

Virus de Influenza Equina y de la Rinoneumonitis
Viral Equina: Estudio de detección,
caracterización y de respuesta inmune en los
caballos de deporte del Uruguay

Edín Raúl Castro Janer

**Tesis remitida para cumplir con los requerimientos para el el grado de
Doctor (Ph.D.) en Salud Animal, Facultad de Veterinaria de la Udelar**

2017

Orientador: Prof. Dr. Juan Ramón Arbiza

Sección Virología

Facultad de Ciencias de la Udelar

Co-orientador: Prof. Dr. Andrés Gil

Asesor académico

Facultad de Veterinaria de la Udelar

RESUMEN

Los virus de herpesvirus equino (EHV) 1 y 4 y el virus de Influenza Equina (EIV), provocan cuadros clínicos respiratorios, aborto, neumonitis neonatal de los potros, o mieloencefalopatía y ocasionan importantes pérdidas socio-económicas a la industria equina.

El presente estudio plantea estimar la prevalencia, identificar los tipos de EHV's que circulan en el Uruguay y determinar el nivel de protección serológica frente a la infección por EIV en los equinos de deporte en el Uruguay.

Se comprueba que el virus EHV 1 se encuentra ampliamente distribuido en la población de equinos de deporte en nuestro país, con una prevalencia estimada del 29% (IC 95%; 27-31%) y la misma está asociada a factores como la raza y la vacunación contra la Rinoneumonitis Equina (RE), $p < 0,05$.

Los estudios moleculares confirman la presencia de la infección por EHV 1 y evidencian por primera vez la detección de EHV 4 y una alta frecuencia de detección de la variante neuropatogénica (G2254/D752) de herpesvirus equino 1 (EHV 1) en Uruguay.

Se observó una baja cobertura de vacunación contra la Gripe Equina (23%), y bajo nivel de protección virológica y clínica ((27% y 35% respectivamente) medidos por la prueba de SRH. Los mismos están asociados a equinos que no tienen vacunación vigente, a la raza árabe y cuarto de milla, a equinos menores a 2 años de edad y a los machos castrados.

SUMMARY

Equine herpesvirus Viruses (EHV) 1 and 4 and the Equine influenza virus (EIV) cause infections that may represent significant socio-economic losses for the equine industry.

This study proposes to estimate the prevalence, to identify the types of EHV's circulating in Uruguay, and to determine the level of serological protection against EIV infection in sport equines in Uruguay.

It is verified that the virus EHV 1 is widely distributed in the population of equines of sport in our country, with an estimated prevalence of 29% (IC 95% = 27-31%). It is observed that the presence of antibodies to EHV 1 is associated with factors such as race and vaccination against EHV 1 infection ($p < 0.05$).

Molecular studies confirm the presence of EHV 1 infection previously described in our country. It is evidenced for the first time detection of EHV 4 and it was detected a high frequency of EHV 1 neuropathogenetic variant (G2254/D752) in Uruguay.

Low coverage of vaccination (23%), and low SRH antibodies levels of virological and clinical protection were obtained (27% and 35% respectively). It is verified the greater susceptibility to infection by the virus H3N8, in equines who do not have current vaccination, in the Arab and Quarter of a Mile breeds, in equines younger than 2 years of age and in castrated males.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres el haber brindado con todo su amor lo mejor de sí para para que sus hijos tuvieran una infancia y adolescencia feliz.

Agradezco a Ruth por todo su amor como compañera y madre de nuestros hijos y también por su invaluable contribución en la redacción de este trabajo.

Agradezco a Elinor por su inestimable apoyo en la preparación de la defensa de tesis.

Agradezco a todos mis maestros, afortunadamente muchos, que me transmitieron valores y conocimientos para forjar mi espíritu crítico.

Agradezco a las autoridades, docentes y personal de la Facultad de Veterinaria del Uruguay por su apoyo durante toda mi trayectoria como estudiante de grado y de posgrado y como Colaborador Honorario de la entonces Cátedra de Ciencias Microbiológicas.

Agradezco a las autoridades, técnicos y personal de la Dirección General de los Servicios Ganaderos, lo que fue DILFA y a la actual DILAVE "M.C Rubino" del MGAP.

Agradezco a la Dra. Rosa Di Landro por consolidar mi formación técnica y mi espíritu crítico. Al Dr. Álvaro Núñez por permitir el uso de las instalaciones y equipamiento de la DILAVE para el desarrollo de la tesis.

Agradezco a los Dres. Juan Ramón Arbiza y Andrés Gil, por su desempeño como orientadores de la tesis y por su generosa y cordial disposición para alcanzar los objetivos del trabajo.

Agradezco a las Lics. Rosina Vilaró y Carolina Pintos, del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por su cooperación y asistencia en la revisión bibliográfica.

Deseo agradecer a la Dra. Maria Barrandeguy a la Lic. Aldana Vissani y a la Dra. Ann Cullinane por el envío de los reactivos de referencia y por su apoyo en el desarrollo del proyecto de tesis. Agradezco al Dr. Ruben Acosta por su asesoramiento y envío de muestras clínicas de equinos de deporte.

Agradezco a la Dra. Helena Guarino y al Dr. Néstor d'Anatros por facilitar la recolección de muestras del banco de sueros, y a la Dra. Adriana Pereda y Elizabeth Castro por la provisión de reactivos biológicos.. Al Dr. Jorge Murgia, Dra. Alexandra Caramelli y el personal de planta de faena del Frigorífico SAREL S.A, por su apoyo en la recolección de muestras de ganglios equinos.

También quiero agradecer a los veterinarios en el ejercicio liberal especialistas en equinos y a las secretarias de DILAVE, Adriana Barrios y Elisa Ferreira, por su colaboración en la búsqueda de datos de identificación de las muestras.

.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxrribonucleico
AHV	herpesvirus de asno
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CTL	Linfocito citotóxico
D	Ácido aspártico
EHV	Herpesvirus equino
EIV	Virus de Influenza Equina
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente enzimático
HA	Hemaglutinina
HI	Inhibición de la Hemaglutinación
IE	Influenza Equina
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgGb	Inmunoglobulina Gb
ISCOM	Complejo inmunoestimulante
M1 M2	Proteínas Matrix

MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
N	Asparagina
NA	Neuraminidasa
nm	Nanómetro
NP	Nucleoproteína
NS1 NS2	Proteínas no estructurales
PB1 PB2 PA	Complejo polimerasa viral
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
POL	Polimerasa viral
RE	Rinoneumonitis equina
SN	Seroneutralización viral
SNP	Polimorfismo nucleotídico simple
SPC	Sangre Pura de Carrera
SRH	Hemólisis Radial Simple
TRS/IRS	Secuencia de nucleótidos invertida y repetida
UL	Secuencia única larga
US	Secuencia única corta
WAHID	World Animal Health Information System

PUBLICACIONES

1. Castro ER, Murgia J, Caramelli A, Arbiza J (2016) Detection of equine herpesvirus in Uruguay. 10th S18 IEIDC Abstracts Journal of Equine Veterinary Science 39: S7eS19.
2. Castro ER, Gil AD, Arbiza J (2016) Estudio de seroprevalencia y de factores que afectan el nivel anticuerpos seroneutralizantes contra EHV 1 en equinos que participan en actividades hípico-deportivas en el Uruguay. Veterinaria 52 (201-204): 82-87.
3. Castro ER, Gil AD, Arbiza J (2017) Estudio de niveles de anticuerpos contra influenza equina por ensayo de hemólisis radial simple (SRH) y de factores asociados al nivel de protección contra gripe equina en la industria hípica en el Uruguay. Aceptado para publicar en Veterinaria en fecha: 2/6/17.
4. Castro ER, Arbiza J (2017) Detection and Genotyping of Equid herpesvirus 1 in Uruguay Aceptado para publicar en OIE Review, en fecha: 13/7/17.

CONTENIDO

RESUMEN	2
SUMMARY	3
AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	6
PUBLICACIONES	8
CONTENIDO	9
CAPÍTULO 1	12
Introducción	12
Herpesvirus equinos 1/4	14
Virus de Influenza Equina.....	37
Caracterización del problema	57
Objetivos	60
Objetivos generales.....	60
Objetivos específicos	60
CAPÍTULO 2	61
ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA Y DE FACTORES QUE AFECTAN EL NIVEL DE ANTICUERPOS SERONEUTRALIZANTES CONTRA EHV 1 EN EQUINOS QUE PARTICIPAN EN ACTIVIDADES HÍPICO- DEPORTIVAS EN EL URUGUAY.	61
Resumen	61
Abstract	62
Introducción	63
Materiales y métodos	64
Resultados	65
Discusión	69
Conclusión	72

CAPÍTULO 3.....	73
DETECCIÓN MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN DE HERPESVIRUS EQUINO EN URUGUAY.	73
Resumen	73
Summary	74
Introduccion	76
Material y metodos	78
Resultados	83
Discusión	86
CAPÍTULO 4.....	90
ESTUDIO DE NIVELES DE ANTICUERPOS SRH Y DE FACTORES ASOCIADOS AL NIVEL DE PROTECCIÓN CONTRA GRIPE EQUINA EN LA INDUSTRIA HÍPICA EN EL URUGUAY.	90
Resumen	90
Abstract	91
Introducción	92
Materiales y métodos	95
Resultados	98
Discusión	103
CAPÍTULO 5.....	109
DISCUSIÓN GENERAL	109
Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra EHV 1.	109
Factores asociados a seroprevalencia de infección por EHV 1.	110
Vacunación.....	110
Edad.....	110
Raza.....	111
Epidemiología molecular de herpesvirus equino en Uruguay.	111
Puesta a punto ensayos moleculares.....	111
Detección y genotipificación de EHV's en ganglios broncopulmonares de equinos en planta de faena.....	113

Estudio de inmunidad y de factores asociados al nivel de protección contra gripe equina en la industria hípica en el Uruguay.	113
Estudio de inmunidad protectora contra gripe equina.....	113
Estudio de factores asociados al nivel de protección inmunitaria contra gripe equina.	115
Edad.....	115
Raza.....	116
Sexo.....	116
CONCLUSIONES FINALES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	120

CAPÍTULO 1

Introducción

El equino (*Equus caballus*) es una de las especies animales domesticadas más antiguas; junto al hombre, ha evolucionado y cambiado su función y conformación en distintos momentos históricos y contextos sociales. Actualmente en nuestro país las funciones más importantes del equino son la de trabajo en tareas rurales, carga en áreas urbanas, deporte (carreras, polo, pato, salto, rodeo, equitación, enduro, raid, prueba de rienda) y espectáculo como la doma y las exposiciones (Gil y col, 2009).

La población equina en el Uruguay está comprendida por aproximadamente 400.000 animales con 30.000 tenedores; la mayor parte se distribuye en el norte del país, por su función como herramienta de trabajo rural. Aproximadamente la mitad está constituida por yeguas, pero no están siendo usadas como reproductoras; la población de potrillos y potrancas en el país es muy baja, debido a que los productores no tienen interés en aumentar el volumen de producción. A partir del año 2000 aumentó en forma casi lineal el número de los registros genealógicos en la Asociación Rural del Uruguay (Gil y col, 2009). Al mismo tiempo, la raza Sangre Pura de Carrera (SPC), también tuvo un fuerte incremento a partir del año 2002, probablemente por la reapertura del Hipódromo Nacional de Maroñas. En el año 2009, casi el 95% de las razas de la población equina en el Uruguay correspondían en primer lugar a la raza Criolla (75%), seguida por la raza Cuarto de Milla (12%) y la raza Árabe (7%). Sin embargo, en los últimos años se ha percibido un mayor dinamismo de algunas actividades asociadas al caballo, probablemente por la

mejora en las relaciones de precios del agro, el crecimiento de la actividad económica, el desarrollo del turismo rural, el resurgimiento de la actividad hípica o el avance de nuevos deportes como el enduro. Se estima que el stock total de equinos tuvo un leve descenso en los últimos años, aumentando la proporción de animales destinados a los deportes ecuestres y las razas funcionales. Según Ferrari (2012), la hípica es la actividad deportiva que nuclea la mayor cantidad de animales (39%), seguida por el del enduro (22%), el raid (11%) y el polo (5%). Por esta razón la raza SPC actualmente representa el segundo lugar de las razas equinas en el Uruguay.

Las exportaciones de equinos para actividades deportivas, recreativas o reproducción promedian 700 animales por un monto de U\$S 5 millones anuales, mientras que las exportaciones de carne alcanzan los U\$S 25 millones anuales (Ferrari, 2012).

No obstante lo anterior, la información estadística, al igual que los estudios a nivel nacional que aportan datos sobre las diferentes actividades que tienen como centro o actor fundamental al caballo, es escasa (Ferrari, 2012). Se estima que hay 112 Haras involucrando a 280 padrillos y 3.000 yeguas SPC. Por otra parte se cree que unos 2500 caballos en Montevideo y que aproximadamente unos 7500 en todo el país, se usan como medio de transporte de carga de recolección de residuos (Gil y col, 2009).

Las enfermedades respiratorias, reproductivas y neurológicas de causa viral de los equinos, constituyen una importante causa de pérdidas económicas en la actividad hípico-deportiva en nuestro país; siendo causadas esencialmente por

los virus de Influenza Equina (EIV) Herpesvirus equino 1 (EHV 1) y Herpesvirus equino 4 (EHV 4).

Herpesvirus equinos 1/4

Etiología

La familia Herpesviridae comprende un grupo de virus que afectan a mamíferos, aves y reptiles y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos virus comparten cuatro propiedades biológicas: (1) contienen un conjunto de enzimas vinculadas a la síntesis de ADN y proteínas, (2) la síntesis del ADN y el ensamblaje de las proteínas capsidales ocurre en el núcleo, (3) la producción de la progenie viral se acompaña por la destrucción de la célula infectada y (4) presentan la propiedad de persistir en forma latente en el hospedador. Los herpesvirus se clasifican en tres subfamilias en base a su rango de huéspedes, velocidad de replicación, velocidad de difusión, destrucción de la célula infectada y capacidad de establecer latencia primaria pero no exclusiva en los ganglios sensoriales. (i) los miembros de la subfamilia *alphaherpesvirinae* presentan alto rango de huéspedes, ciclos de replicación cortos, destrucción eficiente de las células infectadas y establecen una infección primaria latente, aunque no exclusivamente en los ganglios sensoriales; (ii) los miembros de la subfamilia *betaherpesvirinae*, presentan ciclos de replicación prolongados, infección progresiva lenta, frecuentemente causan citomegalia en las células infectadas y se puede constatar latencia en las glándulas secretoras, células linfocitocitarias, riñón y otros tejidos; y finalmente (iii) los miembros de la subfamilia *gammaherpesvirinae* que infectan solamente a la familia u orden del hospedador natural a la cual pertenecen,

producen infección lítica y la latencia se detecta en los tejidos linfoides (Annick, 2011).

En los équidos se han identificado ocho diferentes herpesvirus, cinco de ellos pertenecen a la subfamilia *alphaherpesvirinae* y tres a la subfamilia *gammaherpesvirinae*. El equino es el huésped natural de los *alphavirus* tipo 1; (virus del aborto equino, EHV 1), tipo 3 (virus del Exantema coital, EHV 3); tipo 4, (virus de la Rinoneumonitis equina EHV 4) y de los *gammaherpesvirus* tipo 2 (EHV2) y tipo 5 (EHV 5) (Davison y col, 2009). El asno es el hospedador del *alfaherpesvirus* de asno tipo 3, AHV-3 (homólogo al EHV 1) y AHV-1 (homólogo del EHV-3) y el *gammaherpesvirus* de asno tipo 2, AHV-2 (homólogo al EHV-2). Ultimamente se ha aislado un nuevo EHV 1 neurotrópico en las gacelas, señalando un aumento permanente de aparición de nuevos herpesvirus en équidos (Patel y Heldens, 2004).

Los virus herpesvirus equino 1 (EHV 1) y herpesvirus equino 4 (EHV 4) causan importantes pérdidas económicas (Lunn y col, 2009) y son los patógenos más importantes en la industria equina (Patel y Heldens, 2004). Los virus EHV-3 y EHV-2 provocan cuadros clínicos menos importantes como exantema genital venéreo autolimitante y rinoconjuntivitis leve, respectivamente (Patel y Heldens, 2004). Los virus EHV 1 y EHV 4 presentan antigenicidad cruzada, siendo la misma más fuerte entre AHV-3 y EHV 1, mientras que EHV-3 y AHV-1 por un lado y EHV-2 y EHV-5 por otro lado, también comparten antígenos, aunque en menor grado (Crabb y Studdert, 1995).

Los virus EHV 1 y EHV 4 causan cuatro tipos de cuadros clínicos bien diferenciados, a) una forma respiratoria que afecta principalmente a los potrillos

y generalmente es causada por EHV 4 (Allen y Bryans, 1986), b) aborto en yeguas, reconocido por primera vez por Dimock y Edwards en el año 1933, causado fundamentalmente por EHV 1 (Allen y col, 1983), c) muerte neonatal causada por infección intrauterina por EHV 1 y d) una forma neurológica que afecta a los adultos, causada por EHV 1 (Allen y Bryans, 1986) y una variante neuropatogénica de EHV 1 (Nugent y col., 2006) .

Estructura del virus

Los herpesvirus EHV 1 y 4 están constituidos por una cadena doble lineal de ADN genómico de 145-150 kilobases que consta de una secuencia única larga (UL) unida a otra secuencia única corta (US) flanqueada por una secuencia de nucleótidos invertida y repetida (TRS/IRS), lo cual permite que la región S se pueda invertir y formar, al igual que los demás herpesvirus del grupo d, dos isómeros en cantidad equimolar. Se ha publicado la secuencia completa de EHV 1 y EHV 4 y se han definido 76 genes homólogos en ambos virus (Telford y col., 1992, Telford y col., 1998). El grado de identidad genética entre EHV 1 y EHV 4 varía entre un 55 y 84%, mientras que la identidad en la secuencia de aminoácidos deducidos varía entre un 55 al 96%. Las proteínas que tienen mayor homología son las que están vinculadas con la replicación y empaquetamiento del ADN y la formación de la cápside, mientras que las mayores diferencias se encuentran en el extremo terminal 3' del gen 70 que codifica la glicoproteína G. Hasta 1981, EHV 1 y EHV 4 eran considerados como dos subtipos diferentes del mismo virus, pero una década después, mediante el uso de técnicas moleculares de fingerprinting, se comprobó que eran virus diferentes (Van Maanen, 2002).

El virus tiene un tamaño que oscila entre 150-160 nm de diámetro y tal como lo muestra la figura 1.1, su ADN está contenido por una cápside icosaahédrica constituida por 6 polipéptidos que se ensamblan para formar 162 unidades capsoméricas. La cápside está cubierta por una matriz proteínica llamada tegumento, la cual está envuelta por una membrana lipoproteica, (Davison y col, 2009).

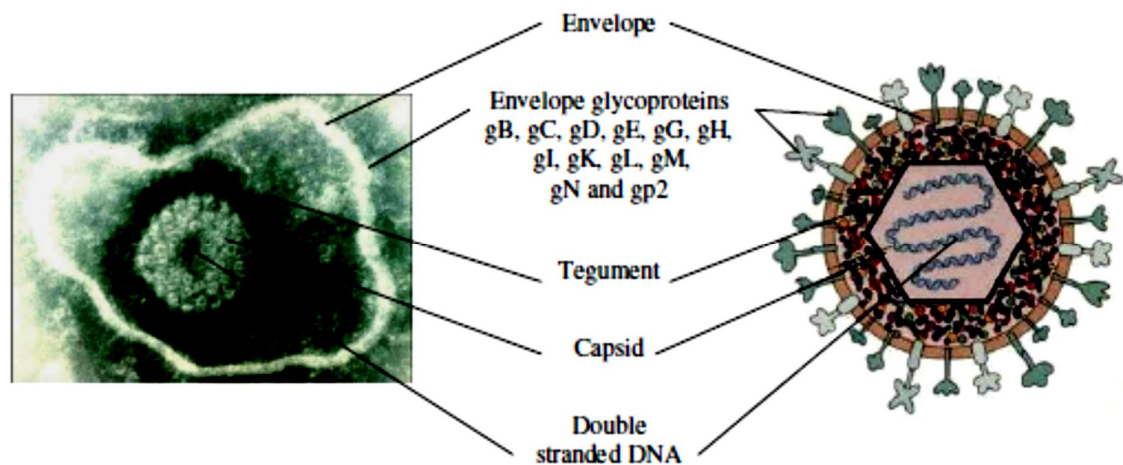


Figura 1.1 Fotomicrografía en microscopio electrónico a la izquierda; diagrama esquemático de EHV 1 a la derecha (Según Annick, 2003).

Se han identificado diferentes glicoproteínas en la membrana de envoltura (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gN y gp2) y están relacionados con los procesos de unión, penetración, egreso y dispersión célula a célula (Annick, 2011). Las glicoproteínas constituyen el blanco de los mecanismos de la respuesta inmune, debido a que se ubican en la envoltura viral y en la

membrana celular de las células infectadas y han sido motivo de estudio en la investigación de desarrollo de vacunas y reactivos diagnósticos (Van Maanen, 2002). Las gB y gD son glicoproteínas esenciales y están asociadas a los procesos de penetración y de fusión célula a célula. La gC juega un rol importante en las etapas tempranas de la infección y la gG es una proteína de unión a las quimoquinas CCL3 e IL8 y modula la inflamación pulmonar y la replicación viral de EHV 1. La gM está asociada a la entrada y a la propagación directa célula a célula del virus. Las gE, gK y gI facilitan la dispersión de la infección viral célula a célula. La gp2 no tiene similitud funcional con herpesvirus de otras especies, se piensa que tiene una función inmunomoduladora y de unión a la célula huésped (Annick, 2011).

Replicación viral

La replicación se realiza en varias etapas (ver figura 1.2). La unión de EHV 1 a la membrana de la célula hospedadora, está mediada por la interacción de las gB y gC, luego es necesario la interacción de un receptor de la membrana celular con la gD para lograr la fusión de ésta con la envoltura viral. Se ha demostrado que EHV 1 penetra a la célula por un mecanismo de fusión celular y también por endocitosis activado por las integrinas celulares y la gD.

Luego de la fusión de las dos membranas lipídicas, la nucleocápside es liberada al interior del citoplasma para luego ser transportada al núcleo de la célula a través de los microtúbulos de la célula. Ya en el poro del núcleo, se libera el ADN al interior del mismo, donde posteriormente se activan los procesos de replicación, transcripción y ensamblaje de las nuevas cápsides. Sin embargo, todas las proteínas virales son sintetizadas en el citoplasma. El

ADN viral es transcrito por la polimerasa II del hospedador con la participación de factores virales en todos los estadios de la infección. La transcripción del ADN viral es coordinada en fases temprana, media y tardía en forma de cascada. Muchos genes expresan enzimas o proteínas que se unen al ADN durante la replicación viral. En la etapa temprana el gen IR1 expresa el polipéptido principal IR1 que es una proteína reguladora que modula la expresión génica de los genes tempranos y tardíos e incluso inhibe a los genes promotores de la etapa. En la etapa media los genes codifican proteínas requeridas para la replicación viral, como la ADN polimerasa y otras enzimas (timidina quinasa). En la etapa tardía se expresan los genes que codifican las proteínas estructurales como los componentes de la cápside y las glicoproteínas de la envoltura. Al igual que la transcripción, la replicación del ADN viral se realiza en el núcleo de la célula huésped donde las nuevas cadenas se ensamblan con las proteínas capsidales sintetizadas en el citoplasma para formar la nucleocápside mediante el proceso de encapsidación. Dicho complejo se fusiona con la membrana nuclear y migra al citoplasma donde se agregan a la nucleocápside desnuda, los componentes del tegumento del virus. Por otro lado, las proteínas de la envoltura viral son transportadas por el retículo endoplásmico y se incorporan a la membrana celular a medida que pasan por la vía secretoria. Las nucleocápsides desnudas son cubiertas por la envoltura viral en el Complejo de Golgi y las mismas son liberadas a través de las vesículas secretorias mediante un proceso de fusión con la membrana celular (Annick, 2011).

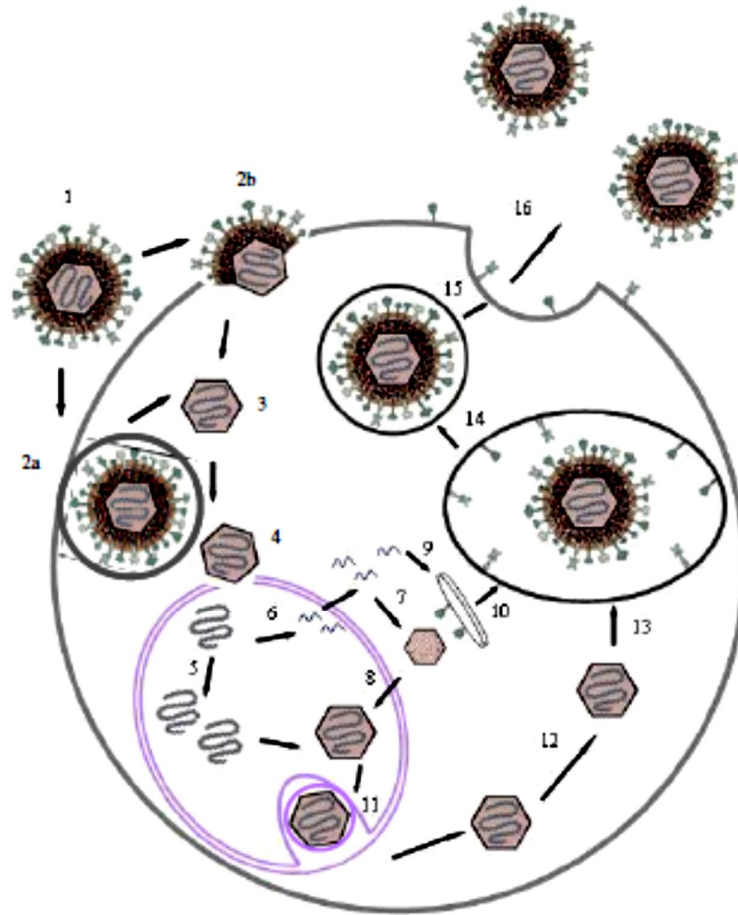


Figura 1.2 Ciclo de replicación de EHV 1/4 (Según Annick, 2003). Al comienzo los viriones se unen a la membrana celular (1) luego de la endocitosis (2a) y/o fusión (2b) de la envoltura viral con la membrana celular, la nucleocápside es liberada al citoplasma (3) y transportada al núcleo (4). La replicación (5) y la transcripción (6) del ADN ocurren en el núcleo, mientras los ARNm son transportados al citoplasma donde son traducidos a proteínas virales (7,9). Las proteínas capsidales son dirigidas al núcleo donde se realiza la encapsidación (8). Las proteínas de la envoltura son transportadas al retículo endoplásmico (10) y luego son incorporadas a la membrana celular mediante la vía secretoria. la nucleocápside atraviesa la membrana nuclear, pasa al citoplasma (12) en el aparato de Golgi adquiere su envoltura (13) y luego se libera de la célula mediante un mecanismo de exocitosis (14,15, 16).

