia, USA, pp. 15–23.