

Universidad de la República - Facultad de Ciencias

Licenciatura en Bioquímica

Trabajo Tesis Final

**EVALUACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA
INFLUENZA EQUINA
Y HERPES EQUINO – 4
EN EQUINOS RESIDENTES DEL
HIPODROMO NACIONAL DE MAROÑAS
DURANTE UN BROTE
DE SINTOMATOLOGIA COMPATIBLE
CON ENFERMEDAD RESPIRATORIA**

Por

Patricia Acuña González

Orientador Dr. Juan Arbiza

Co – orientador Lic. Eduardo Reolon



INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	11
1. VIRUS INFLUENZA EQUINA.....	11
1.1 Clasificación y Nomenclatura	11
1.2 Morfología.....	11
1.3 Evolución.....	16
1.4 Epidemiología	18
1.5 Trasmisión	21
1.6 Signos clínicos y patología	22
1.7 Diagnóstico.....	25
1.7.1 Detección de Antígenos	25
1.7.2 Detección de Anticuerpos	26
1.8 Tratamiento individual y Control de brotes.....	27
1.9 Inmunidad natural y vacunas inactivadas	28
1.10 Potencia de vacunas	30
1.11 Optimización de programas de vacunación	32
1.12 Selección de cepas vacunales	34
1.13 Vigilancia internacional.....	36
2. HERPESVIRUS EQUINO	38
2.1 Historia	38
2.2 Clasificación	39
2.3 Morfología.....	40
2.4 Genoma	41
2.5 Antigenicidad.....	44

2.6	Prevalencia de la enfermedad respiratoria.....	44
2.7	Epizootiología	45
2.8	Latencia	48
2.9	Patogénesis.....	49
2.10	Presentación clínica.....	52
2.11	Complicaciones y secuelas	54
2.12	Diagnóstico.....	56
2.12.1	Detección de Antígenos	56
2.12.2	Detección de Anticuerpos	58
2.13	Tratamiento individual y Control de brotes	58
2.14	Prevención	59
2.15	Las vacunas actuales	61
	Estrategias de vacunación	63
2.16	Estrategias de manejo preventivo.....	63
3.	INTERFAZ DE LA BASE DE DATOS DEL SISTEMA MUNDIAL DE INFORMACIÓN ZOOSANITARIA (WAHID)	65
3.1	Tareas realizadas	65
3.2	Notificaciones e informes de enfermedades provocadas por VIE y HVE.....	65
3.2.1	Influenza Equina.....	66
3.2.2	Rhinopneumonitis Equina	71
4.	SANIDAD EN HIPÓDROMOS	76
4.1	Situación actual de las Instituciones deportivas y eventos competitivos.....	76
4.2	Conceptos actuales de vacunación y control de enfermedades infecciosas en instituciones deportivas	78
4.3	Pruebas de detección para impedir la entrada o el movimiento de la infección en instituciones deportivas	80
4.4	Vacunación para la prevención	80
5.	FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE AUTORIDADES DE CARRERAS (IFHA)	82

5.1	Propósito	82
5.2	Integración	82
5.3	Objetivos.....	83
5.4	Convenio Internacional sobre cría, carreras y apuestas	84
5.4.1	Objetivos.....	84
5.4.2	Recomendaciones de la Versión 2009 del Convenio Internacional sobre cría, carreras y apuestas.....	85
6.	HÍPICA RIOPLATENSE URUGUAY S.A.- HIPÓDROMO NACIONAL DE MAROÑAS.....	86
6.1	Descripción de la Institución.....	86
6.2	Reglamento de Carreras	86
6.2.1	Alcance	86
6.2.2	Artículos referentes a la sanidad.....	87
6.2.2.1	Alcance físico y sujetos de responsabilidad	87
6.2.2.2	Acerca de las condiciones de higiene.....	87
6.2.2.3	Acerca de la documentación y esquema sanitario.....	88
6.2.3	Acerca del no cumplimiento de la normativa.....	89
7.	OBJETIVO GENERAL.....	90
8.	METODOLOGÍA.....	91
8.1	Muestreo	91
8.1.1	Composición de la muestra	91
8.1.2	Cronograma de toma de muestra	92
8.1.3	Datos complementarios a la muestra.....	93
8.1.4	Colecta del material	95
8.2	Titulación de Anticuerpos.....	95
8.2.1	Técnicas de Estudio.....	96
8.2.1.1	Detección de Anticuerpos contra VIE por la Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.....	96
8.2.1.1.1	Materiales	96