Epidemiología

Estos virus se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo, probablemente la mayoría de los equinos se infectan durante las primeras etapas de su vida (Allen y Bryans, 1986; Borchers y col., 2006). Matsumara y col. (1992) detectaron EHV 4 en todas edades a partir del año de edad y EHV 1 a partir de los dos años sobre todo durante el invierno. Estudios epidemiológicos (Gilckerson y col, 1999a), evidenciaron que 12 horas después de la ingestión de calostro, un 24% de los potrillos son seropositivos para EHV 1 y un 100% son seropositivos para EHV 4. A los 90 días de edad el nivel de seropositividad para EHV 1 fue del 80%, indicando que la fuente de infección de EHV 1 procede de la madre o de otros potrillos lactantes. Footey col., (2004) detectaron por PCR, EHV 1 en secreciones nasales en 5 de 6 potrillos asintomáticos y EHV 4 en 7 de 44 potrillos que padecían enfermedad respiratoria de las vías altas. Estos hallazgos sugieren que los potrillos también pueden constituir una fuente de infección de un brote de EHV 1/4. En otro estudio realizado en Australia, antes de comenzar a usar la vacuna inactivada contra EHV 1/4, se halló una prevalencia de anticuerpos específicos para EHV 1 en yeguas y potrillos de un 26,2% y 11,4% respectivamente (Gilckerson y col., 1999b).

En muchos países la seroprevalencia de EHV 1/4 es muy alta, a pesar de que la misma no se puede determinar con exactitud debido a que la ausencia de pruebas serológicas tipo-específicas, que, sumado a la práctica de vacunación contra rinoneumonitis equina, dificultan la interpretación de los datos seroepidemiológicos. Sin embargo actualmente se disponen de kits de ELISA comerciales que pueden identificar anticuerpos específicos para EHV1 y

EHV4, los cuales pueden ser usados para estimar en forma específica las prevalencias de infección por virus EHV 1 y EHV 4.

Por ejemplo en 1993, usando un test tipo específico, se reportó por primera vez en Australia (Crabbs y Studdert, 1993), una prevalencia de 100% para EHV 4 y de 9% para EHV 1 en muestras de suero colectadas entre 1967-1974. En 1995, la seroprevalencia de anticuerpos específicos para EHV 1 aumentó al 30% (Crabbs y Studdert, 1995).

La latencia juega un papel epidemiológico muy importante en la propagación de la infección en la población susceptible (Harless y Pusterla 2006). Cuando el hospedador se infecta por primera vez, el virus persiste en forma latente en los ganglios linfáticos del tracto respiratorio, ganglio trigémino y en los leucocitos CD5+/CD8+ (Chesters y col., 1995). Meses o años después, el virus latente puede reactivarse y reiniciar la enfermedad, así como transmitirse a cohortes susceptibles. Debido a que la infección por EHV 1 ocurre en las primeras semanas o meses de vida, se asume que la reactivación de virus latente ocurre en las madres lactantes y el virus es transmitido a sus potrillos (Gilkerson y col., 1999b) y más adelante éstos pueden transmitir el virus a otras madres o potrillos (Gilkerson et al., 1997).

La estimación de la prevalencia de EHV 1 en base a la detección molecular es muy variable. Se encontró infección latente en el 87,5% de los nódulos linfáticos examinados y un porcentaje similar en los ganglios trigéminos en 40 equinos ingresados a plantas de faena (Edington y col., 1994). En Brasil se detectó ADN de EHV 1 en el 88% de las muestras de tejido, sangre periférica e hisopados nasales en 116 equinos (Carvalho y col., 2000). En otro estudio, la

prevalencia estimada de EHV 1 latente en ganglios linfáticos submandibulares fue del 54% (Allen y col., 2008). Actualmente se piensa que la mayor parte de los equinos presentan infección latente (Lunn y col., 2009).

El estado de latencia provee un reservorio permanente del virus y por lo tanto la erradicación de la infección por EHV's es impracticable, haciendo a la terapia y la vacunación menos eficaces (Allen y Bryans, 1986).

Se piensa que la infección subclínica de EHV 1/4 es frecuente y la misma jugaría un rol importante en la epidemiología de la enfermedad provocando la diseminación de la misma en poblaciones abiertas de equinos sometidas a stress y a la introducción de nuevos animales. Sin embargo, se ha demostrado que equinos expuestos al stress y animales sanos excretan virus en forma esporádica y a muy bajo nivel (Brown y col., 2007; Wang y col., 2007). Estas observaciones sugieren que la diseminación del virus entre los equinos adultos se acompaña con la aparición de síntomas clínicos (Lunn y col., 2009).

Por lo tanto, la infección viral se puede diseminar rápidamente ya sea por introducción de un virus exógeno o por reactivación del virus latente. En la figura 1.3 se ilustra esquemáticamente la epidemiología del EHV 1 y EHV 4.

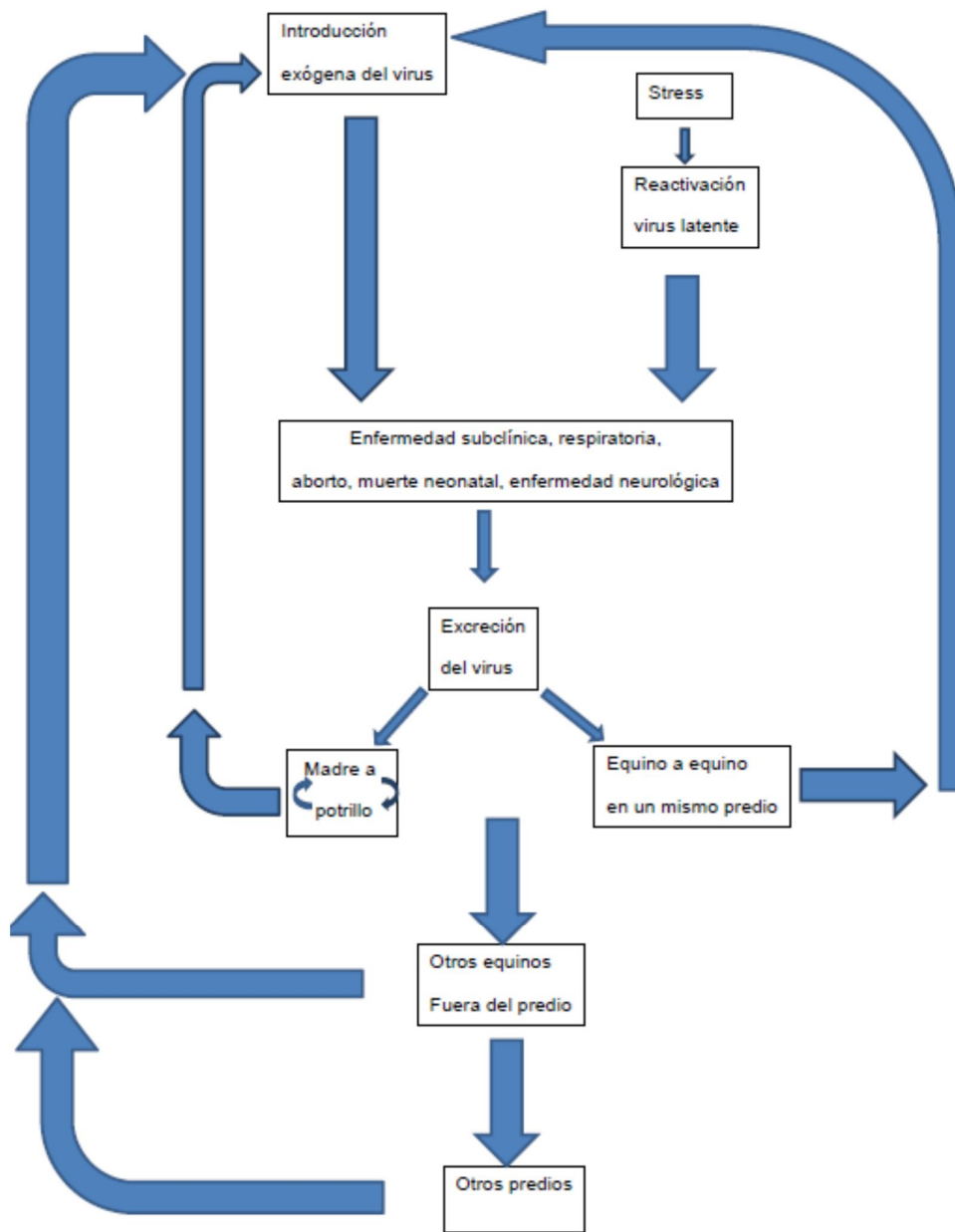


Figura 1.3 Representación esquemática de la epidemiología de EHV 1/4

Se han encontrado evidencias de transmisión horizontal por contacto directo o indirecto durante los brotes que inducen aborto y enfermedad neurológica (Drummer y col., 1995, Friday y col., 2000). Tampoco se puede descartar la transmisión por aerosoles, dependiendo de la cantidad de partículas virales

liberadas por la fuente, condiciones climáticas, dilución de los virus aerolizados y distancia entre los equinos (Van Maanen, 2002).

Patogenia

La puerta de entrada del virus es por contacto directo o por inhalación de secreciones infecciosas (Allen y Bryans, 1986, Harless, y Pusterla 2006). Posteriormente, el virus se replica en el epitelio del tracto respiratorio y se disemina por los vasos sanguíneos y ganglios linfáticos regionales (Kidd y col., 1994). A continuación, el virus infecta a las células mononucleares para establecer una viremia asociada a células durante 8-18 días (Edington y col., 1986). Las células mononucleares que pueden alojar el virus son los linfocitos T, los linfocitos B y los monocitos. Los linfocitos T CD8+ y los linfocitos B son las subpoblaciones que se infectan con mayor frecuencia (Wilsterman y col., 2010). Durante la viremia, la mayoría de las células infectadas no presentan glicoproteínas virales en sus membranas (Van der Meulen et al., 2007) y se piensa que las mismas no contienen virus infeccioso a causa de un bloqueo en la replicación viral hasta la activación de la misma (Annick, 2011).

Posteriormente, el virus es transferido de las células virémicas a las células endoteliales de los órganos blanco, mediante la activación de moléculas de adhesión de superficie presentes en ambas células (Smith y col., 2002).

La transferencia de EHV 1 de los leucocitos infectados a las células endoteliales de la placenta materna es el principal mecanismo de inducción del aborto y la infección de las células endoteliales del cordón umbilical representa la vía primaria de diseminación del virus al feto. Las células infectadas actúan como centro de desarrollo de lesiones necróticas focales (Annick, 2010). La

diseminación del virus con la consecuente extensión de la trombosis y daño isquémico del endometrio junto con la replicación viral en los tejidos del feto son los mecanismos que inducen el aborto (Edington y col., 1991). En la figura 1.4 se presenta una vista esquemática de la patogenia de los EHV.

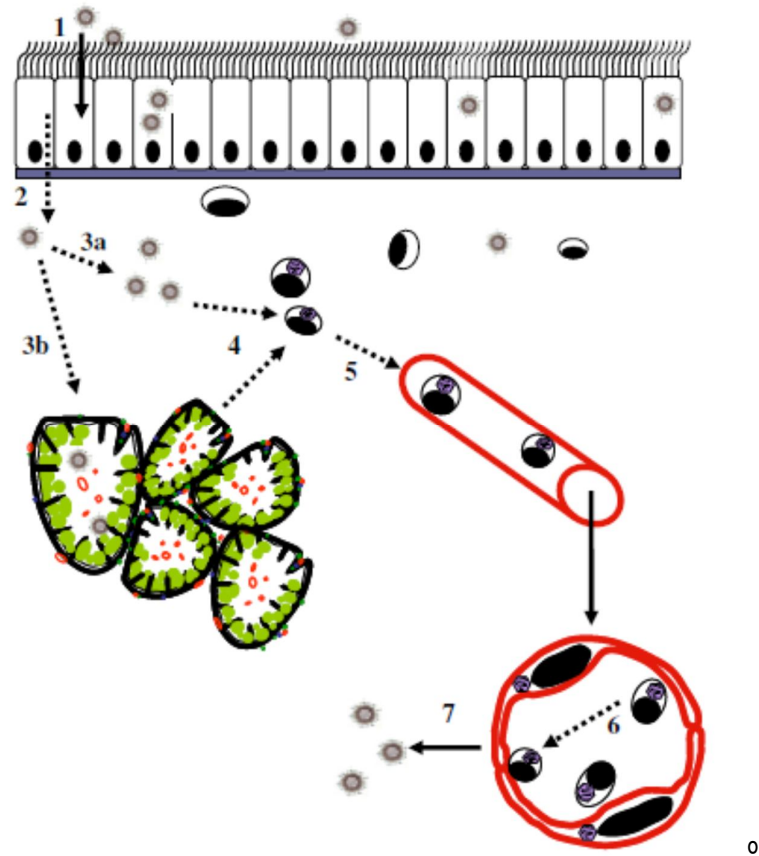


Figura 1.4. Vista esquemática de la patogenia de EHV (Según Annick, 2003). 1) unión/penetración y replicación del virus en el epitelio del tracto respiratorio; 2) diseminación del virus a través de la membrana basal; 3a) dispersión por el tejido conectivo y 3b) los ganglios linfáticos regionales; 4) infección de los leucocitos; 5) viremia célula asociada; 6) transferencia del virus a las células endoteliales de los órganos blanco; 7) replicación y diseminación del virus en los órganos blanco. Flechas con línea sólida: mecanismo conocido. Flechas con línea punteada: mecanismo desconocido.

La replicación de EHV 1 en el sistema nervioso causa la meningomieloencefalitis equina, provocando lesiones de vasculitis focal asociada con edema, hemorragia y trombosis con degeneración axonal mielínica secundaria (Mumford y Edington, 1980). Se sostiene que las lesiones pueden ser causadas por la circulación de inmunocomplejos, debido a que es raro realizar aislamiento viral en tejido nervioso. A su vez se ha comprobado mediante estudios de inmunofluorescencia, que el principal factor patogénico es el endoteliotropismo del virus, a diferencia de otros alfa herpesvirus que causan encefalitis debido a su neurotropismo, EHV 1 (Wilson, 1997).

Desde hace muchos años se piensa que hay diferentes cepas de EHV 1 que pueden causar cuadros de aborto, muerte perinatal o bien enfermedad neurológica; esto dependería de la capacidad de las mismas para establecer infección en los sitios endoteliales, en particular con el endometrio y el sistema nervioso central (Edington y col., 1986, Patel y col., 1982). La infección con cepas neurovirulentas generan cuadros clínicos severos con alta tasa de abortos y menos frecuentemente parálisis, mientras que las cepas no neurovirulentas provocan cuadros respiratorios de mediana intensidad, abortos esporádicos y no causan enfermedad neurológica (Smith y col., 1992, Smith y col., 2000). Se ha establecido que equinos inoculados con las cepas neurovirulentas desarrollan una viremia célula-asociada más prolongada que las cepas no neurovirulentas, lo cual elevaría el riesgo de manifestar cuadros neurológicos (Allen y Breathnach, 2006). Recientemente se ha demostrado que la variación de un simple aminoácido en polimerasa viral de EHV 1, está fuertemente asociada a la aparición de brotes neurológicos (Nugent y col., 2006). Al comparar aislamientos obtenidos en el transcurso de 30 años de

brotos nerviosos y no nerviosos, se encontró un polimorfismo nucleotídico simple (SNP) en la subunidad catalítica del gen de la polimerasa viral (POL), consistente en una sustitución de la asparagina (N) a ácido aspártico (D) en la posición 752 y correspondiente al sitio 2254 del ORF del gen de la polimerasa viral. Dicha mutación podría determinar la presencia signos neurológicos durante un brote de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de esta asociación, se han reportado casos clínicos nerviosos provocados por cepas no-neurovirulentas; por otra parte, también se han obtenido aislamientos de cepas neurovirulentas en brotes de aborto equino. Probablemente existan otros factores vinculados al ambiente y al hospedador que contribuyen a desencadenar los cuadros nerviosos (Fritsche y Borchers, 2010; Goehring y col., 2006; Perkinsy col., 2009; Pronosty col., 2010; Smith y col., 2010). En estos últimos años se han reportado un aumento en la frecuencia y en la severidad de los cuadros neurológicos (Friday y col., 2000; Lunny y col., 2009; Mc Cartany col., 1995; USDA, 2007; Van Maanen y col., 2001).

Diagnóstico

El aislamiento viral es el test de referencia (Lunn y col., 2009). El EHV 1 se puede aislar a partir de diversas líneas celulares, mientras que el EHV 4 tiene un rango limitado de líneas sensibles (Harless y Pusterla 2006). La muestra a remitir para realizar el diagnóstico depende del cuadro clínico, en los casos respiratorios se puede tomar muestras de hisopados nasales o nasofaríngeos (Ostlund, 1993, Pusterla y col., 2008a). En los casos clínicos de enfermedad respiratoria, reproductiva y neurológica se puede coleccionar sangre heparinizada a los efectos de detectar viremia célula-asociada. A su vez, el virus se puede detectar en los tejidos del feto abortado. Los resultados positivos al aislamiento

viral, se obtienen en 2-3 días, en las muestras que contienen alta carga viral. Sin embargo el aislamiento es difícil de lograr durante los brotes, porque ya el pico de eliminación de virus ocurrió y porque los anticuerpos locales presentes interfieren con el aislamiento viral (Van Maanen y col., 2001).

Actualmente se disponen de pruebas diagnósticas de mayor sensibilidad como la PCR convencional (Sharma y col., 1992; Van Maanen y col., 2001; Varrasso y col., 2001) y la PCR en tiempo real. Esta última, además de ser más sensible y específica, posibilita la cuantificación de la carga viral lo cual permite conocer la etapa de la enfermedad y evaluar, el riesgo de exposición y la respuesta terapéutica (Elia y col., 2006; Pusterla y col., 2009a; Pusterla y col., 2008b; Pusterla y col., 2009b). Además, se disponen de técnicas de genotipificación de PCR en tiempo real, que pueden distinguir rápidamente cepas neurovirulentas y no neurovirulentas de EHV 1 (Allen, 2007; Pusterla y col., 2009b).

Por otro lado, se puede realizar un diagnóstico serológico por las pruebas de seroneutralización y fijación de complemento mediante la detección de un aumento del título 4 veces superior, en muestras pareadas de suero del animal enfermo y de sus contactos, obtenidas en un intervalo de tiempo de 3 semanas (Kidd y col., 2006). Estos ensayos tienen la limitante de no poder distinguir EHV 1 de EHV 4, debido a su reactividad serológica cruzada (Hartley y col, 2005), exceptuando aquellas técnicas basadas en la detección con anticuerpos monoclonales del extremo C-terminal de la gG (Drummer y col., 1995).

Síntomas

En la figura 1.5 se ilustran imágenes de los diferentes cuadros clínicos provocados por la infección por EHV 1.



Figura 1.5. Diferentes cuadros clínicos de la rinoneumonitis equina. A) forma respiratoria; B) aborto; C) enfermedad neonatal; D) forma nervioso. (según Annick, 2011).

Forma respiratoria

La replicación primaria del virus en el tracto respiratorio se acompaña con síntomas respiratorios de mediana intensidad, de las vías aéreas superiores (Gibson y col., 1992), con eliminación de grandes cantidades de partículas virales por las descargas nasales. El período de incubación oscila entre 1-21 días post-infección (Gibson y col., 1992, Patel y col., 1982). Los potrillos pueden manifestar fiebre, descarga nasal mucopurulenta y adenomegalia ganglios regionales, mientras que los adultos muestran signos leves o son asintomáticos (Coggins, 1979). Se han reportado en forma esporádico casos graves que afectan al endotelio pulmonar causando edema pulmonar y muerte (Del Piero y Wilkins, 2001).

Aborto y enfermedad neonatal

La replicación secundaria de EHV 1 en el endotelio endometrial del útero es el principal causante de aborto y muerte neonatal (Edington y col., 1991). El período de incubación varía entre 6 días a 4 meses después de la infección respiratoria (Gleeson y Coggins, 1980, Mumford y col., 1987). El aborto puede ser precedido por un cuadro respiratorio en la madre, pero usualmente no se observan signos previos al aborto. A pesar de que las yeguas no quedan inmunes a infecciones posteriores, normalmente no ocurren abortos en gestaciones posteriores (Ostlund, 1993). El aborto ocurre en 1 o 2 yeguas, pero pueden aparecer tormentas de aborto mayor a un 50% de potrillos (Mumford y col., 1987; Van Maanen y col., 2000). Si la infección sucede al término de la gestación, la madre puede expulsar un potrillo vivo pero generalmente muere de septicemia a los 7 días de nacer (Murray y col., 1998). Los estudios de campo muestran que el 95% de los abortos ocurren en el último tercio de la gestación (Allen y Bryans, 1986).

Forma nerviosa

La replicación secundaria del EHV 1 en el endotelio vascular del sistema nervioso provoca desórdenes del sistema nervioso (Edington, 1986) y puede afectar a un solo animal o a un grupo. El período de incubación es de unos 6-10 días y se pueden manifestar o no, síntomas respiratorios previo a la aparición del cuadro nervioso (Carroll y Westbury, 1985). Los síntomas pueden variar desde ataxia leve hasta una parálisis completa con o sin parálisis vesical y/o rectal. (Van Maanen y col., 2001). En algunos casos se observa edema de los miembros posteriores y escroto, urticaria, torticolis y ceguera (Friday y col.,

2000). El pronóstico es favorable ya que se puede recuperar el nivel normal de desempeño físico, salvo en los casos en que la paresia persista por más de 24 horas, en los cuales se recomienda la eutanasia (Van Maanen y col., 2001).

Tratamiento

Debido a que no se disponen de drogas antivirales específicas, el tratamiento es sintomático. En los cuadros respiratorios, está indicado el reposo y el uso de antibióticos para evitar infecciones bacterianas secundarias. En los casos de abortos con expulsión completa del feto y la placenta, no es necesario ningún tratamiento excepto una apropiada higienización del área perineal y miembros posteriores para evitar contaminación ambiental (Ostlund, 1993; Van Maanen, 2002). Los casos de neonatos nacidos débiles, el tratamiento de sostén no es efectivo y los potrillos mueren de septicemia a los pocos días del nacimiento (Murray y col., 1998; Van Maanen, 2002).

Los equinos que manifiestan signos nerviosos, deben recibir terapia de sostén intensiva y ser alojados en boxes provistos de cama apropiadas hasta que se revierta la ataxia. Los que sufren de ataxia severa y no se pueden incorporar deben ser sostenidos con hamacas de sostén. En los casos de que haya parálisis vesical y rectal, se debe practicar cateterización vesical y evacuación rectal (Friday y col., 2000; Mc Cartan y col., 1995). Los animales que no se puedan incorporar o no se puedan sostener con una hamaca, deben ser mantenidos en posición esternal, facilitando el acceso a la comida y el agua. El uso de corticosteroides debe ser realizado por períodos cortos, porque son inmunosupresores y pueden aumentar la descarga viral al ambiente con el consiguiente contagio de animales susceptibles. (Edington y col., 1985).

Inmunidad

A pesar de la práctica de la vacunación, los herpesvirus equino 1 y 4 son la principal causa de aborto, infección de sistema respiratorio superior y sistema nervioso (Kydd y col., 2006). Aun no se conocen con precisión los elementos que participan en la respuesta inmune protectora. No se ha demostrado en forma consistente que altos niveles de anticuerpos circulantes en la sangre se correlacionen con la protección frente a una infección natural o experimental. Las vacunas inactivadas pueden inducir altos títulos seroneutralizantes que reducen la cantidad y duración de descarga de virus por la mucosa epitelial (Breathnach et al., 2001), pero fallan en inducir respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T (CTL) la cual es considerada como el factor primordial para limitar la infección viral (Kydd y col., 2003; Minke y col., 2004). A semejanza de otras infecciones respiratorias virales, el factor primario que determina la inmunidad protectora frente a EHV 1/4, es la inmunidad celular y la inmunidad humoral local de las mucosas respiratorias (Harless y Pusterla, 2006). Durante la infección natural, el EHV 1 induce una respuesta inmune local que excluye al virus de la puerta de entrada epitelial de las vías respiratorias. Sin embargo, ninguna vacuna a virus inactivado y atenuado induce la formación de anticuerpos en la mucosa (Breathnach y col., 2001), ni tampoco induce protección frente a la viremia inducida por EHV 1. Por otra parte, se ha reportado que el uso de vacunas reduce la replicación y descarga viral por el tracto respiratorio, e induce protección significativa frente al aborto y desórdenes neurológicos provocados por la infección viral (Heldens y col., 2001; Van der Meulen y col., 2007).

Estudios de casos-controles realizados con la vacuna comercial Duvaxyn EHV 1/4®, han demostrado que la misma reduce los síntomas clínicos, la aparición de abortos y la duración y cantidad de descarga viral (Foote y col., 2002; Heldens y col., 2001). Sin embargo, en condiciones de campo, la vacunación no impide la circulación de EHV 1/4 (Foote y col., 2006). Ensayos de eficacia realizados con la vacuna inactivada Pneumoabort K® arrojaron resultados contradictorios, mientras unos autores no hallaron diferencias en la respuesta febril, signos clínicos y aborto entre las yeguas gestantes vacunadas y las madres yeguas controles luego del desafío viral (Bürki y col., 1990), otros investigadores demostraron una reducción significativa en los síntomas clínicos, duración de la viremia y en la descarga viral en los equinos vacunados (Goehring y col., 2010).

Las vacunas a virus vivo modificados estimulan la respuesta citotóxica y la producción de anticuerpos en la mucosa confiriendo desarrollo de una rápida y duradera inmunidad. Patel y col., (2004) han descrito que potrillos de 1,4-3,5 meses de edad, seropositivos a anticuerpos maternos, vacunados con una sola dosis de una vacuna modificada termosensible, presentaban protección parcial, aunque significativa, frente al desafío intranasal a las 8 semanas post-vacunación. También comprobaron protección en equinos adultos gestantes y en yeguas, frente al desafío intranasal con EHV 4 y EHV 1 hasta seis meses post-vacunación. Sin embargo, estas vacunas a virus vivo modificadas, tienen el inconveniente de tener el poder potencial de revertir la virulencia (Minke y col., 2004) y de inducir aborto (Bürki y col., 1990).

Las vacunas vivas recombinantes ofrecen la ventaja de reducir los síntomas clínicos y la viremia célula asociada (Soboll y col., 2010). Sin embargo las

mismas no generan una protección completa, inducen respuesta humoral pero sin estimular la respuesta citotóxica. También se han desarrollado vacunas de ADN y vacunas con genes deletados, pero aún se encuentran en una fase experimental y no están disponibles en el mercado.

Las nuevas vacunas deberían inducir una respuesta inmune local fuerte en el tracto respiratorio, impedir el establecimiento de latencia y su respuesta no debería ser interferida por la presencia de anticuerpos maternos (Harless y Pusterla, 2006).

En caso de vacunar a los potrillos es recomendable: 1) vacunar a la madre durante el quinto, séptimo y noveno mes de gestación, 2) revacunar a la madre 4-6 semanas antes de la gestación, 3) comenzar a vacunar a los potrillos a partir de los 4-6 meses de edad con tres dosis de vacuna a intervalos de 3-4 semanas y posteriormente revacunar cada 3 a 6 meses (Harless y Pusterla, 2006).

Manejo y prevención de brotes

Para prevenir la aparición de la enfermedad, se deben implementar medidas que tengan por objeto impedir la entrada del virus exógeno y eliminar factores que aumenten el riesgo de reactivación del virus latente, como el stress (Ostlund, 1993; Van der Meulen y col., 2007). La separación de los equinos por edad es una de las mejores tácticas para limitar la dispersión del virus en el establecimiento; en particular las yeguas gestantes deben ser separadas de los potrillos y de los equinos que están en tránsito en la granja. Lo ideal es que las madres gestantes estén subdivididas en grupos pequeños de acuerdo con la fecha de parición (Ostlund, 1993). El personal debe manejar primero a las

madres gestantes y luego a las otras categorías. Se debe practicar una cuarentena de 3 semanas a los equinos que ingresan al predio (Allen y Bryans, 1986; Ostlund, 1993); deben implementarse programas de vacunación y evitar en la medida de lo posible el stress (hacinamiento, mala alimentación, ruptura de grupos sociales establecidos, destete, transporte por largas distancias, parasitosis, etc) a toda la población susceptible de la granja (Ostlund, 1993; Harless y Pusterla, 2006).

A los efectos de minimizar los daños provocados por la aparición de un brote, se debe enfatizar el diagnóstico rápido, tomar medidas para evitar la dispersión del brote (aislamiento, cuarentena, desinfección, bioseguridad) e implementar tratamiento apropiado de los casos clínicos (Allen, 2002; Pusterla y col., 2009c). En caso de aparición de un brote, la vacunación de la población con mayor riesgo de infección, es una medida controvertida ya que algunos autores la recomiendan porque disminuye la diseminación de la infección y otros la desaconsejan porque sostienen que la vacunación frecuente aumenta el riesgo de provocar encefalomielitis equina (Henninger y col., 2007), aunque esto debe ser tomado con cuidado debido a que la población con múltiples vacunaciones es mayor de 5 años, siendo la edad un factor de riesgo para el desarrollo de la forma neurológica de la enfermedad (Goehring y col., 2006).

Situación en nuestro país.

Esta enfermedad ha sido clínicamente diagnosticada desde hace muchos años y se piensa que es endémica en el país al igual que otros países de la región.

En el año 2009, Easton y col., describen por primera vez en el Uruguay, la detección de EHV 1 mediante pruebas inmunohistoquímicas y moleculares, en

muestras de tejidos de un feto abortado. La vacunación en equinos destinados a actividades hípicas es obligatoria.

Virus de Influenza Equina

Etiología

El virus de Influenza Equina (EIV) es uno de los agentes más importantes cuasantes de enfermedad respiratoria infecciosa en equinos y la continua evolución del virus junto con el aumento del movimiento internacional de equinos de deporte provocan un alto número de brotes epidémicos con importantes pérdidas económicas (Timoney 1996). Por ejemplo el brote ocurrido en Australia en el 2007 ocasionó un costo de AU\$560,000 por día en medidas de contingencia del brote y pérdidas de AU\$3,35 millones por día a la industria equina (Callinan, 2008) estimándose el costo total en un billón de dólares australianos (Garner, 2011). Este agente viral se ha extendido por todo el mundo excepto a Nueva Zelandia e Islandia. En los países donde su distribución es endémica, la aplicación de vacuna inactivada conteniendo cepas de virus epidemiológicamente relevantes, es obligatoria.

Estructura del virus

El virus de Influenza Equina es un miembro de la familia *orthomyxoviridae*, género *influenzavirus* (Van Maanen, 2002). Su tamaño es de 100 nm y presenta forma esférica o pleomórfica. Tal como lo muestra la figura 1.6, su genoma está constituido por ocho segmentos de cadena simple de ARN de polaridad negativa de 13,6 kb. (Van Maanen y Cullinane 2002).

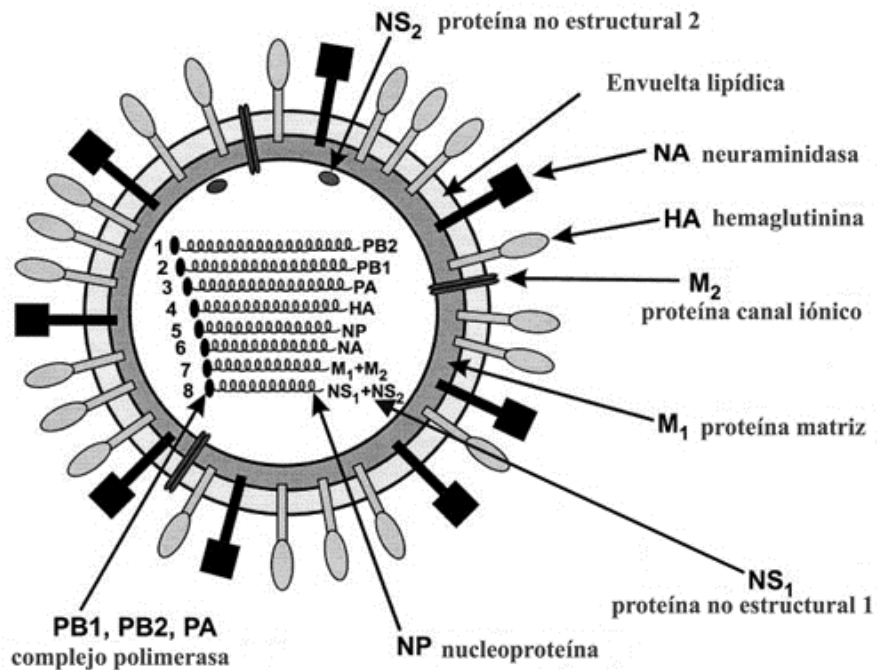


Fig. 1.6 Estructura del virus de influenza tipo a (fuente: Cuevas-Gonzalez, 2009).

Presenta alta variabilidad genética; en virtud de ser segmentado, puede recombinarse genéticamente durante la infección viral mixta, lo cual le confiere la capacidad de transmisión interespecie. Los segmentos 4 y 6 que codifican las glicoproteínas de superficie de hemaglutinina y neuraminidasa causan los mayores cambios antigénicos del virus, lo que se conoce como deriva genética -antigenic shift- (Studdert, 1996). Se reconocen cinco proteínas estructurales y cinco proteínas no estructurales. Tres proteínas no estructurales (PB1 PB2 y PA) constituyen el complejo polimerasa y las otras dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) restantes se sintetizan durante la replicación viral. Las proteínas estructurales nucleoproteína (NP) y Matrix (M1 Y M2) determinan la especificidad de tipo A, B y C. Los anticuerpos contra estas proteínas no

son protectores, aunque inducen inmunidad celular. Los virus pertenecientes al tipo A tienen la particularidad de tener un alto rango de huéspedes (hombre, aves, cerdos, equinos), mientras que el tipo B afecta solo a humanos y focas y el tipo C a humanos y cerdo. EIV se ha tipificado como de tipo A. La envoltura viral está constituida por dos proteínas de superficie, la Hemaglutinina (HA) que es un trímero y la Neuraminidasa (NA) que es un tetrámero, ocupan el 25% y el 10% de la masa proteica, respectivamente. La HA es la mayor proteína de la envoltura viral, tiene la propiedad de aglutinar eritrocitos y se sintetiza como un único polipéptido que se desdobra en dos cadenas HA1 Y HA2 unidas por puentes disulfuro, durante la replicación viral (Wilson, 1980). La misma se une a receptores que contienen ácido siálico a la membrana celular de la célula huésped. La HA es el principal blanco de la respuesta inmune protectora y por lo tanto es el componente fundamental a considerar en la formulación de las vacunas (Lewis y col, 2011).

La NA es la segunda gran glicoproteína de la envoltura viral y juega un rol importante en la liberación del virus de la membrana celular, así como en la lisis del mucus epitelial facilitando la entrada del mismo al hospedador.

Ambas proteínas determinan la especificidad de subtipo (16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA). En los equinos solo se han reportado dos subtipos diferentes el H7N7 Y EL H3N8. Mutaciones en al menos cuatro sitios antigénicos de la secuencia de aminoácidos de la HA, pueden originar variantes antigénicas que permiten al virus, escapar de la acción de los anticuerpos seroneutralizantes y este mecanismo se conoce con el nombre de deriva antigénica o antigenic drift (Daly y col, 1996). Si bien la NA presenta variabilidad antigénica, la misma no es tan importante como en el caso de la HA. Como consecuencia de la deriva

antigénica de EIV, si la vacuna no contiene cepas de virus actualizadas, la misma pierde capacidad protectora y en consecuencia, la infección en un animal parcialmente inmunizado produce eliminación de virus con el consiguiente riesgo de infectar a otros huéspedes susceptibles (Lewis y col, 2011).

Epidemiología

La gripe o Influenza Equina es una infección respiratoria aguda de los caballos, asnos y mulas causada por dos subtipos distintos del virus de la influenza A (el H7N7, antes llamado Equi-1 y descrito en Praga en 1956 y el H3N8, antes llamado Equi-2 y reportado en Miami en 1963. Los virus del subtipo H7N7 no se han aislado desde los años 80. También se ha informado de la infección de cebras, perros y humanos. Inicialmente, H3N8 circuló como una simple línea filogenética (Kawaoka, 1989), hasta que a finales de la década de 1980 se generaron dos líneas filogenéticas (Daly y col, 1996), que según el lugar de aparición se denominaron líneas americanas y euroasiáticas. Posteriormente Lai y col. (2001), reportaron que la línea americana había evolucionado formando tres sublinajes genéticos: linaje Sudamericano, linaje de Kentucky (correspondiente al linaje americano descrito por Daly en 1996) y el linaje Florida. Finalmente, el sublinaje Florida evolucionó en dos clados (OIE, 2008): el clado 1 representado por cepas americanas tipo A/eq/wisconsin/03 y el clado 2 representado por cepas euroasiáticas tipo A/eq/newmarket/03 (ver figura 1.7).

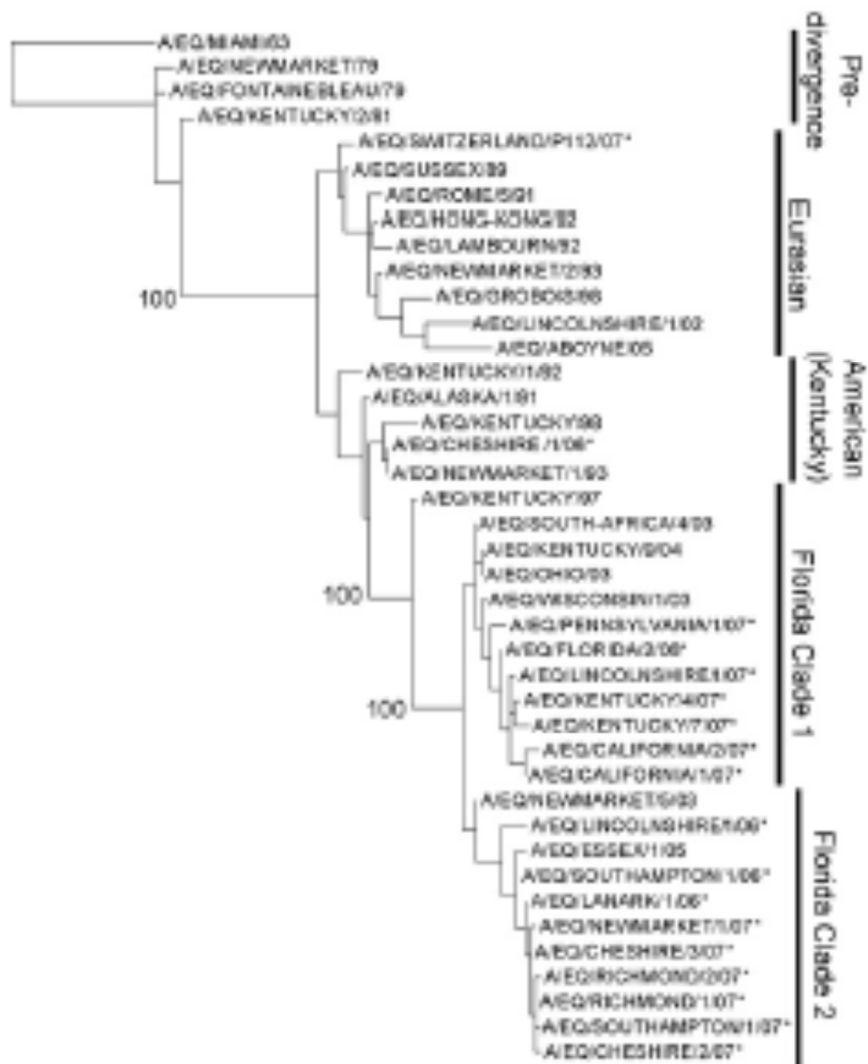


Figura 1.7. Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos del segmento HA1 del virus H3N8 (Fuente: Bryant y col, 2009).

Estas formas de evolución múltiple no son causadas por barreras geográficas, ya que pueden cocircular diferentes linajes en un mismo lugar, probablemente debido al aumento del transporte internacional de equinos. Por ejemplo, en el año 1993 en la localidad de Newmarket, se reportó el aislamiento simultáneo de cepas americanas y euroasiáticas (Daly y col, 1996). Se piensa que las líneas americanas son más dominantes, debido a que en América del Norte

solo se registró un solo aislamiento de origen euroasiático denominado A/equi/Saskatoon/1/90 (Oxburg y col, 1999). Contrariamente a lo sostenido por esta hipótesis, Koelle y col, (2010), mediante el uso de modelos de simulación evolutivos y ecológicos, demostraron que el predominio de las cepas americanas aisladas en Europa se debía a un debilitamiento en la vigilancia cuarentenaria con la consecuente introducción de estas cepas a Europa. Otra característica de los aislamientos de H3N8 es la de presentar una menor tasa de evolución que el subtipo H3N2 de humanos, siendo del orden de 2,1 nucleótidos por año, manteniendo una tasa de cambio constante en el período 1968-2007, siguiendo la misma vía de evolución múltiple que la del virus de Influenza tipo B (Lewis y col, 2011).

Normalmente, la gripe se extiende rápidamente en una población susceptible. La enfermedad es endémica en América y Europa (Bryant y col, 2009) y se presenta en forma ocasional en India (Virmani, 2010), Sudáfrica (Guthrie, 1999) y Japón (Yamanaka, 2008). Hasta el presente, solo Nueva Zelanda e Islandia se han declarado países libres de la enfermedad (OIE, 2016).

En los últimos años, la infección se ha introducido en Australia (2007) y se ha reintroducido en Sudáfrica (2003) y Japón (2007). Entre los años 1978 y 1981 se han registrado brotes provocados por H3N8 en Europa y en Norte América afectando equinos vacunados y sin vacunar (Borrows y col, 1979, Borrows y Denyer, 1982). Las epidemias mayores ocurrieron en Sudáfrica y en la India en 1987 y en Australia en el 2007 debido a la importación de equinos procedentes de Europa y Norteamérica, (Kawaoka y col, 1989, Uppal y col, 1989, Hannant y Mumford 1996, Calinan, 2008). En 1989, se registraron brotes epidémicos en Europa causados por virus H3N8 antigénicamente diferentes a las cepas

vaccinales provocados por la deriva antigénica (Van Maanen y col, 2002). En ese mismo año, en China, se reportaron brotes causados por cepas H3N8 muy diferentes y estrechamente relacionadas con cepas aviarias (Guo y col, 1990) y posteriormente en la misma región, en los años 1993-94 ocurrieron brotes más severos (afectando a un millón y medio de equinos y con una mortalidad del 30%) originados por virus H3N8 estrechamente relacionados con los aislamientos europeos de 1991 (Guo y col, 1995).

Transmisión

El virus de Influenza Equina se transmite por inhalación de secreciones respiratorias y es muy contagioso. También se puede transmitir a través de fomites y equipos contaminados. El período de incubación es corto (1 a 5 días) y la tos contribuyen a la rápida expansión de la enfermedad en poblaciones susceptibles la morbilidad puede llegar al 100%. A pesar de que la principal vía de transmisión es mediante los aerosoles generados por la tos de los equinos enfermos, los vehículos de transporte y el personal contaminados, también contribuyen a la rápida difusión de la enfermedad. En estas últimas décadas el transporte de equinos subclínicamente infectados ha jugado un papel muy importante en la diseminación de la infección sobre largas distancias (Van maanen, y Cullinane, 2002). Otro factor importante en la transmisión de la enfermedad es la variabilidad antigénica del virus (deriva antigénica). Si las vacunas no contienen antígenos epidemiológicamente importantes y actualizados de EIV, los animales vacunados quedan inmunizados parcialmente, presentando infección subclínica, excretando el virus infeccioso y pudiendo infectar a otros huéspedes susceptibles.

Patogenia

El virus ingresa al huésped por vía respiratoria y la NA viral hidroliza el mucus bronquial permitiendo el contacto con el epitelio (Mastrovich y col, 2004) . La HA viral se une a los receptores de la membrana celular y penetra a la célula mediante endocitosis. El pH ácido del endosoma facilita la liberación de la nucleocápside y su pasaje al núcleo donde se sintetizan los ARN mensajeros y virales (Shapiro y Kruger, 1988). La HA, la NA y la proteína M2 sintetizadas son transportadas por el Aparato de Golgi para anclarse en la membrana citoplasmática, mientras que la proteína M1 interviene en el ensamblaje de la nucleocápside (Zhang y col, 2000). Los nuevos viriones emergen de la membrana citoplasmática apical por brotamiento y se desprenden de las células mediante la lisis de los sitios de unión de ácido N-acetilneuramínico de las glicoproteínas de la membrana celular y las glicoproteínas virales. La infección viral conlleva a la muerte celular por apoptosis (Van Maanen, y Cullinane, 2002). En un lapso de tres días la infección se extiende por todo el tracto respiratorio causando descamamiento del epitelio bronquial y la regeneración del mismo tarda unas tres semanas. Consecuentemente pueden ocurrir complicaciones, especialmente cuando el animal afectado no hace reposo (Folsom y col, 2001), como infección bacteriana, bronquitis alérgica, bronquiolitis y riesgo de padecer enfermedades crónicas obstructivas (Coggins, 1979).

Síntomas

Los signos clínicos característicos son fiebre, tos seca y corrimiento nasal (Van Maanen, y Cullinane, 2002). El período de incubación varía de 1-5 días,

dependiendo de la carga viral y del estado inmune del hospedador (Gildea y col, 2011). Los períodos de incubación más prolongados están asociados a virus de menor virulencia que requieren varios ciclos replicativos para poder causar signos clínicos. La mayor descarga de virus ocurre en las primeras etapas de la enfermedad cuando la tos es severa. Puede haber equinos subclínicamente infectados, los cuales representan un factor muy importante en la diseminación de la enfermedad porque habitualmente no se los puede identificar. El transporte internacional de equinos subclínicamente infectados ha provocado severos brotes en Sudáfrica, India, Hong Kong y Australia (Daly, 2004, Calinan 2008).

Diagnóstico

Se puede realizar un diagnóstico clínico de la enfermedad en poblaciones inmunológicamente vírgenes, pero en los casos en que se presenta inmunidad parcial, se debe realizar diagnóstico de laboratorio, que consiste en la detección directa de antígeno o ácido nucleico viral y en la seroconversión en muestras de sangre colectadas en un intervalo de 21-30 días. Las pruebas serológicas usadas son la inhibición de la hemoaglutinación (HI) y la hemólisis radial simple (SRH). Estudios comparativos entre ambas técnicas han evidenciado que la prueba de SRH presenta mayor sensibilidad y reproducibilidad que la HI (Mumford, 2000 y Daly, 2007). Un aumento cuatro veces mayor en la prueba de HI o un aumento del 50% o de 25 mm² del área de hemólisis en la prueba de SRH se considera como evidencia de infección (OIE 2016 , y Newton, 2000).

El aislamiento viral en huevo embrionado o en línea celular MDCK a partir de exudados nasofaríngeos y la identificación viral por prueba de HA-HI, son las pruebas de referencia (OIE, 2016). El aislamiento viral es una técnica muy laboriosa, a veces se necesitan semanas para obtener resultados; depende mucho de la concentración de virus en la muestra y de su viabilidad biológica (Daly y col, 2004). Livesay y col. (1993) reportaron que el aislamiento viral presentaba una sensibilidad de un 50% frente al diagnóstico serológico con muestras pareadas. El aislamiento en MDCK es menos permisivo y puede presentar baja sensibilidad cuando se trata de detectar ciertas variantes del virus (Hannant y Mumford, 1996).

En estos últimos años se han desarrollado técnicas para realizar detección de antígenos (Cook, 1988) y ácidos nucleicos virales (Quinlivan y col, 2005; Heine y col, 2007) que ofrecen las ventajas de ser más rápidos y aplicables para la detección clínica y subclínica. También se han usado Kits de detección rápida de gripe humana, que son aplicables para el diagnóstico de Influenza Equina debido a que las nucleoproteínas de los virus de ambos hospedadores comparten antígenos comunes (Chamber y col, 1994). Además, la detección molecular por PCR es un método que presenta alta sensibilidad, no requiere virus viable (a diferencia del aislamiento viral) y permite caracterizar y detectar la deriva antigénica del virus mediante la secuenciación directa del gen de la HA (Ilobi y col, 1998). Estudios comparativos entre las técnicas de detección directas de Elisa, PCR y aislamiento viral evidenciaron que el PCR en tiempo real resultó ser la prueba más sensible (Quinlivan y col, 2005). Dicho ensayo consiste en detectar regiones conservadas del gen de la proteína M del virus de Influenza tipo A que se multiplican en diferentes especies como aves,

cerdos y equinos, usando sondas de hidrólisis Taqman (Fouchier, 2000). Sin embargo, el aislamiento viral sigue siendo una herramienta fundamental ya que permite realizar estudios posteriores para caracterizar antigénicamente y genéticamente a EIV, información necesaria para realizar la vigilancia de las derivas antigénicas de los virus circulantes y actualizar las cepas vaccinales. Sin embargo algunos autores sugieren realizar la caracterización genética y antigénica de la HA directamente de los hisopados nasofaríngeos, ya que se han reportado cambios genéticos y antigénicos en los aislamientos virales obtenidos luego de realizar pasajes en huevo embrionado y en cultivos celulares de MDCK (Ilobi y col, 1998).

También se puede realizar serodiagnóstico, ya que muestras pareadas tomadas en intervalos de 21-30 días evidencian aumento del título de anticuerpos para Gripe equina. Las técnicas serológicas utilizadas son la Inhibición de la Hemaglutinación (HI), Seroneutralización (SN) y la Hemólisis radial simple (SRH), siendo esta última la que tiene mayor reproducibilidad y sensibilidad (Wood, 1994) ofreciendo mejores ventajas diagnósticas especialmente en equinos con múltiples vacunaciones, en los cuales no se observa seroconversión por HI. Un incremento en 4 diluciones del título HI, o un incremento del 50% o 25 mm² del área de hemólisis se considera infección por virus de la gripe equina (Wood y col., 1994).

Tratamiento

El componente esencial del tratamiento es el reposo en el establo un número de semanas equivalente al número de días que dura la fiebre, a los efectos de permitir la regeneración completa del epitelio respiratorio y evitar

complicaciones como la enfermedad obstructiva crónica y la miocarditis (Van Maanen, 2002). Por otra parte, se implementa un tratamiento sintomático basado en brindar alojamiento bien ventilados, hidratación y uso de antibióticos y antiinflamatorios se indica cuando sea necesario (fiebre, anorexia).

Manejo y prevención de brotes

Como medida adicional se debe realizar cuarentena de los nuevos ingresos de 2-3 semanas de duración y revacunación con 10 días previos al ingreso. Los animales afectados deben ser inmediatamente aislados y especialmente evitar el contacto con los potrillos. Es importante adoptar estrictas medidas de bioseguridad, como el uso de equipos de protección personal, utensilios diferentes para infectados y sanos, desinfección de establos contaminados, equipos y vehículos de transporte.

Inmunidad

El control y la prevención de la enfermedad dependen de la aplicación de planes de vacunación eficaces y prácticas de bioseguridad que reduzcan el riesgo de transmisión a hospedadores susceptibles y disminuyan la producción de grandes cantidades de aerosoles (Van Maanen, 2002). Se considera que el 70% de la población equina debe estar vacunada para evitar la aparición de brotes epidémicos (Baker, 1986), sin embargo los criterios para establecer planes de vacunación eficaces son variables.

Se disponen de vacunas inactivadas que contienen una cepa representativa del subtipo H7N7 y una o más cepas del subtipo H3N8, bajo la forma de virus purificado inactivado, o bien subunidades de antígenos virales; generalmente

se les agrega un adyuvante (Van Maanen, 2002). Muchas vacunas convencionales inducen una respuesta pobre cuando son aplicadas durante los brotes de Influenza Equina (Mumford y col, 1988). Por tal motivo, es necesario efectuar revacunaciones cada 3-4 meses para conferir protección clínica en la población susceptible, especialmente en los jóvenes (Powell, 1991). En las últimas décadas han surgido nuevas vacunas comerciales, que contienen nuevos adyuvantes oleosos y polímeros, así como sistemas de presentación de antígenos (ISCOM) que inducen mayor respuesta inmune y de duración más prolongada (Mumford y col, 1994a, Mumford y col, 1994b y Mumford y col, 1994c). Por el contrario, en algunas regiones como Norte América, se ha reportado que la vacunación cuatro veces repetida a intervalos de 6 semanas, no disminuyó el riesgo de aparición de la enfermedad (Morley y col, 1999). Se ha demostrado que el aumento del título luego de la vacunación es inversamente proporcional al título obtenido previamente a la vacunación, por lo tanto las revacunaciones frecuentes no son económicamente efectivas (Van Maanen, 2002).

Con respecto a la población inmunizada, se ha reconocido la existencia de equinos que responden pobremente a la vacunación, siendo entonces muy importante su identificación a los efectos de revacunarlos y conferir una inmunidad apropiada a la población (Hannant y Mumford, 1996).

Investigaciones experimentales y de campo han confirmado que el grado de protección inducido por la vacunación con vacunas inactivadas, está estrechamente relacionado con el nivel de anticuerpos SRH circulantes medido por el área de hemólisis desarrollada (Mumford y col., 1988, Mumford y col., 1994, Newton y col., 2000a, Van Maanen, 2002). Los equinos que presentan

un área de hemólisis > 140-150 mm², no muestran signos de infección (Newton y col, 2000a), a su vez, las vacunas ISCOM y las que tienen adyuvantes de carbómeros desarrollan una inmunidad más prolongada (Heldens y col, 2009). Si bien se encontraron altos niveles de anticuerpos SRH en potrillos vacunados con vacuna inactivada conteniendo carbómeros adyuvantes, la respuesta bajó rápidamente a los 4-5 meses de la tercer revacunación (Van Maanen 2002). En el transcurso de un brote, equinos vacunados tres veces con una vacuna a subunidades, no presentaban niveles protectores de anticuerpos SRH (Newton y col, 2000b). Por lo tanto, algunos autores sugieren la inclusión de una vacunación adicional entre la segunda y la tercera vacunación, especialmente en potrillos (Cullinane y col, 2001), a los efectos de asegurar un buen nivel de protección inmunitaria. Por otra parte se evidenció una respuesta significativamente mayor en los casos que se aplica una vacuna inactivada monovalente en comparación con vacunas mixtas que incluyen otros virus como herpesvirus y reovirus equino (Cullinane y col, 2001, Daly y col, 1996, Newton 2001). Mediante el uso de un modelo estadístico de Montecarlo destinado a evaluar las medidas preventivas establecidas en Reino Unido, se demostró que los factores de mayor riesgo para la reintroducción de la enfermedad son el tiempo pasado después de la última vacunación y el ingreso de nuevos equinos durante la temporada hípica (De la Rúa y col, 1999).