8.2.1.1.2	Procedimiento	98
8.2.1.2	Detección de Anticuerpos contra HVE – 4 por la Técnica de Seroneutralización in Vitro	104
8.2.1.2.1	Materiales	104
8.2.1.2.2	Procedimiento	105
9.	RESULTADOS.....	111
9.1	Consideraciones previas al análisis de resultados.....	111
9.2	Influenza Equina.....	111
9.3	Rhinopneumonitis Equina	116
9.4	Comparación entre virus estudiados.....	122
10.	DISCUSION.....	123
10.1	Importancia del presente estudio	123
10.2	Evaluación del nivel de protección contra VIE y HVE – 4 generado por los programas de vacunación	125
10.3	Evidencias de la posible circulación de cepas de VIE y/o HVE – 4.....	126
11.	CONCLUSIONES.....	129
12.	REFERENCIAS.....	130
12.1	Influenza Equina.....	130
12.2	Herpesvirus Equino	141
12.3	Autoridades internacionales y nacionales.....	149
12.4	Trabajo práctico	150
	FE DE ERRATAS.....	152

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS INFLUENZA EQUINA

1.1 Clasificación y Nomenclatura

El Virus Influenza Equina (VIE) es un miembro de la Familia *Orthomixoviridae*, Genero Influenzavirus A y B, Especie Influenza A.

El VIE causa infección respiratoria severa, caracterizada por una distintiva tos seca, descarga nasal y pirexia. Está caracterizado como Influenza A, debido a las propiedades antigénicas de la Nucleoproteína (NP) y la proteína de la Matriz (M1).

Influenza A está dividido en subtipos en función de las alteraciones existentes en sus dos glicoproteínas de superficie, Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) responsables de las características antigénicas del virus.

Pequeñas variaciones en los aminoácidos de las regiones antigénicas ocasionan la aparición de variantes dentro de un mismo subtipo. Dentro del tipo A se encuentran dos subtipos de Influenza Equina, que pueden ser divididos en subtipo y variante.

La nomenclatura fue definida por un grupo de estudio perteneciente a la Organización Mundial de la Salud en 1971 (WHO Study Group, 1971). La denominación de los aislamientos comprenden al tipo/ especie del hospedero (cuando es diferente del humano)/ localidad de origen/ número de laboratorio/ año de aislamiento y entre paréntesis los antígenos de superficie.

1.2 Morfología

Las partículas son envueltas y esféricas de aproximadamente 100 nm de diámetro, aunque también se han aislado partículas pleomórficas. La envoltura lipídica de los virus Influenza, les confiere susceptibilidad a la mayoría de los desinfectantes y detergentes comunes.

Influenza tiene genoma ARN de simple cadena consistente en ocho segmentos de polaridad negativa. Debido a su genoma segmentado, pueden ocurrir rearrreglos genéticos en aquellas células infectadas simultáneamente con dos cadenas diferentes de Influenza A. Son frecuentes los rearrreglos de los genes que codifican las glicoproteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y

Neuraminidasa (N), los cuales causan cambios mayores en la composición antigénica de Influenza A, definiendo el salto antigénico (1).

Se han reconocido cinco proteínas estructurales y cinco no estructurales. Las proteínas no estructurales (PB1, PB2 y PA) se asocian para constituir la ARN Polimerasa dependiente de ARN. Durante la replicación de VIE, se producen las otras dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) (2). De las cinco proteínas estructurales, la Nucleoproteína (NP) y las proteínas de la Matriz (M1 y M2) determinan la especificidad de especie. Los anticuerpos contra estas proteínas no son protectores, aunque ambas proteínas generan inmunidad mediada por células. Dos clusters de proteínas se proyectan desde la envoltura, HA y N. Ver Fig. 1 para una representación gráfica.

La glicoproteína trimérica HA es la mayor glicoproteína de superficie, y corresponde al 25% de la masa proteica viral, mientras que la N es tetramérica y constituye el 10% (ambas se representan en las Fig. 2 y 3, respectivamente). La HA contiene el sitio de unión al receptor y es el mayor antígeno de superficie para el cual se generan los anticuerpos neutralizantes. En aves se han descrito subtipos H1 a más de H14 y N1 a N9, sin embargo, solo las combinaciones de subtipos H7N7 (A/equine/1) y H3N8 (A/equine/2) se han encontrado en equinos. En los genes de HA y N de los virus Influenza Equina se suceden mutaciones que dan lugar a cambios antigénicos, permitiendo al virus escapar de la neutralización de anticuerpos generada en infecciones anteriores (3). Este fenómeno se denomina deriva antigénica. La molécula H3 contiene, por lo menos, cuatro sitios antigénicos en los cuales se suscitan las sustituciones aminoacídicas (1).