La evaluación de la eficacia de las vacunas inactivadas se realiza mediante el desafío con aerosoles de virus (Mumford y col, 1990) y mediante la determinación del nivel de anticuerpos por las pruebas de HI y SRH (Mumford, 1988). Para obtener una correlación fuerte con las pruebas de HI y SRH es necesario que haya una estrecha homología entre las cepas vaccinales y de

desafío. Se ha demostrado en ensayos experimentales que animales inmunizados con cepas heterólogas no están completamente protegidos y eliminan mayor cantidad de virus que los inmunizados con cepas homólogas (Yates y Mumford, 2000). Por lo tanto, es esencial que una vacuna eficaz contenga antígenos homólogos a los presentes en el virus que actúa en el campo (Hannant y Mumford, 1996). Por ejemplo, en 1995 se caracterizaron dos aislamientos obtenidos en Holanda y ambos presentaban deriva antigénica frente a la cepa vaccinal H3N8, disminuyendo la potencia de la vacuna que contenía dicha cepa vaccinal (Van Maanen, 2002).

Daly y col. (1996), demostraron que desde 1989 la evolución del virus originó dos líneas americanas y europeas, genéticamente diferentes y en Irlanda y en otros países se han reportado brotes originados por ambas líneas desde 1988 probablemente debido al transporte internacional de equinos (Oxburg y col, 1998, Oxburg y col, 1999, Van Maanen y Culliname, 2002). Tanto Yates (2000) como Newton y col, (1999), comprobaron en ensayos experimentales y de campo, respectivamente, protección cruzada incompleta contra cepas tipo americanas en caballos con altos niveles preinfección de anticuerpos SRH inducidos por la vacunación con cepas de tipo europeo. En consecuencia, a partir de 1995 (Mumford y col, 1995) se comenzó a incluir en las vacunas, cepas representativas tipo europeas (cepas Suffolk/89 o Newmarket 2/93) y americanas (Cepa Kentucky/94 o Newmarket 1/93). Sin embargo, la evolución genética divergente de las cepas americanas ocurrida a partir del año 2001, ha causado cambios adicionales en las cepas a incluir en la vacuna (Lai y col, 2001).

La mayor parte de los brotes ocurren en otoño en equinos menores a 2-3 años en eventos de venta o exposiciones debido a la gran concentración de animales en espacios poco ventilados y procedentes de diferentes lugares (Van Maanen y Cullinane, 2002). Por lo tanto, es muy importante asegurar mediante un plan de vacunación, una apropiada protección inmunaria a la población de menor edad. En un estudio de campo el 83% de los equinos Sangre Pura de Carrera (SPC) menores de un año que ingresan al entrenamiento, y el 73% de los de 2 años edad que están en entrenamiento presentan niveles de anticuerpos SRH no protectores frente a la infección de virus de Influenza Equina homólogo (Van Maanen y Cullinane, 2002). A su vez la variabilidad en los títulos SRH se explica en gran medida por la historia de vacunaciones. Los principales factores que influyen en la predicción del título SRH en los equinos que entran al entrenamiento son el número total de vacunaciones previas y la edad en el momento de la primera vacunación (Newton y col., 2000a y 2000b). La última asociación es positiva señalando la interferencia de los anticuerpos calostrales (Siegrist y col., 1998), bloqueando la respuesta inmune cuando los potrillos son primovacunados a edad muy temprana (Cullinane y col., 2001). Van Oirschot y col. (1995) demostraron que potrillos nacidos de madres vacunadas no presentaban anticuerpos para los virus de influenza H7N7 y H3N8, a partir los cuatro meses de edad. También se encontró que los anticuerpos calostrales interferían con la vacunación cuando los potrillos eran vacunados antes de las 24 semanas de edad (Van Maanen y col., 2001). En ese sentido, se ha demostrado la interferencia de los anticuerpos maternos en potrillos vacunados con vacuna entera inactivada y con vacuna a subunidades, ya que los potrillos primovacunados a las 26 semanas de edad

presentaban títulos más altos que los vacunados a los 12 semanas de edad (Cullinane y col., 2001). Por lo tanto, los potrillos deberían ser primovacunados a partir de los seis meses de edad a los efectos de evitar la interferencia ocasionada por los anticuerpos maternos. Por otra parte, la revacunación frecuente (2 veces por año) reduce el período ventana de susceptibilidad a la infección viral (De la Rúa y col., 1999, Newton y col., 2000b).

La infección por el virus de Influenza Equina induce una respuesta inmune celular mediada por células citotóxicas (CTL) y una respuesta inmune local humoral mediada por IgA (Hannant y col., 1989, Van Maanen y Cullinane, 2002). La vacunación intranasal con virus inactivado junto con el adyuvante toxina B de cólera, induce una respuesta local humoral muy fuerte, con predominio de IgA, brindando protección clínica e impidiendo la excreción viral frente al desafío con aerosoles de virus infeccioso al animal vacunado (Hannant, 1991). A su vez la aplicación local en mucosa nasal de vacunas ISCOM también inducen respuesta inmune local y mediada por células CTL (Morein y col., 1999). Se han usado vacunas a virus vivo termosensibles en humanos que ofrecen una mayor eficacia, pero aun se deben realizar más estudios que aseguren su inocuidad. También se han usado en equinos y se ha ensayado una vacuna a virus vivo modificado muy segura, incluso en equinos con inmunosupresión inducida por el ejercicio y que provee protección clínica frente a la infección experimental hasta 3 meses después de una dosis simple. Más aún, en otro estudio se comprobó que ante un desafío viral, la severidad de los síntomas clínicos y la excreción viral se redujeron en forma marcada seis meses después de la vacunación (Townsend y col., 2001). El uso de este tipo de vacunas está autorizado solamente en Estados Unidos.

Las vacunas de ADN ofrecen nuevas ventajas frente a las vacunas de formulación tradicional, ya que el inmunógeno es activamente sintetizado en las células transfectadas con el ADN vaccinal, permitiendo la expresión de moléculas MHC I y MHC II con su conformación molecular inalterada (Olsen, 2000). En un estudio realizado, la vacuna de ADN administrada en piel y/o mucosas provoca protección parcial a potrillos infectados experimentalmente con virus de Influenza. Tres de ocho equinos presentaron protección total, asociada a la presencia de IgGb, en ausencia de IgA en las secreciones nasales (Lunn y col., 1999, Olsen, 2000). La adición del gen que codifica la Interleukina 6, mejora claramente la capacidad protectora en ratones de las vacunas de ADN de Hemaglutinina (Larsen y col., 1997). Se ha demostrado que la Interleukina 6 es un factor crítico en la maduración de los linfocitos B secretores de IgA y en la mejora de la respuesta específica de los linfocitos T a la nucleoproteína viral (Olsen, 2000). Como se describió anteriormente, los anticuerpos maternos pueden interferir en la respuesta inmune, sin embargo, la inmunización con ADN puede sortear esta interferencia, ya que los ratones con inmunidad materna pueden desarrollar una respuesta humoral y celular luego de ser vacunados con vacuna ADN que contiene el gen de la gB del HSV, a diferencia de los ratones vacunados con vacuna inactivada (Mannickan y col., 1997). En cambio, en las vacunas de ADN que expresan la HA y la NP, la respuesta humoral a la HA fue severamente inhibida, a pesar que la respuesta celular contra la HA y la respuesta humoral contra la NP no fueron inhibidas (Pertmer y col., 2000). También se han reportado efectos inhibitorios de los anticuerpos maternos usando otros antígenos vaccinales (Sarampión, Virus Sincitial Respiratorio, Tétanos), tanto cuando se administran vacunas

tradicionales (vacunas inactivadas o proteínas con adyuvantes) o de última generación como las vacunas a virus vivo recombinantes y las vacunas de ADN (Siegrist, 1998). Por lo tanto, se plantea como un desafío para el futuro, el desarrollo de vacunas que confieran una inmunidad duradera basada en la inducción de altos niveles de anticuerpos sistémicos y locales por un lado y una respuesta inmune mediada por células efectiva, por otro lado.

Finalmente, se resalta la importancia de la implementación de programas de vigilancia de la Influenza Equina, porque sensibilizan a los actores de la cadena equina y permiten evaluar la eficacia de las vacunas en el campo, tomando especial recaudo en el monitoreo de la deriva antigénica del virus de influenza actualizando las cepas vaccinales con las cepas epidemiológicamente importantes. Se debe tener especial cuidado en brindar una adecuada inmunidad a la población joven más susceptible, teniendo en cuenta la interferencia de los anticuerpos maternos en los planes de vacunación. A los efectos de reducir la presión de la infección viral, se debe alentar una alta cobertura de vacunación en las categorías de equinos que presenten mayor riesgo de ser infectados. La evolución continua del virus H3N8 y en particular la evolución múltiple de las cepas americanas deben ser aspectos muy importantes a tener en cuenta, para lograr vacunas que sean capaces de inducir una fuerte inmunidad cruzada. Además, se deberían desarrollar vacunas potentes, con duración de inmunidad prolongada y que induzcan respuestas similares obtenidas por la inmunidad natural.

Es necesario determinar ensayos confiables que se correlacionen con la protección inmunitaria, para evaluar las vacunas que inducen anticuerpos locales y estimulan la inmunidad celular.

Situación en nuestro país

La gripe equina se presenta en el continente americano en forma endémica (Bryant y col, 2009, Cullinane, 2010). En nuestro país se diagnosticó por primera vez en 1963 (Vallone y col, 1965); desde 2006 se notifica anualmente su presencia al Sistema Internacional de Salud Animal (WAHID, 2013).

En el 2009 hubo un brote de enfermedad respiratoria aguda en equinos Sangre Pura de Carrera residentes del Hipódromo de Maroñas, se realizó un estudio serológico para detectar la infección por los virus de gripe equina y de Rinoneumonitis Viral Equina sin lograr resultados positivos (Acuña, 2009).

Al comenzar el otoño 2012, se presentó un brote de Influenza Equina, que complicó a toda la actividad hípica deportiva del país, justo antes de la clásica semana criolla donde la actividad ecuestre llega a su máxima actividad. Incluso se llegó a clausurar la operativa de nuestro principal Hipódromo Maroñas durante una semana, ocasionando importantes pérdidas económicas para la industria equina. Al comienzo, se sospechó que era un brote de Rinoneumonitis Equina, pero luego se confirmó el diagnóstico de laboratorio de Influenza Equina por el Instituto de Virología de INTA-Castelar y la DILAVE-MGAP. El brote se presentó entre el 15 y el 30 de marzo en los studs del Hipódromo de Maroñas de Montevideo y alrededores, afectando a unos 2500 equinos con una tasa de incidencia del 40% (WAHID, 2012). Se sospecha que el brote fue originado por la importación de equinos infectados desde Brasil, en ese entonces ocurrieron varios brotes de Gripe Equina en varios hipódromos brasileños. En los meses siguientes la enfermedad se extendió a Buenos Aires (Argentina). La vacunación contra la Influenza y la Rinoneumonitis equina es

obligatoria para todos los equinos del país, debiéndose revacunar cada 3 a 4 meses. Sin embargo, se estima que solo se llega al 80% de cobertura vaccinal de los animales deportivos y en menos del 50% de todos los equinos del país. La vacuna contra Influenza usada en América del Sur es inactivada y bivalente (virus A equi 1 y 2). Sin embargo, últimamente se vienen usando vacunas que ya no contienen el virus A equi 1. Actualmente, la OIE no recomienda la inclusión de este subtipo en las vacunas, debido a que el mismo no circula en el mundo desde hace más de 30 años.

Caracterización del problema

Los virus equinos EIV y EHV 1/4, provocan infecciones que pueden representar importantes pérdidas socio-económicas ocasionadas debidas a: cierre de eventos recreativos y deportivos hípicas, pérdida de animales por abortos y por la gravedad de la enfermedad, bajos rendimientos en las competencias, días perdidos para lograr la recuperación de los animales convalecientes y al costo ocasionado por el tratamiento.

La rinoneumonitis equina (RE) es un término que describe un conjunto de enfermedades en caballos que pueden incluir cuadros clínicos respiratorios, aborto, neumonitis neonatal de los potros, o mieloencefalopatía y está causada por los virus EHV 1 y EHV 4.

En estos últimos años se ha evidenciado un aumento en la frecuencia y en la gravedad de casos neurológicos causados por EHV 1, particularmente en USA y Europa (Goehring y col., 2006; Henninger y col., 2007; Allen y col., 2008). A su vez, se ha identificado un polimorfismo simple de nucleótidos (SNP), Adenina (A) por Guanina (G) en el nucleótido (nt) 2254 del gen que codifica la

polimerasa viral (ORF30), con la consiguiente sustitución de asparagina (N) por ácido aspártico (D) lo cual estaría asociado a enfermedad neurológica (Nugent y col., 2006).

En nuestro país no se conoce con certeza cuales son los agentes involucrados ya que nuestro medio carece de laboratorios especializados que tengan capacidad de dar respuesta suficientemente rápida a estos problemas. Tampoco se conoce el grado de difusión de estos agentes en nuestra población equina deportiva. La posibilidad de lograr la capacidad diagnóstica para detectar y caracterizar estos agentes, aportaría mayor información eipidemiológica sobre ellos.

Tampoco se conoce el nivel de inmunidad de los equinos vacunados para prevenir infección por EHV 1/4 y EIV, especialmente en los equinos deportivos, que solo se vacunan cuando concurren a competencia, exposiciones, etc.

Con respecto a la Influenza Equina se han establecido ensayos serológicos adecuados para medir el nivel de inmunidad. Las vacunas inactivadas usadas en nuestro país inducen anticuerpos SRH para EIV que se correlacionan muy bien con el nivel de inmunidad y pueden ser medidos por técnicas de laboratorio confiables y estandarizadas. La evaluación del nivel de inmunidad frente a la infección por EIV, posibilitaría realizar modificaciones a tiempo de las estrategias para maximizar la capacidad protectora de las vacunas.

Para el caso particular de EHV 1/4, no se ha demostrado en forma consistente que altos niveles de anticuerpos seroneutralizantes circulantes en la sangre se correlacionen con la protección frente a una infección natural o experimental. Las vacunas inactivadas de EHV 1/4 usadas en nuestro país, pueden inducir

altos títulos seroneutralizantes que reducen la cantidad y duración de descarga de virus por la mucosa epitelial (Breathnach et al., 2001), pero fallan en inducir respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T (CTL) la cual es considerada como el factor primordial para limitar la infección viral (Kydd y col., 2003; Minke y col., 2004).

En función de las interrogantes planteadas en la caracterización del problema, se plantean las siguientes hipótesis:

- Que la estimación de la prevalencia de EHV1 y de la variante neurovirulenta G2254, sean similares a las observadas en los países de la región región.
- Que la misma está asociada a factores como la raza, edad, estado de vacunación y sexo.
- Que los niveles de protección frente a la infección por el virus de Influenza Equina sean bajos en previo al ingreso de los equinos a los eventos hípico -deportivos, ya que habitualmente gran parte de los mismos actualizan la vacunación obligatoria en dicho momento.
- Que los mismos estén asociados a factores como la raza, estado de vacunación, edad y sexo.

Objetivos

Objetivos generales

- Estimar la seroprevalencia de EHV1, caracterizar con ensayos moleculares los virus EHV 1/4 y EIV, y establecer los niveles de protección contra la infección de EIV en los equinos de deporte en Uruguay.

Objetivos específicos

- Estimar la seroprevalencia de EHV 1 y su asociación con la raza, edad, sexo y antecedentes de vacunación en la población de equinos de deporte en Uruguay.
- Puesta a punto de técnicas moleculares para detectar EHV 1/4.
- Detectar y caracterizar por técnicas moleculares, EHV 1/4 en ganglios broncopulmonares de equinos enviados a plantas de faena.
- Determinar el nivel de inmunidad de equinos de deporte frente a EIV en distintos estratos de edad, raza, sexo, e historia de vacunación.

CAPÍTULO 2

Estudio de seroprevalencia y de factores que afectan el nivel de anticuerpos seroneutralizantes contra EHV 1 en equinos que participan en actividades hípico-deportivas en el Uruguay.¹

Resumen

La Rinoneumonitis equina (RE) es un término que describe un conjunto de enfermedades en caballos que pueden incluir cuadros clínicos respiratorios, aborto, neumonitis neonatal de los potros, o mieloencefalopatía y está causada por los virus EHV 1 y EHV 4. La distribución de estos agentes se considera mundialmente enzoótica provocando importantes pérdidas económicas especialmente en países con buen desarrollo de la industria hípico-deportiva. En el Uruguay se considera enzoótica desde hace muchos años. El objetivo de este trabajo es estimar la seroprevalencia de EHV 1 en equinos de deporte en el Uruguay y determinar si está asociada con factores como la edad, raza, sexo y los antecedentes de vacunación. Se colectaron 1517 sueros equinos en el período diciembre 2013 a marzo 2014, reseñando la raza, edad, sexo y registro de vacunación, la totalidad de las muestras fueron procesadas por la prueba de seroneutralización viral y los resultados fueron estudiados mediante un modelo de regresión logística. Se comprueba que el virus EHV 1 se encuentra ampliamente distribuido en la población de equinos de deporte en nuestro país, con una prevalencia estimada del 29% (IC 95%= 27-31%). Se observa que la

¹El contenido de este capítulo está publicado en: Castro ER, Gil AD, Arbiza J (2016) Estudio de seroprevalencia y de factores que afectan el nivel anticuerpos seroneutralizantes contra EHV 1 en equinos que participan en actividades hípico-deportivas en el Uruguay. Veterinaria Volumen 52 N° 203 4-9.

presencia de anticuerpos para EHV 1 está asociada a factores como la raza y la vacunación contra RE ($p < 0,05$).

Palabras clave: Seroprevalencia Anticuerpos EHV 1 Equinos de deporte Uruguay

Abstract

Equine herpesvirus 1 (EHV 1) infection causes disease in horses and extensive economic losses associated with outbreaks of respiratory disease, abortion, neonatal foal death, and myeloencephalopathy, with worldwide distribution and probably are endemic in Uruguay. The objective of this research is to consider the seroprevalence of EHV 1 in horses in Uruguay and to determine if it is associated with factors like the age, breed, sex, and the vaccination antecedents. A total of 1517 serum samples were selected from December 2013 to March 2014. The data registered were the breed, age, sex and vaccination history. All samples were processed by the seroneutralization test and the results obtained were statistically analyzed by a logistic regression model. It is verified that the EHV 1 is widely distributed in the horse population in Uruguay, whose estimated prevalence is of 29 (IC 95= 27-31%). The presence of positive serology for EHV 1 was associated to factors like the breed and the vaccination against EHV 1 ($p < 0,05$).

Keywords Seroprevalence antibodies EHV 1 sport equines Uruguay.

Introducción

La población equina en el Uruguay está comprendida por aproximadamente 400.000 animales con 30.000 tenedores. Según Gil y col. (2009) casi el 95% de la población equina (sin incluir los equinos Sangre Pura de Carrera), pertenecen a las razas criolla (75%), cuarto de milla (12%) y árabes (7%). Actualmente la raza Sangre Pura de Carrera representa el segundo lugar de las razas equinas en el Uruguay (Ferrari, 2012).

La Rinoneumonitis equina (RE) es un término que describe un conjunto de cuadros clínicos que pueden incluir enfermedad respiratoria, abortos, neumonitis neonatal de los potros y mieloencefalopatía (OIE, 2015). Desde hace más de 60 años se considera que la enfermedad es una amenaza para la industria equina internacional. Está causada por dos miembros de la familia herpesviridae, EHV 1 y EHV 4, los cuales se consideran los patógenos más importantes para la especie equina, desde el punto de vista económico, clínico y epidemiológico (Patel, 2007). El virus EHV 1 es el agente principal de los cuadros neurológicos y de aborto, mientras que el virus EHV 4 lo es para las formas respiratorias de RE (Allen y Bryans, 1986). La distribución de estos agentes se considera mundialmente enzoótica (Allen y Bryans, 1986; OIE, 2015) provocando importantes pérdidas económicas (Lunn y col, 2009) especialmente en países con buen desarrollo de la industria hípico-deportiva. En Uruguay, esta enfermedad ha sido clínicamente diagnosticada desde hace muchos años y se piensa que es endémica, al igual que otros países de la región. En el año 2009, Easton y col., describen por primera vez en el Uruguay, la detección de EHV 1 mediante pruebas inmunohistoquímicas y moleculares,

en muestras de tejidos de un feto abortado. La vacunación en equinos destinados a actividades hípicas es obligatoria.

El objetivo de este trabajo, es estimar la seroprevalencia de EHV 1 en equinos de deporte en el Uruguay y determinar si está asociada con factores como la edad, raza, sexo y los antecedentes de vacunación.

Materiales y métodos

Sueros

Para realizar el estudio seroepidemiológico, se colectaron 1517 sueros equinos ingresados al laboratorio veterinario oficial del Uruguay (DILAVE “Miguel C. Rubino”) para realizar test de inmuno difusión en gel agar (IDGA) para detección de anticuerpos para virus de Anemia Infecciosa Equina en el período diciembre 2013 a marzo 2014, reseñando la raza, edad, sexo y registro de vacunaciones.

Prueba de seroneutralización (SN)

El procedimiento de la prueba se realizó siguiendo el protocolo establecido por el Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (OIE, 2015). La cepa de virus EHV 1HH 1 y la línea celular RK-13 usadas en la prueba, fueron cedidas por el Dr. Ken Inui (proyecto JICA-DILAVE). Los sueros controles positivos y negativos proceden del Instituto de Virología del INTA (Castelar-Argentina). Esta prueba serológica se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (grado de cultivo de tejidos) utilizando una dosis constante de virus y diluciones dobles de sueros equinos de ensayo. Los stocks de virus de título conocido se diluyeron para

obtener 100 DICT50 (dosis infectiva media en cultivo de tejidos) por pocillo. Se siembran células en suspensión de la línea celular RK-13 a una concentración de 5×10^5 células /ml. en cada ensayo se incluyeron sueros controles positivos y negativos, control de crecimiento celular, titulación de dosis infecciosas y prueba de citotoxicidad del suero. Los títulos neutralizantes de virus se calcularon determinando el inverso de la dilución más alta de suero que protege al 100% de la monocapa celular de la destrucción por el virus. Los sueros son considerados positivos cuando su título neutralizante es $\geq 1:4$.

Análisis estadístico

Inicialmente se realizó un análisis univariado para observar el comportamiento de las prevalencias por raza, sexo, edad y vacunación, utilizando para las evaluaciones la prueba χ^2 de Pearson. Las variables que fueron seleccionadas por tener un valor de $p < 0,20$ se utilizaron para construir un modelo de regresión logística que fue desarrollado “backward”. Este modelo tiene como variable respuesta, la presencia o no de serología positiva para EHV 1 y como variables independientes las seleccionadas en el análisis univariado. Se mantuvieron en el modelo aquellas variables que estaban asociadas con un valor $p < 0,05$. La totalidad de los “test” estadísticos se procesaron utilizando el software Stata/SE (versión 9.2 Stata-corp, College Station, Texas, USA).

Resultados

La mayor cantidad de muestras de sueros equinos colectadas pertenecieron a la raza SPC y a las cruzas representando cada una de ellas el 43% de la población (ver cuadro 1).

Cuadro 1: Sero-prevalencia según la raza

Serología	Árabe	Criolla	Cruza	Cuarto de milla	SPC	Otras	Total
Positivos	26	21	206	5	173	13	444
Sero-prevalencia (%)	49,06	21,43	31,84	11,63	26,53	56,52	29,29
Total	53	98	647	43	652	23	1516*

Pearson chi2 =32.0582

*No se incluye 1 equino debido a que desconoce su raza.

En relación a la raza, los resultados expresados en el cuadro 1 muestran que la raza árabe, junto con el grupo otras razas (la Anglo-arabe, Oldenburg y KWPN) presentan los mayores valores de seroprevalencia.

El grupo etario más numeroso se halló en el rango de 6 a 10 años de edad con un 33% del total de equinos estudiados (ver cuadro 2).

Cuadro 2: Sero-prevalencia según la edad (años)

Serología	≤ 3	4-5	6-10	11-15	> 15	Total
Nº de Positivos	91	163	156	9	6	425
Sero-prevalencia (%)	24,07	29,58	33,26	20,93	28,57	29,07
Nº Total	378	551	469	43	21	1462*

Pearson chi2 = 10,0277

* No se incluyen 55 equinos debido a que desconoce su edad

Se observó que 361 equinos habían sido recientemente vacunados contra RE, en un plazo menor a los 4 meses y mayor a los 15 días de la toma de muestra de sangre representando el 24% de la población (ver cuadro 3).

Cuadro 3: Seroprevalencia según la vacunación

Serología	No vacunado	Vacunado	total
Nº de Positivos	310	136	446
Sero-prevalencia (%)	26,82	37,67	29,4
Nº Total	1156	361	1517

Pearson chi2 = 15.6210

La población de equinos que fue vacunada en un plazo mayor a los cuatro meses, se consideró como población no vacunada, ya que la inmunidad conferida por la vacunación perdura durante unos pocos meses (OIE, 2015). La prevalencia estimada por la relación entre los sueros equinos positivos y el total de sueros de equinos estudiados fue del 29% estando comprendida entre el 27% y 31%. (IC=95%), siendo la raza Arabe, junto con el grupo de otras razas (Anglo-arabe, Odenburg y KWPN) los grupos con mayor proporción de positivos a EHV 1. Del análisis de regresión univariable (cuadro 4) se puede inferir que por lo menos hay una raza que presenta diferencias significativas de seroprevalencia, mientras que el análisis de regresión logística permite interpretar que las variables SPC y cuarto de milla son las razas que presentan mayor probabilidad de presentar serología positiva para EHV 1.

Cuadro 4: Regresión Logística Positivo/Raza Vacuna

Raza	Odds Ratio	Std. Err	[95% conf. interval]
Arabe	Ref.		
Criolla	0,45	0,19	0,19 1,05
Cruza	0,80	0,28	0,40 1,57
Cuarto de Milla	0,06	0,05	0,01 0,33
SPC	0,55	0,19	0,27 1,09
Otras	1,39	0,84	0,42 4,54
VACUNA			
Sin Vacuna	Ref.		
Con Vacuna	10,71	8,93	2,09 54,88
Raza + Vacuna			
Arabe + Vacuna	Ref.		
Criolla + Vacuna	0,15	0,16	0,02 1,17
Cruza + Vacuna	0,12	0,10	0,02 0,63
Cuarto de Milla + Vacuna	1,00		
SPC + Vacuna	0,17	0,15	0,03 0,93
Otras + Vacuna	0,72	1,05	0,04 12,45
cons	0,56	0,19	0,29 1,07

A su vez, el estrato de equinos vacunados presenta mayor probabilidad de presentar seropositivos (ver cuadro 3). El análisis univariable, no detectó

diferencias significativas en los valores de seroprevalencia entre los grupos de macho, hembra y macho castrado (ver cuadro 5). Por lo tanto la variable sexo no se tuvo en cuenta en la modelación del análisis de regresión logística. El grupo de reaccionantes aumenta con la edad, para luego caer a partir de los 10 años, sin embargo a pesar de que el análisis de regresión univariable arrojó diferencias significativas entre las prevalencias de los diferentes grupos de edades, esta variable no se mantuvo en el modelo de regresión logística debido a que ajustada por los otros factores considerados no presentó asociación con la seroprevalencia.

Discusión

La raza Sangre Pura de Carrera actualmente encabeza el grupo más importante de las razas equinas que participan en actividades de deporte en el Uruguay, lo cual coincide con lo descrito por otros autores (Ferreira, 2012). En muchos países la seroprevalencia de EHV 1 y EHV 4 es muy alta (Maanen, 2002). Sin embargo la interpretación puede ser confusa ya que test serológicos como la seroneutralización y la fijación de complemento, no pueden diferenciar anticuerpos de los dos virus debido a la reactividad antigénica cruzada entre ellos (Hartley y col, 2005). En un estudio de protección cruzada realizado en ponies, Edington y Bridges (1990), detectaron una respuesta cruzada para EHV 4, luego de una infección primaria con EHV 1 pero cuando eran infectados con EHV 4 no se obtenía una respuesta de inmunidad cruzada para EHV 1. En otro estudio, se comprobó seroconversión cruzada en caballos infectados con EHV 1 y EHV 4 (Hartley y col, 2005). A los efectos de evitar los problemas de interpretación de los resultados, ocasionados por las reacciones serológicas cruzadas, se han desarrollado pruebas de ELISA tipo específicas, basadas en

el uso de anticuerpos monoclonales anti glicoproteína G (Crabb y Studdert, 1993) y péptidos sintéticos producidos a partir de la glicoproteína E de EHV 1 y glicoproteína G de EHV 4 (Lang y col, 2013).

La prevalencia general de EHV 1 encontrada en los equinos de deporte en el Uruguay es del 29% (IC95%= 27-31%), valor similar al descrito en otros países. Sin embargo, cuando se comparan los resultados con los hallados por otros autores es necesario tener en cuenta las pruebas serológicas utilizadas, visto que hay diferencias de especificidad y sensibilidad diagnóstica entre las mismas, como ya se ha mencionado.

Crabb y Studdert, 1993, usando una prueba de ELISA tipo específica, realizaron un muestreo aleatorio en SPC en Australia en el período 1967-1976 y el año 1993, encontrando una prevalencia de 9-28% para EHV 1 y 100% para EHV 4. Posteriormente, luego de la primera confirmación de aborto por EHV 1 en 1997, la prevalencia para este serotipo aumentó al 30% (Crabb y col, 1995). En 1995, en un estudio transversal realizado en el mismo país utilizando la misma prueba de ELISA tipo específica, con una población de 229 yeguas madres SPC con potrillo al pie, se encontró una prevalencia similar, de 100% para EHV 4 y de 26,2% y 11,4% para EHV 1 en madres y potrillos respectivamente (Gilkerson y col, 1999). En Nueva Zelanda la seroprevalencia en SPC es mayor que la hallada en Australia y en nuestro país, ya que fue del 29%, 48% y 70% en potrillos de 6-12 meses, 12-24 meses y adultos mayores de 2 años de edad, respectivamente (Donald y col, 1998), lo cual indica que la infección está más difundida en ese país (Dunowska, 2014). sin embargo, estas diferencias podrían ser ocasionadas por el uso de diferentes métodos de ensayo serológicos (Crabb y col, 1995).

Por otra parte, en un estudio seroepidemiológico realizado en Turquía, en caballos, mostraron 14.5% de seropositividad para EHV 1 mientras que el 81,7% fueron positivos a EHV 4 (Ataseven y col, 2009). En otro estudio serológico realizado en el estado de San Pablo -Brasil en el 2004, se obtuvo una prevalencia del 26% para EHV 1 (Cunha y col, 2009) mientras que en el estado de Minas Gerais en el 2010 se obtuvo una prevalencia menor (18,7%), probablemente debido a que las muestras colectadas fueron tomadas de animales asintomáticos (Lara y col, 2010). En el estado de Pará, Heinemann y col. (2002), reportaron una prevalencia similar (17,71%).

En este estudio, los equinos vacunados, representan 24% de la población, siendo la proporción de positivos a EHV 1, de los vacunados y no vacunados de un 38% y 27 % respectivamente. Estos valores difieren con los hallados en Argentina por Galosi y col, 1991 (48% y 11% respectivamente), posiblemente estas diferencias puedan explicarse en parte, por el criterio adoptado para definir a la población vacunada, ya que los autores incluyen a los equinos con más de cuatro meses de vacunados a la población no vacunada, porque la inmunidad conferida por la vacunación perdura durante unos pocos meses (OIE, 2015).

Se observó una prevalencia menor en los estratos menores de 5 años que en la categoría de 5-10 años de edad, lo cual coincide con lo descrito en otros países, donde la prevalencia es mayor en los adultos que en potrillos (Gilkerson y col, 1999). Sin embargo, cuando analizamos por la raza y vacunación en el análisis de regresión logística, no se observó el efecto de la edad sobre la seroprevalencia. Tal vez, la razón se deba a que no se pudo subestratificar la categoría de equinos menores de 3 años, para poder

evidenciar diferencias significativas entre los estratos menores (por ejemplo 1, 2 y 3 años de edad). Según los resultados del análisis de regresión logística, la condición de la raza árabe, junto con la Anglo-arabe, Oldenburg y KWPN, obtuvo mayor probabilidad de presentar seropositivos que las otras razas y el efecto es mayor en las poblaciones vacunadas, comprobándose que el factor vacunación también afecta la seroprevalencia.

En el modelo se observa que existe interacción entre las razas y la vacunación, probablemente porque las frecuencias y los tiempos de vacunación son diferentes entre las razas, o bien, porque simplemente ellas responden en forma diferencial por razones genéticas (Dunowska, 2014).

Conclusión

Se comprueba que la RE se encuentra ampliamente distribuida en la población de equinos de deporte en nuestro país, cuya prevalencia estimada es 29% (IC95% = 27-31%), sin embargo la prevalencia de infección real por EHV1 puede ser menor a la estimada debido a la interferencia causada por los anticuerpos seroneutralizantes para EHV 1 asociados a la vacunación ($p < 0,05$).

Se observa una asociación entre la prevalencia de anticuerpos para EHV 1 con las razas y la vacunación, probablemente debido a diferentes frecuencias y tiempos de vacunación o por factores genéticos.

CAPÍTULO 3

DetECCIÓN MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN DE HERPESVIRUS EQUINO EN URUGUAY.²

Resumen

Los herpesvirus equinos 1 (EHV 1) y 4 (EHV 4), causan enfermedades de gran importancia económica en la industria equina y en los últimos años se ha detectado, en varios países del mundo, un aumento en el número de casos de mieloencefalopatía equina causada por las variantes neuropatogénicas de EHV 1. El propósito de este estudio fue evaluar la sensibilidad y la especificidad de diferentes pruebas moleculares para detectar EHV_s y realizar un estudio de detección y caracterización genética de EHV_s en la población equina de Uruguay. Se utilizó una PCR semianidada que detecta los genes que codifican las glicoproteína H (gH) de EHV 1 y B (gB) de EHV 4, una PCR multiplex que amplifica los genes de la glicoproteína C (gC) de EHV 1 y el gen 76 de EHV 4 y una PCR en tiempo real que amplifica el gen de la gB de EHV 1. Se estudiaron ganglios broncopulmonares de 47 caballos obtenidos en una planta de faena procedentes de varias regiones del Uruguay. La PCR semianidada y la PCR en tiempo real detectaron el mayor número de muestras positivas para EHV 1 (28%). La PCR semianidada detectó que el 6% de los ganglios contenían el gen de la gB de EHV 4. para determinar los biovares de EHV 1, se amplificó y secuenció el gen ORF 30 de la ADN polimerasa viral, para detectar la mutación asociada con neuropatogénesis (G2254/D752). De los 13 genomas

²Parte del contenido de este capítulo está publicado en: Castro ER, Arbiza J (2017) Detection and Genotyping of Equid herpesvirus 1 in Uruguay. Aceptado para publicar en OIE Review, en fecha: 13/7/17

secuenciados, 12 poseían dicha mutación, mientras que el restante poseía ambos nucleótidos A y G en la posición 2254 evidenciando una posible infección mixta. Los resultados confirman la presencia de la infección por EHV 1 previamente descrita en nuestro país. Además se evidencia por primera vez la detección de EHV 4 y la variante neuropatogénica (G2254/D752) de herpesvirus equino 1 (EHV 1) en Uruguay. Este hallazgo aporta nuevos conocimientos epidemiológicos sobre la situación de la infección por EHV 1 y EHV 4 en nuestro país.

Summary

Infection with Equid alphaherpesvirus 1 (EHV1) causes respiratory disease, abortion, and neurological disorders in horses. Molecular epidemiology studies have demonstrated that a single nucleotide polymorphism (A2254/G2254) in the genome region of the open reading frame 30 (ORF30), which results in an amino acid variation (N752/D752) of the EHV1 DNA polymerase, is significantly associated with the neuropathogenic potential of naturally occurring strains. In recent years an increase in the number of cases of equine neurological disease caused by Equid herpesvirus 1 (EHV1) neuropathogenic variants has been observed in numerous countries. The purpose of this study was to detect the presence of the viral genome of EHV1 and equine herpes virus 4 (EHV4) in bronchopulmonary lymph nodes of 47 horses from various locations in Uruguay obtained in a slaughterhouse, and to determine whether the EHV1 genomes possess the mutation associated with neuropathogenesis (G2254 / D752). The genes encoding the glycoprotein H (gH) of EHV1, and B (gB) of EHV4, were amplified by a semi-nested PCR. A multiplex PCR to detect gC EHV 1 and gen 76 of EHV 4, and a rPCR to identify gC of EHV 1 were also used. The

seminested PCR and the rPCR detect the highest number of positive samples. Of the total samples analysed, 28% and 6% of lymph nodes contained the gene for gH and gB, respectively. The gene for the viral DNA polymerase was amplified and sequenced. Twelve of the thirteen genomes sequenced presented the nucleotide G2254, while the remaining one showed both nucleotides, A2254 and G2254. The results confirm the presence of EHV1 in our country. Furthermore, there is evidence of the first-time detection of EHV4, and high frequency detection of the neuropathogenic variant (G2254 / D752) of EHV1 in Uruguay. This finding provides new insights into the epidemiological situation of EHV1 and EHV4 in our country.

Keywords

Equine herpesvirus – Genotyping – Lymph nodes –Molecular detection – Neuropathogenic –Uruguay.

Introduccion

Los herpesvirus equinos (EHVs) se encuentran ampliamente distribuidos y causan enfermedad de importancia económica en la industria equina. Dentro de este grupo, los virus EHV 1 y EHV 4 son los más relevantes desde el punto de vista patológico y económico. El virus EHV 1 causa cuadros clínicos de aborto, muerte perinatal y enfermedad neurológica, mientras que el virus EHV 4 provoca cuadros respiratorios especialmente en potrillos (Allen y Byans, 1986, Studdert y col., 2003).

Estos virus tienen la capacidad de permanecer en el huésped en forma latente y poder reactivarse en algún momento posterior. Esta es una propiedad epidemiológica importante, permite que el virus persista en equinos previamente infectados y se pueda transmitir a otros equinos susceptibles o bien reactivarse y provocar aborto en la yegua infectada.

Actualmente se disponen de varias técnicas de detección tales como el aislamiento viral, inmunohistoquímica y pruebas moleculares como PCR. El aislamiento viral presenta la desventaja de ser una técnica muy laboriosa, lenta y requiere el uso de cultivos celulares, mientras que las técnicas inmunohistoquímicas tienen el inconveniente de poseer baja sensibilidad. Por otro lado, los ensayos moleculares son pruebas rápidas muy sensibles y específicas (Lawrence y col, 1995, Sharma y col. 1992) y pueden detectar el virus a partir de tejidos frescos e incluidos en parafina (Hussey y col, 2006). Se han desarrollado gran variedad de técnicas de PCR convencional que detectan diversos genes como el gen TK de la timidin kinasa, (Carvalho y col., 2000) , los genes de la glicoproteína B (O'keefe y col.,1991; Wagner y col., 1992;

Kirisawa y col., 1993; Borchers y Slater, 1993), de la glicoproteína C (Lawrence y col., 1994; Galosi y col.,2001), de la glicoproteína D (Galosi y col., 2001) y de la glicoproteína H (Varrasso y col., 2001). Por otra parte las técnicas de PCR en tiempo real ofrecen otras ventajas, como la de ser más sensibles, rápidas y presentar menor riesgo de contaminación cruzada (Diallo y col., 2006).

En estos últimos años se ha evidenciado un aumento en la frecuencia y en la gravedad de casos neurológicos causados por EHV 1, particularmente en USA y Europa (Goehring y col., 2005; Anon, 2007; Henninger y col., 2007; Allen y col., 2008). A su vez, se ha identificado un polimorfismo simple de nucleótidos (SNP), Adenina (A) por Guanina (G) en el nucleótido (nt) 2254 del gen que codifica la polimerasa viral (ORF30), con la consiguiente sustitución de asparagina (N) por ácido aspártico (D) lo cual estaría asociado a enfermedad neurológica (Nugent y col., 2006).

En Uruguay, esta enfermedad ha sido diagnosticada clínicamente desde hace muchos años y se piensa que es endémica, al igual que otros países de la región. En el año 2009, Easton y col., describieron por primera vez en el Uruguay, la detección de EHV 1 mediante pruebas inmunohistoquímicas y moleculares, en muestras de tejidos de un feto equino abortado. Recientemente se estableció una seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes de EHV 1 de 29% estando la misma asociada a factores como la raza y la vacunación (Castro y col., 2015). Sin embargo, no se han realizado investigaciones posteriores para conocer la relevancia epidemiológica de los EHV 1/4 en nuestro país.

El objetivo de este estudio es evaluar la sensibilidad y la especificidad de diferentes pruebas moleculares para identificar herpes virus equino y realizar estudios de detección y caracterización genética de EHV en la población equina de Uruguay.

Material y metodos

Virus y panel de muestras de referencia.

Los virus de referencia utilizadas fueron: virus EHV 1HH 1 (Dr. Ken Inui proyecto JICA-DILAVE), virus EHV 4 P22 260110. (Dra. María Barrandeguy Instituto de Virología del INTA Castelar-Argentina).

Las muestras clínicas de referencia de tejidos de fetos abortados e hisopados nasofaríngeos, usadas para estudiar el comportamiento de las pruebas de PCR fueron cedidas por la Dra. María Barrandeguy (Instituto de Virología del INTA Castelar-Argentina); las muestras de cortes histológicos de tejidos fetales incluidos en parafina infectados con EHV 1 fueron cedidas por la Dra. Cristina Easton (Departamento Patología DILAVE-Uruguay).

Muestras recolectadas en planta de faena.

Durante el mes de abril de 2015, se tomaron muestras de ganglios broncopulmonares a 47 equinos clínicamente sanos ingresados a una planta de faena, procedentes de 7 departamentos de Uruguay. Las mismas fueron refrigeradas e inmediatamente enviadas al laboratorio donde se acondicionaron a -70°C hasta el momento de ser procesadas.

Extracción de ADN.

El ADN de las muestras de ganglios broncopulmonares se extrajo usando el kit Qiamp® DNA Mini Kit (Qiagen Australia Pty Ltd.) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

Detección EHV 1/4 por PCR multiplex.

El ensayo se realizó según lo descrito por Lawrence y col, (1994), que permite detectar simultáneamente secuencias específicas del gen de la glicoproteína C del EHV 1 y el gen 76 de EHV 4, empleando el Kit Taq DNA polymerase (Tiangen Biotech ET101 Beijing) . Se usaron los cebadores:

EHV 1-fw : gcgagatgtggtgcctaactctcg

EHV 4-fw : agccacgaacaactcaaccgatgt

EHV 1-4 rw : gagacggtaacgctggtactgtta

La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystem Gen Amp 9700 PCR system) con los siguientes parámetros: 30 ciclos de 94°C por 75 seg, 60°C por 90 seg y 72°C por 90 seg. Finalmente, 10 µl del producto de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, coloreado con Good View y visualizados por trans-iluminación con luz UV.

Detección de EHV-_{1/4} por PCR semianidado.

Se siguió el procedimiento descrito por Varraso y col (2001). Esta técnica permite detectar secuencias específicas del gen H del EHV 1 y del gen B de EHV 4. Para la primera ronda de amplificación se tomaron 5 µl de los extractos

de ADN de las muestras y la PCR se realizó usando el Kit Taq DNA polymerase (Tiangen Biotech ET101 beijing) con los siguientes cebadores:

gH EHV 1 fw:5'aagaggagcacgtgttgat3'

gH EHV 1 rw:5'ttgaaggacgaataggacgc3'

gB EHV 4 fw: 5'ctgctgtcattatgcaggga3'

gB EHV 4 rw: 5'cgtcttctcgaagacgggta3'

Como control negativo se utilizó agua grado biología molecular (Amresco INC® Solon, Ohio). La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystem GEN AMP 9700 PCR System) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95 °C /5 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C/30 seg, 60 °C/30 seg y 72 °C/1 min, con una extensión final de 72 °C/5 min.

Para la segunda ronda de amplificación, se tomaron 2 µl del amplicón de la primera reacción (los cuales fueron usados como molde) y la nueva prueba se realizó bajo las mismas condiciones de la primera reacción, pero los cebadores rw para EHV 1 y EHV 4 se reemplazaron por RN EHV 1: 5'agtaggtcaggccgatgctt 3' y RN EHV 4: '5-cgctagtgtcatcatcgctcg-3', respectivamente. Finalmente, 10 µl del producto de la PCR semianidada fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, coloreado con Good View y visualizados por trans-iluminación con luz UV.

Detección EHV por PCR en tiempo real (qPCR).

Se siguió el procedimiento descrito por Hussey y col. (2006), el cual consiste en realizar la detección de secuencias específicas del gen de la glicoproteína B de

EHV 1 usando una sonda Taqman que contiene en el extremo 5' el "reporter" 6-carboxi-fluoresceína (FAM) para detección de EHV 1 y el "quencher" BHQ en el extremo 3' (Applied Biosystems Australia Pty Ltd.). Las secuencias de los cebadores y la sonda fueron:

EHV 1 gB fw: 5'-cat acg tcc ctg tcc gacaga t-3'

EHV 1 gB rw: 5'-ggt act cgg cct ttg acg aa-3'

Sonda EHV 1 gB: 5'-FAM-tga gac cga aga tct cct cca ccg a-BHQ-3'

La amplificación se realizó a partir de un volumen de 5 ul del extracto de ADN, usando el Kit Taq DNA polymerase (Qiagen GMBH, D-40724 Hilden). La amplificación se realizó en un termociclador en tiempo real stratagene™ MX3005p qPCR, con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95 °c /3 min seguida de 40 ciclos de 95 °c/30 seg, 60 °c/30 seg. ct mayores a 40 se consideraron como reacciones negativas y ct menores a 35 como positivos.

Detección del gen ORF 30 de EHV 1 por PCR.

Para amplificar el ORF 30 de EHV 1, se realizó una PCR siguiendo las condiciones reportadas por Nugent y col., (2006). Se amplificaron los ORF 30 de todas las muestras que fueron positivas para la detección de EHV 1. De cada muestra de DNA se tomaron 5 µl y la reacción de amplificación se realizó usando el Kit Taq DNA polymerase (Tiangen Biotech ET101 Beijing). Los cebadores fueron:

ORF 30 fw: gcgctacttctgaaaacg

ORF 30 rw: ccacaaacttgataaacacg

Como control negativo se utilizó agua grado biología molecular (Amresco inc® Solon, Ohio). La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystem Gen Amp 9700 PCR system) bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °c/4 min, seguida por 35 ciclos de amplificación a 94 °c/30 seg, 48 °c/1 min y 72 °c/2 min, seguidos por una extensión final de 72 °c/10 minutos. Después de la amplificación, 5 µl de los productos de cada PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2%, coloreados con Good View y visualizados por trans-iluminación con luz UV. Finalmente, los amplicones que poseían la banda específica para el gen orf 30, fueron secuenciados.

Sensibilidad.

La sensibilidad analítica se determinó usando diluciones base 10 a partir de suspensiones virales con título de $10^{4,5}$ TCID₅₀/50µl de EHV 1 y $10^{2,5}$ TCID₅₀/50µl de EHV 4. Se realizaron extracciones de ADN de estas suspensiones y se procesaron por las pruebas de PCR multiplex, semianidada y PCR en tiempo real. Se determinó la concentración mínima detectada por cada ensayo.

La sensibilidad diagnóstica se determinó comparando los resultados obtenidos del panel de muestras descrito en el cuadro 3.2.

Especificidad.

Para determinar la especificidad se usaron agentes que pueden ser posibles patógenos que causan cuadros clínicos similares como: virus de Arteritis Viral equina, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Rhodococcus equi*, *Taylorella equigenitalis* o bien ser posibles

contaminantes como: *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca*. Todas las cepas fueron obtenidas de la colección perteneciente al Departamento de Bacteriología de DILAVE.

La especificidad diagnóstica se determinó comparando los resultados obtenidos con el panel de muestras arriba descrito.

Secuenciación y análisis de secuencias.

Los productos amplificados correspondientes al gen ORF 30 de EHV 1 fueron enviados a secuenciar a MacroGen® (Seul, Korea), siguiendo todas las recomendaciones establecidas por dicha empresa. Las secuencias fueron editadas usando el editor de alineamiento de secuencias Bioedit® versión 7.2.5. La secuencia de cada uno de los amplicones se comparó con secuencias de los genes correspondientes obtenidas del GenBank (números de acceso DQ180606 a 180738).

Resultados

Sensibilidad analítica.

Los límites de detección del PCR multiplex, PCR semianidada y qPCR, se indican en el cuadro 1.

Cuadro 1: Límite de detección de EHV 1 y EHV 4

	EHV -1	EHV 4
PCR multiplex	10 ⁻⁵	10 ⁻²
PCR semianidado	10 ⁻⁶	10 ⁻²
qPCR	10 ⁻⁶	-

Se puede observar que el PCR semianidado y el qPCR presentan mayor sensibilidad para detectar EHV 1 que el PCR multiplex, ya que los mismos permiten detectar al virus hasta la dilución 10⁻⁶ con un título inicial de 10^{4,5} TCID₅₀/50µl.

Especificidad comparativa.

Todos los ensayos detectaron únicamente ADN correspondiente al virus específico y no se observaron reacciones cruzadas en las muestras de los especímenes bacterianos usados.

Virus y panel de muestras de referencia.

Los tres métodos de ensayo mostraron los mismos resultados en la totalidad de las muestras de aislamientos en cultivo celular, así como en las muestras clínicas de hisopados nasofaríngeos y tejidos (cuadro .2).

Cuadro 2: Resultado PCR panel de muestras de referencia

identificacion	muestra	tipo de EHV	PCR multiplex gp EHV 1 C	PCR multiplex gen 76 EHV 4	PCR semianidada gp H EHV 1	PCR semianidada gp B EHV 4	PCR tiempo real gp BEHV 1 (ct)
hve-4 171104	s.a.v*	4	neg.	pos.	neg.	pos.	no ct.
hve-1 p4 040907	s.a.v.*	1	pos.	neg.	pos.	neg.	15,55
e/6289/05 1p 290408	s.a.v*	1	pos.	neg.	pos.	neg.	20,67
e/2661/12	b.f.a***	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	no ct.
e/2684/12	p.f.a**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	no ct
e/2487/12	b.f.a***	1	pos.	neg.	pos.	neg.	23,79
e/2211/12	b.f.a***	1	pos.	neg.	pos.	neg.	24,13
e/2856/12-2	h.n.f ****	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	no ct
e/2856/12-3	h.n.f ****	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	no ct.
e/2142/12-4	h.n.f ****	4	neg.	pos.	neg.	pos.	no ct
f/2363/07 27	p.f.a.p *****	1	pos.	neg.	pos.	neg.	22,88
f/2363/07 58	h.f.a.p *****	1	pos.	neg.	pos.	neg.	30,5

*s.a.v = sobrenadante aislamiento viral en cultivo celular

**p.f.a = pulmón feto abortado

***b.f.a = bazo feto abortado

****h.n.f = hisopado nasofaríngeo equino

***** = pulmón feto abortado incluido en parafina

***** = hígado feto abortado incluido en parafina

neg.= negativo

pos. = positivo

Muestras recolectadas en planta de faena.

Se procesaron un total de 47 muestras de ganglios pulmonares. Se obtuvieron 13 (28%) muestras positivas a EHV 1 por los ensayos de PCR semianidado y qPCR, mientras que el PCR multiplex detectó 10 (21%) muestras positivas a EHV 1.

Se detectaron 3 muestras positivas (6%) a EHV 4 por la prueba de PCR semianidada, mientras que la PCR multiplex no detectó ninguna muestra positiva a EHV 4.

Secuenciación y análisis genético.

Se secuenciaron los amplicones de ORF 30 de las 13 muestras positivas a EHV 1, resultando que 12 muestras presentaban el SNP A2254G característico de las variantes neuropatogénicas, mientras que la restante poseía ambos nucleótidos A y G en la posición 2254.

Discusión

Los ensayos realizados con el panel de muestras de referencia, para la detección de EHV 1/4 por las técnicas de PCR estudiadas, obtuvieron idénticos resultados, mostrando una concordancia del 100%. Los ensayos de PCR semianidado y el PCR en tiempo real, mostraron mayor sensibilidad analítica para detectar EHV 1 (hasta la dilución 10^{-6}). Por lo tanto, dichas técnicas

podrían usarse en los estudios de detección de infección latente en muestras de tejido linfoide donde persisten bajos niveles de ácidos nucleicos de EHV 1 lo cual está de acuerdo con lo descrito por otros autores (Brochers y Slater, 1993, Edington y col., 1994, Carvalho y col. 2000b). El ensayo PCR multiplex y la PCR semianidada detectaron EHV 4 hasta la dilución 10^{-2} .

Sin embargo, la PCR multiplex presenta la ventaja de ser más sencilla y obtiene resultados más rápidos que la PCR semianidada para detectar EHV 1/4. Además la misma se podría usar para realizar diagnóstico en equinos clínicamente afectados, ya que los tejidos infectados contienen gran cantidad de ADN viral y no sería necesario contar con pruebas diagnósticas más sensibles.

La PCR en tiempo real ofrece la ventaja adicional de ser más rápida ya que no necesita realizar corridas electroforéticas post-ensayo. Además, debido a que es un método sensible y cuantitativo, es aplicable para realizar estudios de vigilancia, diagnóstico y evaluación de eficacia de vacunas para EHV 1, midiendo el nivel de EHV 1 en la viremia y en las descargas nasales. (Hussey y col., 2006).

Probablemente los genomas detectados en este trabajo, procedan de tejidos con infección de EHV 1 latente. Sin embargo, se deberían realizar otros estudios que detecten ARN de infección latente para poder confirmar esta conclusión (Carvalho y col., 2000). Contrariamente a lo sostenido por otros autores de que el PCR en tiempo real no detecta la infección latente (Hussey y col., 2006), en el presente trabajo se detectaron el mismo número de genomas de EHV 1 que el obtenido por el PCR-semianidado.

En relación a los ensayos realizados con las muestras de ganglios broncopulmonares de equinos enviados a planta de faena, la PCR semianidada y el PCR en tiempo real detectaron el mayor número de muestras positivas para EHV 1 (28%). A su vez, la PCR semianidada detectó que el 6% de los ganglios contenían el gen de la gB de EHV 4, mientras que la PCR multiplex no detectó ADN de EHV 4 en ninguno de ellos.

Otros autores han realizado estudios de prevalencia de EHV's y han encontrado diferentes valores, probablemente debido a diferencias en la población de equinos, localización geográfica y sensibilidad del test usado (Pusterla y col., 2012). Edington y col., (1994) detectaron EHV 1/4 en el 87,5% de muestras de ganglios pulmonares y trigéminos tomadas en una planta de faena. En Colombia (Ruiz y col., 2008), usando el mismo método de PCR semianidado, se reportó un prevalencia de EHV 1 del 28% en células mononucleares en sangre periférica y 57,8% en ganglios trigéminos y una prevalencia de EHV 4 de 47,7% y 6% en los mismos tejidos respectivamente. Carvalho y col., (2000) utilizando una prueba de PCR con oligos diseñados para detectar 3 fragmentos de diferente extensión del gen de la Timidin Kinasa y un cebador para detectar fragmentos del gen de la gCde EHV 1, determinaron que la prevalencia de infección latente, alcanzaba el 88% de 267 muestras obtenidas de hisopados nasales, leucocitos de sangre periférica y pool de vísceras de equinos obtenidas en granjas y plantas de faena en diversas regiones de Brasil en un período de seis años. A su vez, Pusterla y col., (2010) detectaron EHV 1 en un 3,3% de 153 muestras de ganglios submandibulares y en un 70% de 30 muestras de ganglios trigéminos de équidos colectadas de exámenes post-mortem.

En el estudio de caracterización genética del gen ORF 30 de EHV 1, se observó una alta frecuencia de detección de la variante neuropatogénica G2254. De los 13 genomas secuenciados, 12 amplicones poseían dicha mutación y el restante poseía ambos nucleótidos A y G en la posición 2254 probablemente debido a una infección mixta (Pusterla y col., 2010, Vissani y col., 2009).

Se han realizado diferentes estudios de detección de variantes que presentan polimorfismo simple de nucleótido (SNP) en la posición 2254 de ORF 30 de EHV 1 en diversas regiones geográficas y en diferentes tejidos. En un estudio de detección y caracterización genética de EHV 1 en muestras de células mononucleares de sangre periférica en equinos en Colombia (Ruiz y col., 2008) se secuenciaron 5 amplicones de ORF 30 de EHV 1 y en ninguno de ellos detectaron la variante neuropatogénica A2254G. Por otra parte, en Argentina (Vissani y col., 2009), se determinó que el 7% (4/54) de los casos de abortos fue inducido por el genotipo neuropatogénico de EHV 1 (G2254) y el 50% (2/4) de ellos se asociaba simultáneamente a enfermedad neurológica. A pesar de que las variantes neuropatogénicas se multiplican en forma más eficiente (Allen, 2007), las mismas no han mostrado un aumento de su prevalencia con el correr de los últimos años en Argentina, ya que la primer detección se realizó en 1996 y la segunda una década más tarde, en el 2007. A su vez en USA se ha reportado una prevalencia mayor al 75% para las cepas no neuropatogénicas (Goodman, 2006). Por otra parte, Pusterla y col. (2010) comunicaron que de 5 muestras de ganglios submandibulares estudiadas, encontraron 2 variantes neuropatogénicas, mientras que las restantes presentaban ambos genotipos de EHV 1. A su vez, hallaron que de 21

muestras de ganglios trigéminos, 9 presentaban la variante neuropatogénica o no neuropatogénicas, mientras que las restantes contenían ambos virus. Aparentemente la frecuencia y distribución de los biovares estarían influenciadas por la raza y el tipo de tejido estudiado (Pusterla y col., 2010).

Los resultados confirman la presencia de la infección por EHV 1 previamente descrita en nuestro país (Easton y col., 2009). Además se evidencia por primera vez la detección de EHV 4 y una alta frecuencia de detección de la variante neuropatogénica (G2254/D752) de herpesvirus equino 1 (EHV 1) en Uruguay. Este hallazgo aporta nuevos conocimientos epidemiológicos sobre la situación de la infección por EHV 1 y EHV 4 en nuestro país.

CAPÍTULO 4

Estudio de niveles de anticuerpos SRH y de factores asociados al nivel de protección contra gripe equina en la industria hípica en el Uruguay.³

Resumen

El virus de la influenza equina del subtipo H3N8 ha sido considerado como el patógeno respiratorio más importante de los caballos, debido a su naturaleza altamente contagiosa y a su rápida propagación entre animales susceptibles. Se ha demostrado que el grado de protección determinado por las vacunas inactivadas, está estrechamente relacionado con el nivel de anticuerpos

³ El contenido de este capítulo está publicado en: Castro ER, Gil AD, Arbiza J (2017) Estudio de niveles de anticuerpos contra influenza equina por ensayo de hemólisis radial simple (SRH) y de factores asociados al nivel de protección contra gripe equina en la industria hípica en el Uruguay. Aceptado para publicar en Veterinaria en fecha: 2/6/17

circulantes contra la hemaglutinina del virus de Influenza equina. El objetivo del presente trabajo es determinar la susceptibilidad de equinos de deporte en Uruguay a la infección por el virus de influenza equina mediante la cuantificación de anticuerpos SRH (hemólisis radial simple) y estudiar su asociación con factores como la edad, raza, sexo e historia de vacunación. Se procesaron 1.532 sueros equinos de diferentes razas, sexo y estado de vacunación por la prueba de SRH, pero para el análisis estadístico se utilizaron 1.390 que contaban con la información para todas las variables. Se realizó un análisis univariado para observar el comportamiento de las frecuencias observadas de las pruebas SRH por los factores de riesgo, utilizando la prueba χ^2 de Pearson. Se observó una baja cobertura de vacunación contra la Gripe Equina en los equinos de deporte (23%). Los niveles de protección virológica y clínica obtenidos por el ensayo de SRH fueron bajos (27% y 35% respectivamente). Se comprueba la mayor susceptibilidad a la infección por el virus H3N8, en equinos que no tienen vacunación vigente, en la raza árabe y cuarto de milla, en los equinos menores a 2 años de edad y en los machos castrados.

Palabras claves: Inmunidad SRH Influenza equina Uruguay

Abstract

The equine influenza virus subtype H3N8 has been considered the most important respiratory pathogen of horses, due to its highly contagious nature and its rapid spread among susceptible animals. It has been shown that the degree of protection determined by inactivated vaccines, is closely related to the level of circulating antibodies against the virus hemagglutinin Equine

influenza. The aim of this study is to determine the susceptibility of sport horses in Uruguay to infection by equine influenza virus by measuring antibodies SRH (single radial hemolysis), and study its association with factors such as age, horse breed, sex, and vaccination history. 1532 equine sera of different horse breed, sex and vaccination status by SRH were processed, and giving missing values only 1390 was considered for the statistical analysis. To observe the behavior of the observed frequencies of the SRH univariate analysis was performed Low coverage of vaccination against Equine Influenza in sport horses was observed (23%) and a very low level of virological and clinical immunity (27% and 35% respectively) against infection of H3N8 virus test determined by SRH test. Increased susceptibility to infection by the H3N8 virus was observed in horses without updated vaccination, Arab and Quarter mile breed horses, horses younger than 2 years old, and in castrated males horses.

Keywords: Immunity SRH Equine Influenza Uruguay.

Introducción

La Influenza equina (o Gripe Equina) es una enfermedad respiratoria aguda que afecta a los caballos, burros, mulas y cebras y es causada por los subtipos H7N7 y H3N8 del virus del género Influenza A de la familia *Orthomyxoviridae*. El subtipo H7N7 no ha sido aislado desde más de 30 años y el subtipo H3N8 es considerado como el patógeno respiratorio más importante de los caballos debido a su naturaleza altamente contagiosa y a su rápida propagación entre animales susceptibles (Timoney, 1996).

En équidos muy susceptibles, los síntomas clínicos incluyen fiebre, tos seca seguida de descarga nasal mucopurulenta debida a infección bacteriana

secundaria (Cullinane y col.,2013). En animales vacunados con inmunidad parcial, puede estar ausente uno o más de estos síntomas (Daly y col., 2004).

La Gripe Equina se presenta en el continente americano en forma endémica (Bryant y col., 2009). En el Uruguay, el primer diagnóstico de laboratorio se realizó en 1963 (Vallone y col., 1965); a partir de entonces se presenta en forma periódica. Desde 2006 se notifica anualmente a la Organización Mundial de Salud Animal (OIE, 2012, 2013, 2014-2016).

El control y la prevención de la enfermedad dependen de la aplicación de planes de vacunación eficaces y prácticas de bioseguridad que reduzcan el riesgo de transmisión a la población susceptible y disminuyan la producción de grandes cantidades de aerosoles (Van Maanen, 2002).

Se ha demostrado en estudios epidemiológicos y experimentales, que el grado de protección inducido por la vacunación con vacunas inactivadas, está estrechamente relacionado con el nivel de anticuerpos circulantes contra la hemaglutinina (HA) del virus de Influenza medidos por la técnica de Hemólisis Radial Simple (en inglés significa *Single Radial Hemolysis* y se abrevia: SRH), siendo el área de hemólisis producida por los anticuerpos contra la HA del virus de Influenza, directamente proporcional al nivel de protección contra la infección viral (Morley y col.,1995, Townsend y col., 1999,Mumford, 2001,Wood y col., 2007). La HA es la mayor proteína de la envoltura viral, tiene la propiedad de aglutinar eritrocitos y se sintetiza como un único polipéptido que se desdobra en dos cadenas HA1 Y HA2 unidas por puentes disulfuro, durante la replicación viral. La misma se une a receptores que contienen ácido siálico a la membrana celular de la célula huésped. La HA es el principal blanco de la

respuesta inmune protectora y por lo tanto es el componente fundamental a considerar en la formulación de las vacunas (Lewis y col, 2011). Los equinos que presentan valores menores a 50 mm^2 son susceptibles a la infección, mientras que los que tienen entre 50 y 85 mm^2 están parcialmente protegidos manifestando síntomas más leves y en un período más breve. Los que tienen área de hemólisis entre 85 y 140 mm^2 se encuentran clínicamente protegidos (protección clínica) y no manifiestan síntomas durante la infección viral, sin embargo, pueden eliminar virus infeccioso por aerosoles nasales (Mumford y col., 1994, Newton y col., 2000, Mumford, 2001). Los que tienen valores mayores a $> 140-150 \text{ mm}^2$, están clínicamente y virológicamente protegidos (protección virológica), es decir no excretan virus durante la infección viral (Newton y col., 2000). Los equinos que presentan niveles de anticuerpos menores a 50 mm^2 , tienen una probabilidad 15 veces mayor de ser casos índices ante la aparición de un brote de Gripe equina, lo cual representa un gran riesgo de infección para los equinos que están en contacto (Mumford, 2001).

Si bien la inmunidad celular es un componente importante en la respuesta inmune a la infección por el virus de Influenza, la misma no jugaría un rol importante cuando se usan vacunas inactivadas (Newton y col., 2000). A su vez existen diversos factores de riesgo que afectan el nivel de anticuerpos contra la hemaglutinina, tales como la edad, sexo, el número total de vacunas administradas, tiempo transcurrido desde la última vacunación y edad del animal cuando se vacunó por primera vez (Newton y col., 2000, Barquero y col., 2007).

En nuestro país, la vacunación contra la Influenza equina es obligatoria para todos los equinos con actividad deportiva, debiéndose revacunar cada 3 a 4 meses. La vacuna autorizada en Uruguay debe ser inactivada y contiene los subtipos H7N7 y H3N8 del virus de Influenza equina, aunque también se usan vacunas monovalentes al subtipo H3N8. Debido a que ya hace más de dos décadas que no se registran casos de Influenza equina causados por el subtipo H7N7, la OIE considera que ya no es necesario incluir esta cepa en la vacuna y recomienda el uso de cepas representativas de los clados 1 y 2 del sublinaje Florida del virus H3N8. Sin embargo, la detección de anticuerpos para este virus es de gran utilidad porque permite diferenciar anticuerpos asociados a infección de los inducidos por la vacunación (Gildea y col.,2010).

En Uruguay, no se conoce el grado de nivel de protección de la población vacunada ni tampoco se sabe en qué medida están asociados a factores tales como la edad, raza, sexo e historia de vacunación.

El objetivo del presente trabajo es determinar la susceptibilidad de equinos de deporte en Uruguay a la infección por el virus de influenza equina mediante la cuantificación de anticuerpos SRH y estudiar su asociación con factores como la edad, raza, sexo e historia de vacunación.

Materiales y métodos

Sueros

Se colectaron 1.532 sueros equinos ingresados al Laboratorio Oficial Veterinario (DILAVE "Miguel C. Rubino") para realizar test de Anemia Infecciosa Equina en el período de enero a marzo del año 2014, reseñando la

raza, edad, sexo y registro de vacunación realizada en un lapso no menor de 15 días ni mayor de 120 días. Durante el tiempo transcurrido en la recolección de las muestras no se reportaron diagnósticos de Influenza equina. La totalidad de los sueros fueron procesados por la técnica de SRH para cuantificar anticuerpos para el virus de Gripe Equina subtipo H3N8.

Virus

Se usó la cepa H3N8 clado 1 sublinaje Florida Arg 2012 E2345/2012 1 aislada durante el brote de Gripe ocurrido en Argentina en el año 2012. El virus fue gentilmente cedido por la Dra. María Barrandeguy (Laboratorio de Virología INTA-Castelar). El virus se propagó en huevos embrionados de pollo de 9-11 días de edad y los fluidos alantoideos fueron cosechados luego de incubar a 37°C durante tres días. Posteriormente se clarificaron por centrifugación y almacenaron a -70°C.

Prueba de Hemólisis Radial Simple (SRH)

El procedimiento de la prueba se efectuó según lo establece el Manual de la OIE (2014). El Virus de Influenza se adsorbió a eritrocitos de ovino con cloruro de cromo; posteriormente se prepararon placas de Petri con gel de agarosa conteniendo los eritrocitos sensibilizados y complemento de cobayo. Se colocan 10 µl de las muestras de suero inactivado a 56°C durante 30 minutos y se incuban 18-20 horas a 37°C. Los sueros controles positivos y negativos para el subtipo H3 de virus de Influenza equina fueron también cedidos por la Dra. María Barrandeguy (Laboratorio Virología INTA-Castelar). Los diámetros se midieron con un calibre digital.

Análisis estadístico

Se evaluaron las principales variables independientes y se eliminaron del análisis aquellos registros que tenían al menos una de las variables a analizar "missing". Los resultados de la prueba SRH se categorizaron de la siguiente manera: "Susceptibles" con valores menores a 50 mm^2 , "Parcialmente Protegidos" con valores entre 50 y 85 mm^2 , "Protegidos Clínicamente" 85 a 140 mm^2 y "Protegidos Clínica y Viroológicamente" cuando los valores fueron superiores a 140 mm^2 . También se categorizaron estas variables en dos grupos hasta 50 mm^2 "Alto Riesgo" y mayores de 50 mm^2 "Menor Riesgo".

Se realizó un análisis univariado preliminar para observar el comportamiento de las frecuencias observadas de las pruebas SRH por raza, sexo, edad y estatus de vacunación, utilizando para las evaluaciones de las asociaciones la prueba Chi^2 de Pearson. Las variables que fueron seleccionadas por tener un valor de significación $p < 0,10$ se utilizaron para construir un modelo de regresión logística. Para este modelo se utilizó como variable respuesta, la variable dicotómica que divide a los individuos como de alto riesgo "0" y menor riesgo "1" y como variables independientes los factores seleccionados en el análisis univariado. Se mantuvieron en el modelo aquellas variables que estaban asociadas con un valor $p < 0,05$.

La totalidad de los test estadísticos se procesaron utilizando el software Stata/SE (Versión 9.2 Stata-Corp, CollegeStation, Texas, USA).

Resultados

De un total de 1.532 sueros, se observaron que faltaban los datos con respecto a las siguientes variables: estatus de vacunación 67 (4%), razas 43 (3%), sexo 56 (4%) y edad 88 (6%). Es así que el registro está completo para 1.390 equinos y no fueron considerados 142 (9%) por carecerse de datos al menos en una de las variables.

De los registros considerados, 321 (23%) de las muestras corresponden a equinos vacunados contra Influenza Equina en un plazo menor a los 4 meses y mayor a los 15 días de la toma de la muestra.

La distribución de la muestra por razas nos muestra que las 2 principales son las cruzas 570 (41%) y SPC 619 (45%). Con menor representación aparecen: criolla 98 (7%), árabe 67 (5%) y cuarto de milla 36 (3%).

La distribución por sexo es bastante uniforme entre los que tienen esa información: machos 545 (39%), hembras 504 (36%) y machos castrados 341 (25%).

En cuanto a las edades están distribuidos de la siguiente forma: menores o iguales a 2 años 345 (25%), 3 a 4 años 399 (29%), 5 a 9 años 548 (39%) y mayores o iguales a 10 años 96 (7%).

En el cuadro 1 se observa la relación entre la respuesta a la prueba SRH frente al virus H3N8 y la vacunación ($\text{Chi}^2=29.47$ $p < 0.05$).

Cuadro 1: Relación protección en vacunados y no vacunados frente a H3N8

	H3N8		
	Vacuna	No Vacuna	Total
Susc.	14% (n=44)	23% (n=247)	21% (n=291)
PP	15% (n=47)	17% (n=187)	17% (n=234)
PC	34% (n=108)	35% (n=378)	35% (n=486)
PCyV	38% (n=122)	24% (n=257)	27% (n=379)
Total	100% (n=321)	100% (n=1069)	100% (n=1390)

Susc. : Categoría Susceptible; PP: Categoría Parcialmente Protegido; PC: Categoría Protección Clínica; PCyV: Categoría Protección Clínica y Viroológica
n= número de equinos

En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos en el análisis univariado del riesgo de infección por virus H3N8 en relación a las variables: vacunación, edad, raza y sexo, Se comprueba, como es de esperar, mayor riesgo de infección frente al H3N8 en los animales no vacunados frente a los vacunados, 27% vs 17% respectivamente ($p < 0.05$).

Cuadro 2. Riesgo de infección para H3N8 en relación a las variables vacuna, edad, raza y sexo.

	Mayor Riesgo	Menor Riesgo	total	Pearson chi2
Variable				
Vacuna				14,1
No vacunado	27%	73%	100%	
	(n=286)	(n=783)	(n=1069)	
Vacunado	17%	83%	100%	
	(n=53)	(n=268)	(n=321)	
edad				43,1
0-2	37%	63%	100%	
	(n=129)	(n=218)	(n=347)	
3-4	23%	77%	100%	
	(n=90)	(n=309)	(n=399)	
5-9	19%	81%	100%	
	(n=103)	(n=445)	(n=548)	
>= 10	12%	82%	100%	
	(n=17)	(n=79)	(n=96)	
Raza				18,6
arabe	31%	69%	100%	
	(n=21)	((n=46)	(n=67)	
criolla	7%	93%	100%	
	(n=7)	(n=91)	(n=98)	
cruza	25%	75%	100%	
	(n=142)	(n=428)	(n=570)	
cuarto de milla	22%	78%	100%	
	(n=8)	(n=28)	N=36)	
spc	26%	74%	100%	
	(n=161)	(n=458)	(n=619)	

sexo			8,0
hembra	24%	76%	100%
	(n=119)	(n=385)	(n=504)
macho	22%	78%	100%
	(n=118)	(n=427)	(n=545)
macho castrado	30%	70%	100%
	(n=102)	(n=239)	(n=341)

n= número de equinos

La raza criolla obtuvo la menor proporción de equinos con mayor riesgo (área de hemólisis $< 50 \text{ mm}^2$) a la infección por virus H3N8 (7%), mientras que la raza árabe presentó los mayores valores (31%) y los pura sangre tuvieron valores intermedios (26%). La raza estuvo asociada significativamente con la categoría de protección de estos virus ($p < 0,05$).

Según se muestra en el cuadro 2, la proporción de equinos susceptibles a infección por H3N8, es mayor en el grupo etario de 0 a 2 años de edad (33%) que en los grupos mayores donde cae sistemática y significativamente con la edad ($p < 0,05$).

En relación al sexo la proporción de equinos susceptibles a gripe equina es significativamente diferente entre ellos ($p < 0,05$), mostrando que los machos castrados son los que tienen mayor riesgo.

El modelo de regresión logística para las variables de respuesta de menor riesgo (más de 50 mm² de SRH) de infección frente al virus H3N8 (cuadro 3) muestran que los OR de las variables están asociados significativamente controlando por el efecto de confusión que podría ejercer alguna de las variables independientes sobre las otras. La vacunación disminuye el riesgo, así como el incremento de edades en forma consistente. La raza utilizada como referencia, fue la árabe y las otras razas con la excepción del cuarto de millas muestran menor riesgo, fundamentalmente la criolla. La diferencia en sexo macho vs hembra no son significativos, pero los machos castrados significativamente presentan mayor riesgo.

Cuadro 3. Regresión logística protección (menor riesgo) para H3N8 en relación a las variables independientes de vacuna, edad, raza y sexo

H3N8				
Variable	OR	Std. Err.	z	P
Vacuna	1,60	0,28	2,72	<0,05
3 - 4	2,21	0,38	4,63	<0,05
5 - 9	3,58	0,68	6,69	<0,05
>=10	4,43	1,41	4,70	<0,05
Criolla	8,90	4,35	4,47	<0,05
Cruza	1,75	0,51	1,93	<0,05
C. Milla	1,39	0,69	0,66	NS

SPC	1,99	0,62	2,19	<0,05
Macho	1,16	0,18	0,94	NS
M. castrado	0,55	0,10	-3,17	<0,05
cons	0,74	0,24	-0,92	NS

NS = No Significativo
Variable respuesta 0=Alto Riesgo 1=Menor Riesgo

Discusión

La Influenza equina es una enfermedad muy contagiosa y se considera que un equino infectado puede infectar a otros 10 equinos que están en contacto con él (Glass y col., 2002). Por lo tanto la identificación de la población susceptible permite establecer planes de vacunación más eficaces que tengan como finalidad reducir el impacto de un brote con la consecuente interrupción de eventos ecuestres (Gildea y col., 2010). Los equinos que presentan niveles de anticuerpos menores a 50 mm² representan a la población con mayor riesgo de infección (Mumford, 2001).

La mayor proporción de muestras pertenecen a la raza Pura Sangre de Carrera encabezando el grupo más importante de las razas equinas que participan en actividades de deporte en el Uruguay, lo cual coincide con lo descrito por otros autores (Ferrari, 2012).

Se pudo constatar una baja cobertura de vacunación contra influenza equina, solo el 23% de la población estudiada presentaba registros de vacunación vigentes (lapso no mayor a los 4 meses ni menor a los 15 días). Se considera

que la cobertura de vacunación debería alcanzar el 70% para evitar o controlar la aparición de un brote (Baker, 1986), e incluso otros autores sostienen que para asegurar la inmunidad poblacional, la misma tendría que ser mayor al 83%-94% (Satou, 2006).

Según lo establecido por diversos autores, se requieren valores de SRH entre 85-140 mm² y mayores a 140 mm² para alcanzar los niveles de protección clínica y virológica respectivamente (Gildea y col., 2010, Mumford, 1992, Mumford y col., 1994, Newton y col., 2000, Mumford, 2001). Solo el nivel de protección virológica evita la excreción del virus durante la infección viral, impidiendo el contagio y la infección a otros equinos y la expansión de un posible brote. En tal sentido, solo el 27 y el 35% de la población estudiada presenta un nivel de protección virológica y clínica respectivamente, frente a la infección por el virus H3N8. La inmunidad parcial solo lograría evitar la aparición o atenuar los síntomas clínicos, pero no evitaría la excreción viral exponiendo al resto de la población susceptible a la infección viral. Esto representa un riesgo importante para la introducción y/o expansión de la enfermedad, ya que podrían ingresar equinos clínicamente sanos, pero portadores del virus infeccioso con la amenaza potencial de infectar a equinos susceptibles. Por ejemplo, el brote ocurrido en Australia en el 2007, que causó pérdidas de aproximadamente un billón de dólares para la industria equina, se debió a la importación de equinos vacunados con infección subclínica por virus H3N8 tipo Florida clado 1 (Gildea y col., 2010). Dichos equinos fueron importados de Japón donde fueron vacunados con vacunas elaboradas con cepas de virus no actualizadas y por lo tanto las mismas no conferían niveles de protección suficientes para proteger frente a la infección inducida por las

cepas de virus de campo actuante en el momento del brote (Callinan, 2008, Paillot, 2014).

En otro estudio realizado en Argentina (Carosino y col., 2014) se comprobó que un 97% y 74% de la población de equinos del hipódromo de Palermo y un 88.5% y 89% de la de San Isidro presentaban niveles de anticuerpos altos e intermedios en 2012 y 2013 respectivamente, concluyendo que el riesgo de padecer un brote epizoótico de Influenza equina tras una re-introducción del virus en estas poblaciones era bajo, a pesar que en el hipódromo de Palermo se observó un incremento en el número de equinos con bajos niveles de anticuerpos en el muestreo de 2013, lo que por consiguiente aumentaría el riesgo de infección en dicha población

Solo el 63% de los equinos menores de 2 años presentan niveles de anticuerpos para el virus H3N8 mayores a 50 mm^2 que se asocian a una población con menor riesgo de infección frente a este virus. El valor promedio del área para esta categoría de edad fue de 77 mm^2 que es un valor intermedio y similar a los hallados en Reino Unido por Newton y col (2000), valores promedio de 64 mm^2 y 115 mm^2 para equinos de 1 y 2 años respectivamente. A su vez, en Irlanda (Gildea y col., 2010), los valores promedio hallados, fueron de 94 mm^2 , para equinos de un año de edad. Estos hallazgos estarían indicando que el nivel de protección frente a la infección de virus H3N8 sería un poco más bajo que el encontrado en estos países y quizás tendríamos que diferenciar entre los valores de 1 y 2 años lo cual no es posible comprobar con los datos disponibles.

Al igual que lo descrito por otros autores (Newton y col.,2000, Gildea y col., 2010) en este estudio se encontró que la proporción de equinos susceptibles a infección por H3N8, es mayor en el grupo etario de 0 a 2 años de edad que en los grupos mayores donde cae sistemática y significativamente con la edad ($p < 0,05$). Esta asociación entre la edad y la susceptibilidad es confirmada por el modelo de regresión logística, el cual al ajustar por raza, sexo y estatus de vacunación demuestra que no se trata la misma de un efecto de confusión por las otras variables.

Esto determina que los equinos más jóvenes, sean más susceptibles a la infección viral, en especial los que están alojados en ambientes poco ventilados, con gran concentración de animales, como por ejemplo lo son los lugares de venta, o de entrenamiento (Newton y col., 2000).

La falla de la inmunidad estaría vinculada a la baja cobertura de vacunación, baja potencia de las vacunas, pobre respuesta inmune y diferencias antigénicas entre el virus vaccinal y de campo (Newton y col., 2000a y 2000b, Gildea, y col., 2011).

Según los resultados del análisis de regresión logística, todas las variables estudiadas están asociadas significativamente. El análisis estadístico de regresión logística permite ajustar la variable en estudio (nivel de anticuerpos SRH) con los diferentes factores de asociación (vacunación, edad, raza, sexo) estableciendo asociaciones entre ellos significativas. La raza criolla obtuvo mayor nivel de protección virológica que las otras razas, los factores como la vacunación vigente y el aumento de la edad disminuyen el riesgo de infección por el virus H3N8. Una causa probable de que la raza criolla haya presentado

niveles de protección virológica mayores que las otras razas puede ser que la misma haya sido sometida a planes más rigurosos de vacunación contra Influenza Equina. Sin embargo es muy difícil tener información confiable acerca de los antecedentes de vacunaciones y revacunaciones correspondientes. Considerando que el efecto de la raza en el modelo está controlado por la edad, sexo y estatus de vacunación es posible que la misma se pueda explicar por factores genéticos, pero para demostrarlo sería necesario confirmarlo con otros estudios.

En relación al sexo, no se halló una diferencia significativa entre los grupos macho y hembra, pero los machos castrados presentan mayor riesgo a la infección una vez controlado los efectos de la raza, edad y estatus de vacunación. No se pudo comparar nuestros resultados con los hallados por otros autores debido a que se clasificaron los sexos en forma diferente. En este estudio se definieron tres grupos, machos, machos castrados y hembras. Al no estar incluida la categoría macho castrado en lo reportado por otros autores, es difícil hacer comparaciones con los hallazgos obtenidos. Si se consideraran a los machos castrados como machos, entonces en el análisis estadístico no se encontrarían diferencias significativas entre las categorías hembra y macho. Otros autores han encontrado que el sexo macho está asociado a un mayor riesgo frente a la infección del virus H3N8. Por ejemplo, Barquero y col. (2007) sostienen que existe dimorfismo sexual, siendo los machos más susceptibles a la infección debido a mecanismos inhibitorios de la testosterona en la respuesta inmune. Por otro lado Ryan y col. (2015), encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos SRH entre machos y hembras un mes post revacunación. Las hembras presentaban una respuesta superior,

posiblemente debida a una mayor producción de linfocitos CD4+ inducida por la revacunación contra la Influenza equina. Sin embargo, estos autores también incluyen a los machos castrados, en la categoría de los machos. Por lo tanto sería necesario realizar otros estudios que confirmen estos hallazgos utilizando categorías de sexo bien definida

Conclusiones

Se observó una baja cobertura de vacunación contra la Gripe Equina en los equinos de deporte. Además se comprobó un nivel muy bajo de protección clínica y virológica frente a la infección de virus H3N8 determinado por la prueba SRH. El nivel de protección contra el virus de Influenza equina H3N8 está asociado a factores como la raza, edad, sexo y la vacunación. El análisis estadístico de regresión logística permite inferir una mayor susceptibilidad a la infección por el virus H3N8, en equinos que no tienen vacunación vigente, en la raza árabe y cuarto de milla, en los equinos menores a 2 años de edad y en los machos castrados. Sería importante confirmar estas asociaciones con otros estudios y poblaciones que puedan confirmarlas o desecharlas.

Por otro lado se debería fortalecer la vigilancia epidemiológica y los programas de vacunación especialmente en las poblaciones con mayor riesgo de infección, a los efectos de prevenir y reducir el impacto económico-social de nuevos brotes epidémicos de Influenza equina.

A tales efectos, la prueba de SRH podría ser una herramienta útil para monitorear el nivel de inmunidad de la población equina y para establecer programas de vacunación, en base a evidencias científicas, más eficaces.

CAPÍTULO 5

Discusión general

Seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes contra EHV 1.

En muchos países la seroprevalencia de EHV 1 y EHV 4 es muy alta (Maanen, 2002). La prevalencia general de EHV 1 encontrada en los equinos de deporte en el Uruguay es del 29% (IC 95%= 27-31%), valor similar al descrito en otros países. Por ejemplo, Crabb y Studdert (1993), en un muestreo realizado en SPC en Australia en el período 1967-1976 y el año 1993, detectó una prevalencia de 9-28% para EHV 1 y 100% para EHV 4. Posteriormente, luego de la primera confirmación de aborto por EHV 1 en 1997, la prevalencia para este serotipo aumentó al 30% (Crabb y col, 1995). En 1995, en un estudio transversal realizado en el mismo país utilizando la misma prueba de ELISA tipo específica, con una población de 229 yeguas madres SPC con potrillo al pie, se encontró una prevalencia similar, de 100% para EHV 4 y de 26,2% y 11,4% para EHV 1 en madres y potrillos respectivamente (Gilkerson y col, 1999). En Nueva Zelanda la seroprevalencia en SPC es mayor que la hallada en Australia y en nuestro país, fue del 29%, 48% y 70% en potrillos de 6-12 meses, 12-24 meses y adultos mayores de 2 años de edad, respectivamente (Donald y col, 1998), posiblemente debido a que la infección está más difundida en ese país (Dunowska, 2014). En otro estudio serológico realizado en el estado de San Pablo - Brasil en el 2004, se obtuvo una prevalencia del 26% para EHV 1 (Cunha y col, 2009). En una investigación realizada en el estado de Minas Gerais en el 2010 se obtuvo una prevalencia menor (18,7%), probablemente debido a que las muestras colectadas fueron tomadas de

animales asintomáticos (Lara y col, 2010). En el estado de Pará, Heinemann y col. (2002), reportaron una prevalencia similar (17,71%).

Sin embargo, cuando se comparan los resultados con los hallados por otros autores es necesario tener en cuenta el tipo de prueba serológica utilizada, visto que hay diferencias de especificidad y sensibilidad diagnóstica entre las mismas (Hartley y col., 2005, Edington y Bridges., 1990, Crabb y col., 1995).

Factores asociados a seroprevalencia de infección por EHV 1.

Vacunación.

En este estudio, los equinos vacunados, representan 24% de la población, siendo la proporción de positivos a EHV 1, de los vacunados y no vacunados de un 38% y 27 % respectivamente. Estos valores difieren con los hallados en Argentina por Galosi y col, 1991 (48% y 11% respectivamente), posiblemente una parte de estas diferencias pueda explicarse por el criterio adoptado para definir a la población vacunada, puesto que los autores consideran como no vacunados a los equinos vacunados hace más de cuatro meses, porque la inmunidad conferida por la vacunación perdura durante pocos meses (OIE, 2015).

Edad.

Se observó una prevalencia menor en los estratos menores de 5 años que en la categoría de 5-10 años de edad, lo cual coincide con lo descrito en otros países, donde la prevalencia es mayor en los adultos que en potrillos (Gilkerson y col, 1999). Sin embargo cuando analizamos por la raza y vacunación en el análisis de regresión logística, no se observó el efecto de la

edad sobre la seroprevalencia. tal vez, la razón se deba a que no se pudo subestratificar la categoría de equinos menores de 3 años, para poder evidenciar diferencias significativas entre los estratos menores (por ejemplo 1, 2 y 3 años de edad).

Raza.

Según los resultados del análisis de regresión logística, la condición de la raza árabe, junto con la Anglo-árabe, Oldenburg y KWPN, obtuvo mayor probabilidad de presentar seropositivos que las otras razas y el efecto es mayor en las poblaciones vacunadas, comprobándose que el factor vacunación también afecta la seroprevalencia.

En el modelo se observa que existe interacción entre las razas y la vacunación, probablemente porque las frecuencias y los tiempos de vacunación son diferentes entre las razas, o bien, porque simplemente ellas responden en forma diferencial por razones genéticas (Dunowska, 2014).

Epidemiología molecular de herpesvirus equino en Uruguay.

Puesta a punto ensayos moleculares.

Los ensayos moleculares son pruebas rápidas muy sensibles y específicas. Se han desarrollado gran variedad de técnicas de PCR convencional que detectan diversos genes de los EHV's (Carvalho y col., 2000a, O'keefe y col., 1991; Wagner y col., 1992; Kirisawa y col., 1993; Borchers y Slater, 1993.; Lawrence y col., 1994; Galosi y col., 2001., Varrasso y col., 2001). A su vez, las técnicas de PCR en tiempo real ofrecen otras ventajas, como la de ser más sensibles, rápidas y presentar menor riesgo de contaminación cruzada (Diallo y col.,

2006). Se evaluó la sensibilidad y la especificidad de diferentes pruebas moleculares para identificar herpes virus equino. Los ensayos realizados con el panel de muestras de referencia, para la detección de EHV 1/4 por las técnicas de PCR estudiadas, obtuvieron idénticos resultados, mostrando una concordancia del 100%. Los ensayos de PCR semianidado y el PCR en tiempo real, mostraron mayor sensibilidad analítica para detectar EHV 1 (hasta la dilución 10^{-6}). Estos hallazgos permiten inferir que tanto el PCR semianidado como la PCR en tiempo real, podrían ser usados para estudios de detección de infección latente en muestras de tejido linfoide donde persisten bajos niveles de ácidos nucleicos de EHV 1 (Brochers y Slater, 1993, Edington y col., 1994, Carvalho y col. 2000b). La PCR en tiempo real ofrece la ventaja adicional de ser más rápida ya que no necesita realizar corridas electroforéticas post-ensayo. Además, debido a que la misma es un método sensible y cuantitativo, es aplicable para realizar estudios de vigilancia, diagnóstico y evaluación de eficacia de vacunas para EHV 1, midiendo el nivel de EHV 1 en la viremia y en las descargas nasales. (Hussey y col., 2006).

El ensayo PCR multiplex y la PCR semianidada detectaron EHV 4 hasta la dilución 10^{-2} .

En relación a los ensayos realizados con las muestras de ganglios broncopulmonares de equinos enviados a planta de faena, la PCR semianidada y el PCR en tiempo real detectaron el mayor número de muestras positivas para EHV 1 (28%). A su vez, la PCR semianidada detectó que el 6% de los ganglios contenían el gen de la gB de EHV 4, mientras que la PCR multiplex no detectó ADN de EHV 4 en ninguno de ellos.

Detección y genotipificación de EHV1 en ganglios broncopulmonares de equinos en planta de faena.

Diversos autores han realizado estudios de prevalencia de EHV1 y han encontrado diferentes valores, probablemente debido a diferencias en la población de equinos, localización geográfica y sensibilidad del test usado (Pusterla y col., 2012, Edington y col., 1994, Carvalho y col., 2000, Pusterla y col., 2010).

En el estudio de caracterización genética del gen ORF 30 de EHV 1, se observó una alta frecuencia de detección de la variante neuropatogénica G2254. De los 13 genomas secuenciados, 12 amplicones poseían dicha mutación y el restante poseía ambos nucleótidos A y G en la posición 2254 probablemente debido a una infección mixta (Pusterla y col., 2010, Vissani y col., 2009).

Se han realizado diferentes estudios de detección de variantes que presentan polimorfismo simple de nucleótido (SNP) en la posición 2254 de ORF 30 de EHV 1 en diversas regiones geográficas y en diferentes tejidos (Ruiz y col., 2008., Vissani y col., 2009, Allen., 2007, Goodman., 2006). Aparentemente la frecuencia y distribución de los biovares estarían influenciadas por la raza y el tipo de tejido estudiado (Pusterla y col., 2010).

Estudio de inmunidad y de factores asociados al nivel de protección contra gripe equina en la industria hípica en el Uruguay.

Estudio de inmunidad protectora contra gripe equina.

La Influenza equina es una enfermedad muy contagiosa y se considera que un equino infectado puede infectar a otros 10 equinos que están en contacto con él (Glass y col., 2002). Por lo tanto la identificación de la población susceptible permite establecer planes de vacunación más eficaces para reducir el impacto de la aparición de un brote con la consecuente interrupción de eventos ecuestres (Gildea y col., 2010). Se ha demostrado en estudios epidemiológicos y experimentales, que el grado de protección inducido por la vacunación con vacunas inactivadas, está estrechamente relacionado con el nivel de anticuerpos circulantes contra la hemaglutinina (HA) del virus de Influenza medidos por la técnica de Hemólisis Radial Simple (SRH), siendo el área de hemólisis producida por los anticuerpos contra la HA del virus de Influenza, directamente proporcional al nivel de protección contra la infección viral (Morley y col., 1995, Townsend y col., 1999, Mumford, 2001, Wood y col., 2007). Los equinos que presentan niveles de anticuerpos menores a 50 mm^2 representan a la población con mayor riesgo de infección (Mumford, 2001).

Se pudo constatar una baja cobertura de vacunación contra influenza equina, porque solo el 23% de la población estudiada presentaba registros de vacunación vigentes (lapso no mayor a los 4 meses ni menor a los 15 días). Se considera que la cobertura de vacunación debería alcanzar el 70% para evitar o controlar la aparición de un brote (Baker, 1986), e incluso otros autores sostienen que para asegurar la inmunidad poblacional, la misma tendría que ser mayor al 83%-94% (Satou, 2006).

Según lo establecido por diversos autores, se requieren valores de SRH entre $85\text{-}140 \text{ mm}^2$ y mayores a 140 mm^2 para alcanzar los niveles de protección clínica y virológica respectivamente (Gildea y col., 2010, Mumford, 1992,

Mumford y col., 1994, Newton y col., 2000, Mumford, 2001). Solo el nivel de protección virológica evita la excreción del virus durante la infección viral, impidiendo el contagio y la infección a otros equinos y la expansión de un posible brote. En tal sentido, solo el 27 y el 35% de la población estudiada presenta un nivel de protección virológica y clínica respectivamente, frente a la infección por el virus H3N8. La inmunidad parcial solo lograría evitar la aparición o atenuar los síntomas clínicos, pero no evitaría la excreción viral exponiendo al resto de la población susceptible a la infección viral. Esto representa un riesgo importante para la introducción y/o expansión de la enfermedad, puesto que podrían ingresar equinos clínicamente sanos, pero portadores del virus infeccioso con la amenaza potencial de infectar a equinos susceptibles.

Solo el 63% de los equinos menores de 2 años presentan niveles de anticuerpos para el virus H3N8 mayores a 50 mm² que se asocian a una población con menor riesgo de infección frente a este virus.

Estudio de factores asociados al nivel de protección inmunitaria contra gripe equina.

Según los resultados del análisis de regresión logística, todas las variables estudiadas están asociadas significativamente. El análisis estadístico de regresión logística permite ponderar la variable en estudio (nivel de anticuerpos SRH) con los diferentes factores de asociación (vacunación, edad, raza, sexo) estableciendo asociaciones entre ellos significativas.

Edad

Al igual que lo descrito por otros autores (Newton y col., 2000, Gildea y col., 2010) en este estudio se encontró que la proporción de equinos susceptibles a infección por H3N8, es mayor en el grupo etario de 0 a 2 años de edad que en los grupos mayores donde cae sistemática y significativamente con la edad ($p < 0,05$). Esta asociación entre la edad y la susceptibilidad es confirmada por el modelo de regresión logística, el cual al ajustar por raza, sexo y estatus de vacunación demuestra que no se trata la misma de un efecto de confusión por las otras variables.

Esto determina que los equinos más jóvenes, sean más susceptibles a la infección viral, en especial los que están alojados en ambientes poco ventilados, con gran concentración de animales, como por ejemplo lo son los lugares de venta, o de entrenamiento (Newton y col., 2000).

Raza

La raza criolla obtuvo mayor nivel de protección virológica para la infección por el virus H3N8, en comparación con las otras razas. Una causa probable de que la raza criolla haya presentado niveles de protección virológica mayores que las otras razas puede ser que la misma haya sido sometida a planes más rigurosos de vacunación contra Influenza Equina. Sin embargo es muy difícil tener información confiable acerca de los antecedentes de vacunaciones y revacunaciones correspondientes. Considerando que el efecto de la raza en el modelo está controlado por la edad, sexo y estatus de vacunación es posible que la misma se pueda explicar por factores genéticos, pero para demostrarlo sería necesario confirmarlo con otros estudios.

Sexo.

En relación al sexo, no se halló una diferencia significativa entre los grupos macho y hembra, pero los machos castrados presentan mayor riesgo a la infección una vez controlado los efectos de la raza, edad y estatus de vacunación. Otros autores han encontrado que el sexo macho está asociado a un mayor riesgo frente a la infección del virus H3N8. Por ejemplo, Barquero y col. (2007) sostienen que existe dimorfismo sexual, siendo los machos más susceptibles a la infección debido a mecanismos inhibitorios de la testosterona en la respuesta inmune. Por otro lado Ryan y col. (2015), encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos SRH entre machos y hembras un mes post revacunación. Las hembras presentaban una respuesta superior, posiblemente debida a una mayor producción de linfocitos CD4+ inducida por la revacunación contra la Influenza equina. Sin embargo, estos autores también incluyen a los machos castrados, en la categoría de los machos. Por lo tanto sería necesario realizar otros estudios que confirmen estos hallazgos utilizando categorías de sexo bien definidas.

Conclusiones finales

Con respecto a las hipótesis planteadas se concluye que:

- La seroprevalencia de EHV1 en Uruguay (29%) indica una amplia distribución como la observada en los países de la región, como Brasil (18-26%) y Argentina (11-48%).
- La misma está asociada a factores como la raza y al estado de vacunación .

- La variante neurovirulenta G2254 en Uruguay presenta una alta frecuencia de distribución (100%), a diferencia de las observadas en Argentina (7%).
- Que los niveles de protección frente a la infección por el virus de Influenza Equina previo al ingreso de los equinos a los eventos hípico - deportivos, son bajos.
- Que los mismos estén asociados a factores como la raza, estado de vacunación, edad y sexo.

Se comprueba que la RE se encuentra ampliamente distribuida en la población de equinos de deporte en nuestro país, cuya prevalencia estimada es 29% (IC 95% = 27-31%), sin embargo la misma puede ser menor a la estimada debido a la interferencia causada por los anticuerpos seroneutralizantes para EHV 1 asociados a la vacunación ($p < 0,05$).

En el modelo se observa que existe interacción entre las razas y la vacunación, probablemente porque las frecuencias y los tiempos de vacunación son diferentes entre las razas.

Los resultados confirman la presencia de la infección por EHV 1 previamente descrita en nuestro país (Easton y col., 2009). Además se evidencia por primera vez la detección de EHV 4 y una alta frecuencia de detección de la variante neuropatogénica (G2254/D752) de herpesvirus equino 1 (EHV 1) en Uruguay. Este hallazgo aporta nuevos conocimientos epidemiológicos sobre la situación de la infección por EHV 1 y EHV 4 en nuestro país.

Se observó una baja cobertura de vacunación contra la Gripe Equina en los equinos de deporte. Además, se comprobó un nivel muy bajo de protección clínica y virológica frente a la infección de virus H3N8 determinado por la prueba SRH. El nivel de protección contra el virus de Influenza equina H3N8 está asociado a factores como la raza, edad, sexo y la vacunación. El análisis estadístico de regresión logística permite inferir una mayor susceptibilidad a la infección por el virus H3N8, en equinos que no tienen vacunación vigente, en la raza árabe y cuarto de milla, en los equinos menores a 2 años de edad y en los machos castrados. Sería importante confirmar estas asociaciones con otros estudios y poblaciones que puedan confirmarlas o desecharlas.

Bibliografía

1. Acuña P. (2009) Evaluación de anticuerpos neutralizantes contra Influenza Equina y Herpes Equino – 4 en equinos residentes del hipódromo nacional de Maroñas durante un brote de sintomatología compatible con enfermedad respiratoria. Tesis. Licenciatura Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1652/1/uy24-15125.pdf> Fecha de consulta: 29.3.16.
2. Allen GP (2002) Epidemic disease caused by equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Vet Educ* 4, 177-183.
3. Allen GP (2007) Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J Vet Diagn Invest* 19(1):69-72.
4. Allen GP, Bolin DC, Bryant U, Carter CN, Giles RC, Harrison IR, Hong CB, Jackson CD, Poonacha K, Wharton R, Williams NM (2008) Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine Vet J* 40(2):105-110.
5. Allen GP, Breathnach CC (2006) Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV 1. *Equine Vet J* 38(3):252-257.

6. Allen GP, Bryans JT (1986) Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progr Vet Microbiol Immunol* 2: 78-144.
7. Allen GP, Yeargan, MR, Turtinen LW, Bryans JT, Mc Collum EH (1983) Molecular epizootologic studies of equines herpesvirus 1 infections by restriction endonucleases fingerprinting of DNA. 44 (2): 263-271. *Am J Vet Res* 44(2): 263-271.
8. Ataseven VS, Dagalp SB, Guzel M, Basaran Z, Tan MT, Geraghty B (2009) Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Res Vet Sci.* 86:339–344.
9. Baker, DJ (1986) Rationale for the use of influenza vaccines in horses and the importance of antigenic drift. *Equine Vet J* 18(2):93–96.
10. Barquero N, Daly JM, Newton JR (2007) Risk factors for Influenza in vaccinated racehorses: lessons for an outbreak in Newmarket, UK in 2003. *Vaccine* 25(43):7520-9.
11. Barquero N, Daly JM, Newton JR (2007) Risk factors for Influenza in vaccinated racehorses: lessons for an outbreak in Newmarket, UK in 2003. *Vaccine* 25(43):7520-9.
12. Borchers K, Slater J (1993) A nested PCR for the detection and differentiation of EHV 1 and EHV 4. *J Virol Methods* 45(3):331-36.
13. Borchers K, Thein P, Sterner-Kock A (2006) Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation. *Equine Vet J* 38(3):283-287.

14. Breathnach CC, Yeargan MR, Sheoran AS, Allen GP (2001) The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Vet J* 33(7):651-657.
15. Brown JA, Mapes S, Ball BA, Hodder AD, Liu IK, Pusterla N (2007) Prevalence of equine herpesvirus-1 infection among Thoroughbreds residing on a farm on which the virus was endemic. *J Am Vet Med Assoc* 231(4): 577-580.
16. Bryant NA, Rash AS, Russell CA, Ross J, Cooke A, Bowman S, MacRae S, Lewis NS, Paillot R, Zanoni R, Meier H, Griffiths LA, Daly JM, Tiwari A, Chambers TM, Newton JR, Elton DM (2009) Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet. Microbiol* 138(1-2):41-52.
17. Bürki F, Rossmanith W, Nowotny N, Pallan C, Mostl K, Lussy H (1990) Viremia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses. *Vet Q* 12(2):80-86.
18. Burrows R, Denyer M (1982) Antigenic properties of some equine influenza viruses. *Arch Virol* 73(1):15-24.
19. Burrows R, Goodridge D, Denyer M, Hutchings G (1982) Equine Influenza infections in Great Britain, 1979. 110: 494-497. *Vet Rec* 110(21):494-497.
20. Callinan I (2008) Equine Influenza: The august 2007 outbreak in Australia. Report of the equine influenza inquiry. Commonwealth of Australia, Canberra, Australia. Disponible en:

[http://www.equineinfluenzainquiry.gov.au/eiiexhibits/rep0001.001.0001.p](http://www.equineinfluenzainquiry.gov.au/eiiexhibits/rep0001.001.0001.pdf)

df Fecha de consulta: 29.3.16.

21. Carossino M, Olgúin PC, Miguens SA, Vissani A, Becerra L, Duffy SJ, Campodónico R, Arcuri C, Costa A, Zambruno T, Elgue F, Gómez MS, Zabal O, Barrandeguy ME (2013) Estimación de los niveles de protección contra Influenza equina en caballos en entrenamiento y competencia. Especie equina. (Asociación Argentina de Veterinaria Equina AAVE) N°45:36-43.
22. Carroll CL, Westbury HA (1985) Isolation of equine herpesvirus 1 from the brain of a horse affected with paresis. Aust Vet J 62(10):345-346.
23. Carvalho R, Oliveira AM, Souza AM, Passos LM, Martins AS (2000) Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. Arch Virol 145(9):1773-1787.
24. Carvalho R, Passos IMF, Martins S (2000) Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 47(5):351-9.
25. Castro ER, Gil AD, Arbiza J (2016) Estudio de seroprevalencia y de factores que afectan el nivel anticuerpos seroneutralizantes contra EHV 1 en equinos que participan en actividades hípico-deportivas en el Uruguay. Veterinaria 52 (201-204): 82-87.
26. Chambers TM, Shortridge KF, Li PH, Powell DG, Watkins KL (1994) Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. Vet Rec 135(12):275-79.

27. Chesters PM, Allsop R, Purewal A, Edington N (1997) Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J Virol* 71(5): 3437-43.
28. Coggins L (1979) Viral respiratory disease. *Vet Clin North Am, Large Anim Pract* 1(1):59-72.
29. Cook RF, Sinclair R, Mumford JA (1988) Detection of influenza nucleoprotein antigen in nasal secretions from horses infected with A/equine influenza (H3N8) viruses. *J Virol Methods* 20(1):1-12.
30. Crabb BS, MacPherson CM, Reubel GH, Browning GF, Studdert MJ, Drummer HE (1995) A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch Virol.* 140:245-258.
31. Crabb BS, Studdert MJ (1993) Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J Virol* 67(10):6332-38.
32. Crabb BS, Studdert MJ (1993) Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J Virol.*67(10):6332-8.
33. Crabb BS, Studdert MJ (1995) Equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv Virus Res.* 45:153-90.
34. Cullinane A, Elton D, Mumford J (2010) Equine influenza - surveillance and control. *Influenza Other Respir Viruses* 4(6):339–344.
35. Cullinane A, Newton JR (2013) Equine influenza: a global perspective. *Vet Microbiol* 167(1-2): 205-14.

36. Cullinane A, Weld J, Osborne M, Nelly M, Mc Bride C, Walsh C (2001) Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet J* 16(2):174-185.
37. Cunha EMS, Villalobos EMC, Nassar AFC, Lara, MCCSH, Peres NF, Palazzo JPC, Pino FA.(2009) Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do estado de São Paulo. *Arq Inst Biol.* 76:165-171.
38. Daly JM, Lai AC, Binns MM, Chambers, TM, Barrandeguy M, Mumford JA (1996) Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J Gen Virol.* 77(4):661-671.
39. Daly JM, Newton JR, Mumford JA (2004) Current perspectives on control of equine influenza. *Vet Res* 35(4):411-23.
40. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, Mcgeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order herpesvirales. *Arch Virol.* 154(1):171-7
41. De la Rua-Domenech R, Reid SW, Gonzalez-Zariquey AE, Wood J, Gettinby G (1999) Modelling the spread of a viral infection in equine populations managed in thoroughbred racehorse training yards. *Prev Vet Med.* 47(1-2):61-77.
42. Del Piero D, Wilkins PA (2001) Pulmonary vasculotropic EHV 1 infection in equids. *Vet Pathol* 38(4):474.
43. Diallo IS, Hewitson G, Wright LL, Kelly MA, Rodwell BJ, Corney BG (2007) Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) and equid herpesvirus 4 (EHV 4). *Vet Microbiol* 123(1-3):93-103.

44. Dimock WW, Edwards PR (1933) Is there a filterable virus of abortion in mares? *Ky Agr Exp Stat Bull* 333: 297-301.
45. Donald JJ (1998) Epidemiology and diagnosis of equid herpesviruses 1 and 4 in horses in New Zealand. PhD thesis, Massey University, Palmerston North. 232p.
46. Drummer HE, Reynolds A, Studdert MJ, Mac Pherson CM, Crabb BS (1995) Application of an equine herpesvirus 1 (EHV 1) type-specific Elisa to the management of an outbreak of EHV 1 abortion. *Vet Rec* 136(23):579-581.
47. Dunowska M (2014) A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *NZ Vet J.* 62:179–188.
48. Easton C, Fuentealba NA, Paullier C, Alonzo P, Carluccio J, Galosi CM (2009) Immunohistochemical and molecular detection of equine herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 28(3):1085-90.
49. Edington N, Bridges CG (1990) One way protection between equid herpesvirus 1 and 4 in vivo. *Res Vet Sci.* 48(2):235-9.
50. Edington N, Bridges CG, Huckle A (1985) Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet J* 17(5):369-372.
51. Edington N, Bridges CG, Patel JR (1986) Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch Virol* 90(1-2):111-124.

52. Edington N, Smyth B, Griffiths L (1991) The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV 1) abortions. *J Comp Pathol.*104(4):379-87.
53. Edington N, Welch HM, Griffiths L (1994). The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet J* 26(2):140-2.
54. Elia G, Decaro N, Martella V, Campolo M, Desario C, Lorusso E, Cirone F, Buonavoglia C (2006) Detection of equine herpesvirus type 1 by real time PCR. *J Virol Methods* 133(1):70-5.
55. Ferrari A (2012) Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay. Informe final. Uruguay XXI, Montevideo.150 p.
56. Folsom RW, Littlefield-Chabaud MA, French DD, Pourciau SS, Misticic I, Horohov DW (2001) Exercise alters the immune response to equine influenza virus and increases susceptibility to infection. *Equine Vet J* 33(7):664-9.
57. Foote CE, Love DN, Gilkerson JR (2004) Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in unweaned Thoroughbred foals from vaccinated mares on a large stud farm. *Equine Vet J* 36(4):341-5.
58. Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Wellington JE, Whalley JM (2006) EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. *Vet Immunol Immunopathol* 111(1-2):41-46.
59. Foote CE, Love DN, Gilkerson JR, Whalley JM (2002) Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine. *Vet Microbiol* 88(1):13-25.

60. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van der Kemp L, Rimmelzwaan, GF, Osterhaus AD (2000) Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol* 38(11):4096-101.
61. Friday PA, Scarratt WK, Elvinger F, Timoney PJ, Bonda A (2000) Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J. Vet Intern Med* 14(2):197-201.
62. Fritsche AK, Borchers K (2011) Detection of neuropathogenic strains of Equid herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Vet Microbiol* 147(1-2):176-80.
63. Galosi CM, Oliva GA, Etcheverrigaray ME (1991) Herpes equino 1 y 4: agente etiológico y enfermedad. *Monogr Med Vet.*13(2):25-7.
64. Galosi CM, Vila Roza MV, Oliva GA, Pecorado MR, Echeverria MG, Corva S, Etcheverrigaray ME (2001) A polymerase chain reaction for detection of equine herpesvirus-1 in routine diagnostic submissions of tissues from aborted fetuses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48(5):341-6.
65. Gibson JS, Slater JD, Awan AR, Field HJ (1992) Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infection and reactivation. *Arch Virol* 123(3-4):351-66.
66. Gil A, Nari A, Hirigoyen D (2009) Cadena Equina. En: Propuesta de líneas de investigación y acciones para el PLANISA. pp.160-172. IICA, Montevideo. Disponible en:
http://www.fvet.edu.uy/planisa/files/trabajo_final_090904.pdf Fecha de consulta: 29.3.16.

67. Gildea S, Arkins S, Cullinane A (2010) A comparative antibody study of the potential susceptibility of thoroughbred and non-thoroughbred horse populations in Ireland to equine influenza virus. *Influenza Other Respir Viruses* 4(6):363-72.
68. Gildea S, Arkins S, Cullinane A. (2011) Management and environmental factors involved in Equine Influenza outbreaks in Ireland from 2007 to 2010. *Equine Vet J* 43(5):608-17.
69. Gildea S, Arkins S, Cullinane A. (2010) A comparative antibody study of the potential susceptibility of Thoroughbred and non-Thoroughbred horse populations in Ireland to equine influenza virus. *Influenza Other Respir Viruses* 4(6):363-72.
70. Gilkerson J, Love D, Whalley JM (1997) Serological evidence of equine herpesvirus (EHV 1) infection in thoroughbred foals 30-120 days of age. *Aust Equine Vet* 15(3):128-134.
71. Gilkerson J, Whalley J, Drummer H (1999) Epidemiological studies of equine herpesviruses 1 (EHV 1) in thoroughbred foals: A review of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet Microbiol* 68(1-2):15-25.
72. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN (1999) Epidemiology of EHV 1 and EHV 4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV 1 for unweaned foals. *Vet Microbiol.* 68:27-34.
73. Glass K, Wood JL, Mumford JA, Jesset D, Grenfell BT (2002) Modelling equine influenza 1: a stochastic model of within-yard epidemics. *Epidemiol Infect* 128(3):491-502.

74. Gleeson LJ, Coggins L (1980) Response of pregnant mares to equine herpesvirus 1 (EHV1). *Cornell Vet* 70(4):391-400.
75. Goehring LS, Van Winden SC, Van Maanen C, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM (2006) Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: a four-year retrospective study (1999-2003). *J Vet Intern Med* 20(3):601-7.
76. Goehring LS, Wagner B, Bigbie R, Hussey SB, Rao S, Morley PS, Lunn DP (2010) Control of EHV 1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine* 28(32):5203-11.
77. Goodman LB, Loregian A, Perkins G, Nugent J, Buckles E, Mercorelli B, Kydd JH, Palu G, Smith K, Osterrieder N, Davis-Poynter N (2007) A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog* 3(11): 1583-92.
78. Gryspeerdt, A (2011) The pathogenesis of EHV 1 in horses: Novel insights from experimental inoculations and field situations. Thesis. Ph.D. in Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Ghent University. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/240279371_PhD_thesis_of_Annick_Gryspeerdt_Promoter_Hans_J_Nauwynck_Title_The_pathogenesis_of_EHV1_in_horses_novel_insights_from_experimental_inoculations_and_field_situations Fecha de consulta: 29.3.16.
79. Guo Y, Wang M, Zheng GS, Li WK, Kawaoka Y, Webster RG (1995) Seroepidemiological and molecular evidence for the presence of two H3N8 equine influenza viruses in China in 1993-94. *J Gen Virol* 76(8):2009-14.

80. Guo YJ, Wang M, Zheng HU (1990) Equine influenza epidemic again in North-East China. *Virus Inform Exchange Newslett S East Asia West Pac* 7:146-147.
81. Guthrie AJ, Stevens KB, Bosman PP (1999) The circumstances surrounding the outbreak and spread of equine influenza in South Africa. *Rev Sci Tech* 18(1):179-85.
82. Hannant D (1991) Immune responses to common respiratory pathogens: problems and perspectives in equine immunology. *Equine Vet J* 23(s12):10-18.
83. Hannant D, Jessett DM, O'Neill T, Mumford JA (1989) Antibody isotype responses in the serum and respiratory tract to primary and secondary infections with equine influenza virus (H3N8). *Vet Microbiol* 19(4):293-303.
84. Hannant D, Mumford JA (1996) Equine Influenza. En: Studdert MJ (ed.) *Virus infections of equines*. p. 285-293.
85. Harless W, Pusterla N (2006) Equine herpesvirus 1 and 4 respiratory disease in the horse. *Clin Tech Equine Pract* 5(3):197-202.
86. Hartley CA, Wilks CR, Studdert MJ, Gilkerson JR (2005) Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am J Vet Res*. 66:921–928.
87. Heine HG, Trinidad L, Selleck P, Lowther S (2007) Rapid detection of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by TaqMan reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *Avian Dis* 51 (Suppl 1):370–372.

88. Heinemann MB, Cortez A, Souza MDCC, Gotti T, Ferreira F, Homem VSF, Ferreira Neto JS, Soares RM, Sakamoto SM, Cunha EM, Richtzenhain, LJ (2002) Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da arterite viral dos eqüinos e do aborto viral eqüino no município de Uruará, PA, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 39:50-53.
89. Heldens, JG, Pouwels HG, Derks CG, Van de Zande SM, Hoeijmakers MJ (2009) The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine* 27(40):5530-7.
90. Henninger RW, Reed SM, Saville WJ, Allen GP, Hass GF, Kohn CW, Sofaly C (2007) Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J. Vet Intern Med* 21(1):157-165..
91. Hussey SB, Clark R, Lunn KF, Breathnach C, Soboll, G, Whalley JM, Lunn DP (2006) Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 18(4):335-42.
92. Ilobi CP, Nicolson C, Taylor J, Mumford JA, Wood JM, Robertson JS (1998) Direct sequencing of the HA gene of clinical equine H3N8 influenza virus and comparison with laboratory derived viruses. *Arch Virol.* 143(5):891-901.
93. Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG (1989) Evolution of the Hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. *Virology* 169(2):283-92.

94. Kirisawa R, Endo A, Iwai H, Kawakami Y (1993) Detection and identification of equine herpesvirus-1 and 4 by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 36(1):56–67.
95. Koelle K, Khatri P, Kamradt M, Kepler TB (2010) A two-tiered model for simulating the ecological and evolutionary dynamics of rapidly evolving viruses, with an application to influenza. *J R Soc Interface* 7(50):1257-74.
96. Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GI Mumford JA (1994) Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV 1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet J* 26(6):466-469.
97. Kydd JH, Townsend HG, Hannant D (2006) The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet Immunol Immunopathol.* 111(1-2):15-30.
98. Kydd JH, Wattrang E, Hannant D (2003) Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. *Vet Immunol Immunopathol* 96(3-4):207-217.
99. Lai AC, Chambers, TM, Holland REj Morley PS, Haines DM, Townsend HG Barrandeguy M (2001) Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch Virol* 146(6):1063–1074.
100. Lang A, de Vries M, Feineis S, Müller E, Osterrieder N, Damiani AM (2013) Development of a peptide ELISA for discrimination between serological responses to equine herpesvirus type 1 and 4. *J Virol Methods* 193(2):667-73.

101. Lara MCCSH, Torelli CS, Cunha EMS, Villalobos EMC, Cunha MS, Bello ACPP, Cunha AP, Reis JKP, Leite RC, Mori E (2010) Inquéritosorológico da infecção por herpesvírus equino no Estado de Minas Gerais. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 47:352-356.
102. Larsen DL, Dybdahl-Sissoko N, McGregor MW, Drape R, Neumann V, Swain WF, Lunn DP, Olsen CW (1998) Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J Virol* 72(2):1704-8.
103. Lawrence GL, Gilkerson J, Love DN, Sabine M, Whalley JM (1994) Rapid, single-step differentiation of equid herpesviruses 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus specific primers. *J Virol Methods* 47(1-2):59-72.
104. Lewis NS, Daly JM, Russell CA, Horton DL, Skepner E, Bryant NA, Burke DF, Rash AS, Wood JLN, Chambers TM, Fouchier RAM, Mumford JA, Elton DM, Smith DJ (2011) Antigenic and genetic evolution of equine influenza a (H3N8) virus from 1968 to 2007. *J Virol* 85(23):12742-9.
105. Livesay GJ, O'Neill T, Hannant D, Yadav MP, Mumford JA (1993) The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989: diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet Rec* 133(21):515-9.
106. Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJ, Horohov DW, Osterrieder K, Pusterla N, Townsend HG (2009) Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med* 23(3):450-61.
107. Lunn DP, Soboll G, Schram BR, Quass J, Mc Gregor MW, Drape RJ, Macklin MD, McCabe DE, Swain WF, Olsen CW (1999) Antibody

- responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine* 17(18):2245-58.
108. Maanen C van (2001) Equine herpesvirus 1 and 4 and equine influenza virus infections: diagnosis, epidemiology and vaccinology. PhD thesis Utrecht University, Utrecht, the Netherland.
109. Maanen C van (2002) Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet Q.* 24(2):57-78.
110. Manickan E, Yu Z., Rouse BT (1997) DNA immunization of neonates induces immunity despite the presence of maternal antibody. *J Clin Invest* 100(9):2371-5.
111. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H (2004) Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78(22):12665-7.
112. Matsumura T, Sugiura T, Imagawa H, Fukunaga Y, Kamada M (1992) Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. *J Vet Med Scin* 4(2):207-11.
113. McCartan CG, Russell MM, Wood JL, Mumford JA (1995) Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet Rec* 136(1):7-12.
114. Minke JM, Audonnet JC, Fischer L (2004) Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res* 35(4):425-43
115. Morein B, Villacres-Eriksson M, Ekstrom J, Hu K, Behboudi S, Lovgren-Bengtsson K (1999) ISCOM: a delivery system for neonates and for mucosal administration. *Adv Vet Med* 41:405-13.

116. Morley PS, Hanson LK, Bogdan JR, Townsend HG, Appleton JA, Haines DM (1995) The relationship between single radial hemolysis, hemagglutination inhibition, and virus neutralization assays used to detect antibodies specific for equine influenza viruses. *Vet Microbiol* 45(1):81-92.
117. Morley PS, Townsend HG, Bogdan JR, Haines DM (1999) Efficacy of a commercial vaccine for preventing disease caused by influenza virus infection in horses. *J Am Vet Med Assoc* 215(1):61-6.
118. Mumford J, Wood JM, Scott AM, Folkers C, Schild GC (1983) Studies with inactivated equine influenza vaccine. 2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8). *J Hyg (Lond)* 90(3):385-95.
119. Mumford JA (2001) Biology, epidemiology and vaccinology of equine influenza. *Proceedings. International Symposium*, 10-11 December. Budapest, Hungary. pp.7-12.
120. Mumford JA (2001) Biology, epidemiology and vaccinology of equine influenza. *Proceedings. International Symposium*, 10-11 December. Budapest, Hungary. pp.7-12.
121. Mumford JA, Edington N (1980) EHV 1 and equine paresis. *Vet Rec* 106(12):277.
122. Mumford JA, Hannant D, Jessett DM (1990) Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Vet J* 22(2):93-8.

123. Mumford JA, Jessett DM, Rollinson EA, Hannant D, Draper ME (1994) Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet Rec* 134(7):158-62.
124. Mumford JA, Jessett DM, Dunleavy U, Wood J, Hannant D, Sundquist DB, Cook RF (1994) Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine* 12(9):857-63.
125. Mumford JA, Rossdale PD, Jessett DM, Gann SJ, Ousey J, Cook RF (1987) Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV 1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J Reprod Fertil Suppl* 35:509-18
126. Mumford JA, Wilson H, Hannant D, Jessett DM (1994) Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a carbomer adjuvant. *Epidemiol Infect* 112(2):421-37.
127. Mumford JA, Wood J (1992) Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev Biol Stand* 79:137-46.
128. Mumford JA, Wood J, Chambers T (1995) Consultation of OIE and who experts on progress in surveillance of equine influenza and application to vaccine strain selection. Report. Meeting Animal Health Trust, 18-19 september, Newmarket, UK.
129. Mumford JA, Wood JM, Folkers C, Schild GC (1988) Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Miami/63 (H3N8) provided by inactivated whole virus vaccine containing homologous virus. *Epidemiol Infect* 100(3):501-10

130. Murray MJ, Del Piero F, Jeffrey SC, Davis MS, Furr MO, Dubovi EJ, Mayo JA (1998) Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *J Vet Intern Med* 12(1):36-41.
131. Newton JR (2001) Equine influenza vaccine performance: still learning lessons from the field. *Vet J* 161(2):107-9.
132. Newton JR, Lakhani KH, Wood JL Baker DJ (2000) Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Prev Vet Med* 46(2):129-41.
133. Newton JR, Townsend HG, Wood JL, Sinclair R, Hannant D, Mumford JA (2000) Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Vet J* 32(1):65-74
134. Newton JR, Wood JL, Jessett D, Yates PJ, Mumford JA (1999) 'Cross-protection' and 'cross-reaction' with equine influenza vaccines. *Vet Rec.* 145(22):647.
135. Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP, Davis-Poynter N (2006) Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus non-neuropathogenic disease outbreaks. *J Virol* 80(8):4047-4060.
136. O'keefe JS, Murray A, Wilks CR, Moriarty KM (1991) Amplification and differentiation of the DNA of an abortigenic (type 1) and a respiratory (type 4) strain of equine herpesvirus by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 50, 349–351..

137. OIE (2013) World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System WAHIS Interface. Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail/ Fecha de consulta: 20/08/16.
138. OIE (2014) Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. OIE-Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> Fecha de consulta: 22/10/15.
139. OIE (2014-2016) World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System. WAHIS Interface. Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail/ Fecha de consulta: 20/8/16.
140. OIE. (2008) Conclusions and recommendations from the expert surveillance panel on equine influenza vaccines. Bull Off Int Epizoot 2:42-50 OIE (2012) World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System WAHIS Interface. Immediate notification report. Disponible en: https://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000011825_20120402_113639.pdf En línea: Fecha de consulta: 20/8/16.
141. OIE-World Organization for animal health (2015) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponible en: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online> Fecha de consulta: 9.4.16

142. Olsen CW (2000) DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza. *Vet Microbiol* 74(1-2):149-64.
143. Ostlund EN (1993) The equine herpesviruses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 9(2):283-94.
144. Oxburgh L, Akerblom L, Fridberger T, Klingeborn B, Linne T (1998) Identification of two antigenically and genetically distinct lineages of H3N8 equine influenza virus in Sweden. *Epidemiol Infect* 120(1):61-70.
145. Oxburgh L, Klingeborn B (1999) Cocirculation of two distinct lineages of equine influenza virus subtype H3N8.j. *Clin.Microbiol* 37(9):3005-9.
146. Paillot R (2014) A systematic review of recent advances in Equine Influenza Vaccination. *Vaccines(Basel)* 2(4):797-831.
147. Patel JR, Didlick S, Bateman H (2004) Efficacy of a live equine herpesvirus-1(EHV 1) strain c147 vaccine in foals with maternally-derived antibody: protection against EHV 1 infection. *Equine Vet J* 36(5):447-51.
148. Patel JR, Edington N, Mumford JA (1982) Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals. *Arch Virol* 74(1):41-51.
149. Patel JR, Heldens J (2005) Equine herpesviruses 1 (EHV 1) and 4 (EHV 4): epidemiology, disease and immunoprophylaxis. A brief review. *Vet J.* 170:14–23.

150. Perkins GA, Goodman LB, Tsujimura K, Van de Walle GR, Kim SG, Dubovi EJ, Osterrieder K (2009) Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV 1) in a 23-year retrospective analysis (1984-2007). *Vet Microbiol* 139(3-4):375-378.
151. Pertmer TM, Oran AE, Moser JM, Madorin CA, Robinson HL (2000) DNA vaccines for influenza virus: differential effects of maternal antibody on immune responses to hemagglutinin and nucleoprotein. *J Virol*. 74(17):7787-93.
152. Powell DG (1991) Viral respiratory disease of the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 7(1):27-52.
153. Pusterla N, Mapes S, Wilson WD (2010) Prevalence of equine herpes virus type 1 in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined post mortem. *Vet Rec* 167(10):376-9.
154. Pusterla N, David Wilson W, Madigan JE, Ferraro GL (2009) Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. *Vet J* 180(3):279-89.
155. Pusterla N, Hussey SB, Mapes S, Leutenegger CM, Madigan JE, Ferraro GL, Wilson WD, Lunn DP (2009) Comparison of four methods to quantify equidherpesvirus 1 load by real-time polymerase chain reaction in nasal secretions of experimentally and naturally infected horses. *J Vet Diagn Invest* 21(6):836-40.
156. Pusterla N, Mapes S, Wilson WD (2008) Diagnostic sensitivity of nasopharyngeal and nasal swabs for the molecular detection of EHV 1. *Vet Rec* 162(16):520-1.

157. Pusterla N, Mapes S, Wilson WD (2008) Use of viral loads in blood and nasopharyngeal secretions for the diagnosis of EHV 1 infection in field cases. *Vet Rec* 162(22):728-9.
158. Pusterla N, Wilson WD, Mapes S, Finno C, Isbell D, Arthur RM, Ferraro GL (2009) Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Vet J* 179(2):230-9.
159. Quinlivan M, Dempsey E, Ryan F, Arkins S, Cullinane A (2005) Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *J Clin Microb* 43(10):5055-7.
160. Ryan M, Gildea S, Walsh C, Cullinane A. (2015) The impact of different Equine Influenza vaccine products and other factors on Equine Influenza antibody levels in thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 47(6):662-6.
161. Satou K, Nishiura H. (2006) Basic reproduction number for equine-2 influenza virus a (H3N8) epidemic in racehorse facilities in Japan, 1971. *J Equine Vet Sci* 26(7):310-6.
162. Shapiro GI, Krug RM (1988) Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* 62(7): 2285-90.
163. Sharma PC, Cullinane AA, Onions DE, Nicolson L (1992) Diagnosis of equid herpesviruses -1 and -4 by polymerase chain reaction. *Equine Vet J* 24(1):20-5.

164. Siegrist CA, Cordova M, Brandt C, Barrios C, Berney M, Tougne C, Kovarik J, Lambert PH (1998) Determinants of infant responses to vaccines in presence of maternal antibodies. *Vaccine* 16(14-15):1409-14.
165. Smith DJ, Hamblin A, Edington N (2002) Equid herpesvirus 1 infection of endothelial cells requires activation of putative adhesion molecules: an in vitro model. *Clin Exp Immunol* 129(2):281-7.
166. Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D, Mumford JA (1992) Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant mares with equid herpesvirus 1. *Equine Vet J* 24(4):256-9.
167. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Hannant D, Blunden AS, Tearle JP (2000) Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies. *J Comp Pathol* 122(4):288-97.
168. Smith KL, Allen GP, Branscum AJ, Cook RF, Vickers ML, Timoney PJ, Balasuriya UB (2010) The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Vet Microbiol* 141(1-2):5-11.
169. Soboll G, Breathnach CC, Kydd JH, Hussey SB, Mealey RM, Lunn DP (2010) Vaccination of ponies with the IE gene of EHV-1 in a recombinant modified live vaccinia vector protects against clinical and virological disease. *Vet Immunol Immunopathol* 135(1-2):108-17.
170. Studdert MJ (1996) Orthomyxoviridae. Equine Influenza. En: Studdert MJ (ed.) *Virus infections of equines*. p. 281-284.
171. Telford EA, Watson MS, McBride K, Davison AJ (1992) The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189(1):304-16.

172. Telford EA, Watson MS, Perry J, Cullinane AA Davison AJ (1998) The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *J Gen Virol* 79(5):1197-1203.
173. Timoney PJ (1996) Equine influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19(3):205-11.
174. Townsend HG, Penner SJ, Watts TC, Cook A, Bogdan J, Haines DM, Griffin S, Chambers T, Holland RE, Whitaker-Dowling P, Youngner JS, Sebring RW (2001) Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials. *Equine Vet J* 33(7):637-43.
175. Townsend HGG, Morley PS, Newton JR, Wood JLN, Haines DM, Mumford JA (1999) Measuring serum antibody as a method of predicting infection and disease in horses during outbreaks of influenza. *Equine Infectious Diseases VIII Proceedings. International Conference on Equine Infectious Diseases 8^o. Newmarket, United Kingdom. pp. 33-37.*
176. Uppal PK, Yadav MP, Oberoi MS (1989) Isolation of A/Equi-2 virus during 1987 equine influenza epidemic in India. *Equine Vet J* 21(5):364-6.
177. USDA (2007) Equine herpesvirus myeloencephalopathy: a potentially emerging disease. USDA-APHIS 2007. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/ehv1final.pdf Fecha de consulta: 29.3.16.
178. Vallone EF, Canto RM, Bauzá CA, Somma RE, Tosi HC (1965) Localización del virus de influenza Aequi/Uruguay/540/1963 en membrana corioalantoidea por el método de inmunofluorescencia. *An Fac Med Univ Repub Montev Urug* 50:107-113.

179. Van der Meulen KM, Gryspeerdt A, Vandekerckhove A, Garre B, Nauwynck HJ. (2007) The protective properties of vaccination against equine herpesvirus 1-induced viremia, abortion and nervous system disorders. *Vlaams Diergeneeskundig* 76(3):186-194.
180. Van Maanen C (2002) Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet Q* 24(2):58-78.
181. Van Maanen C, Cullinane A (2002) Equine influenza virus infections: an update. *Vet Q* 24(2):79-94.
182. Van Maanen C, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Damen EA, Derksen AG (2001) Neurological disease associated with EHV 1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet J* 33(2):191-6.
183. Van Maanen C, Willink DL, Smeenk, LA, Brinkhof J, Terpstra C (2000) An equine herpesvirus 1 (EHV 1) abortion storm at a riding school. *Vet Q* 22(2):83-87.
184. Van Oirschot JY, Bruin G, De Boer-Luytze E, Smolders G (1991) Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 38(5):391-6.
185. Varrasso A, Dynon K, Ficorelli N, Hartley CA, Studdert MJ, Drummer HE (2001) Identification of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust Vet J* 79(8):563-9.
186. Vissani MA, Becerra ML, Olguin Perglione C, Tordoya MS, Miño S, Barrandeguy M (2009) Neuropathogenic and non-neuropathogenic

- genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet Microbiol* 139(3-4):361-4.
187. Wagner WN, Bogdan J, Haines D, Townsend HG, Misra V (1992) Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can J Microbiol* 38(11):1193-6.
188. Wang L, Raidal SL, Pizzirani A, Wilcox GE (2007) Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. *Vet Microbiol* 121(1-2):18-28.
189. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC (1980) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289(5796):366-73.
190. Wilsterman S, Soboll-Hussey G, Lunn DP, Ashton LV, Callan RJ, Hussey SB, Rao S, Goehring LS (2010) Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet Microbiol* 149(1-2):40-7.
191. Wood JLN, Mumford JA, Mair TS, Slater J (2007) Boosting in equine influenza vaccination schedules: timing and time for a re-evaluation of requirements of national and international authorities. *Vet J* 174(3):449-50.
192. Wood JM, Gaines-Das RE, Taylor J, Chakraverty P (1994) Comparison of influenza serological techniques by international collaborative study. *Vaccine* 12(2):167-74.

193. Yamanaka T, Tsujimura K, Kondo T Matsumura T (2008)
Evaluation of antigen detection kits for diagnosis of equine influenza. J
Vet Med Sci 70(2):189-92.
194. Yates P, Mumford JA (2000) Equine influenza vaccine efficacy:
the significance of antigenic variation. Vet Microbiol 74(1-2):173-7. Zhang
J, Leser GP, Pekosz A, Lamb RA (2000) The cytoplasmic tails of the
influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome
packaging. Virology 269(2):325-34.