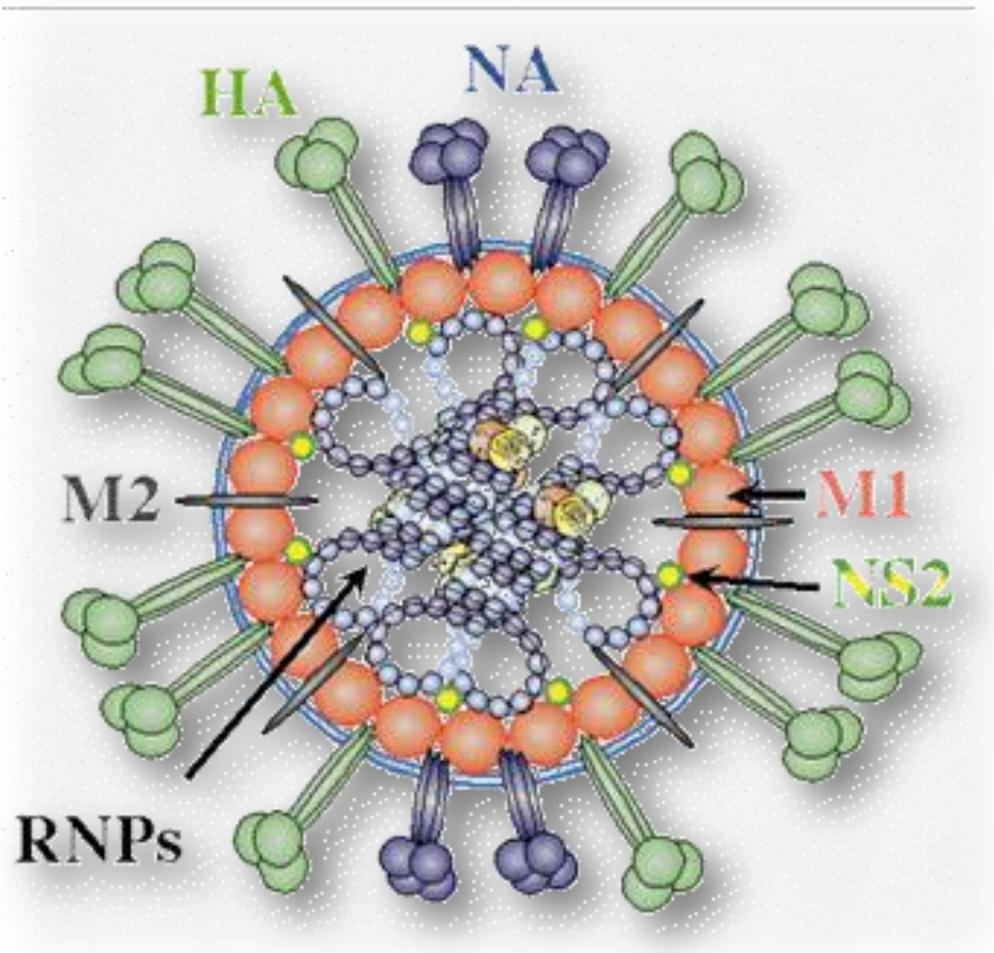


Figura 1-Diagrama de la estructura general del virus Influenza A.

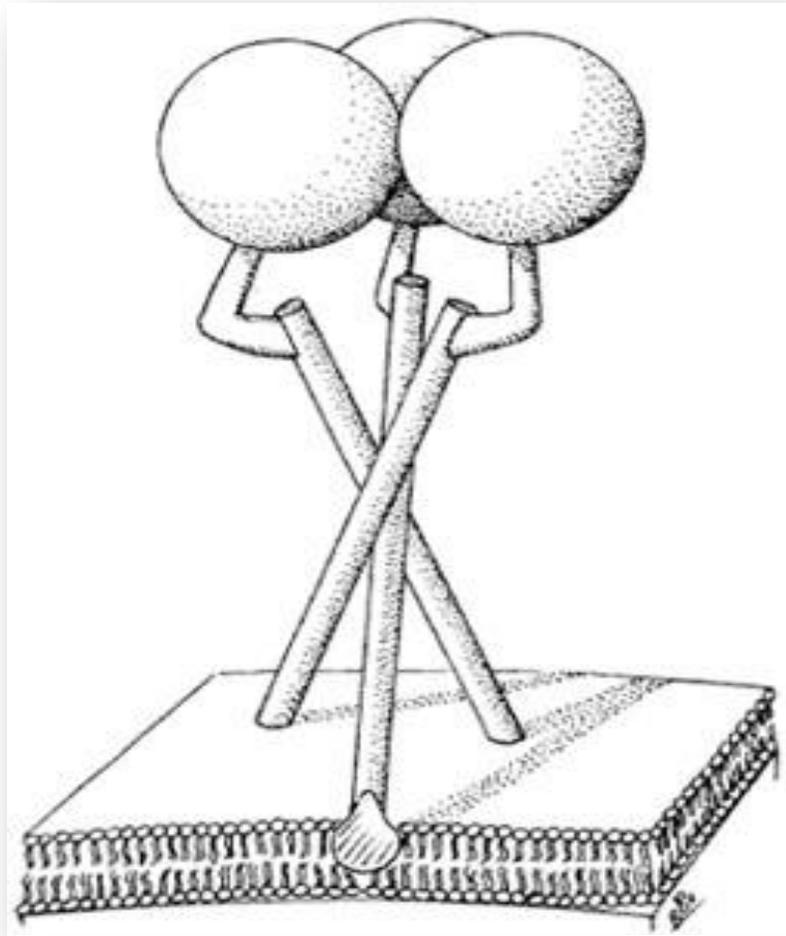


Figura 2- Representación tridimensional de la estructura de Hemaglutinina.

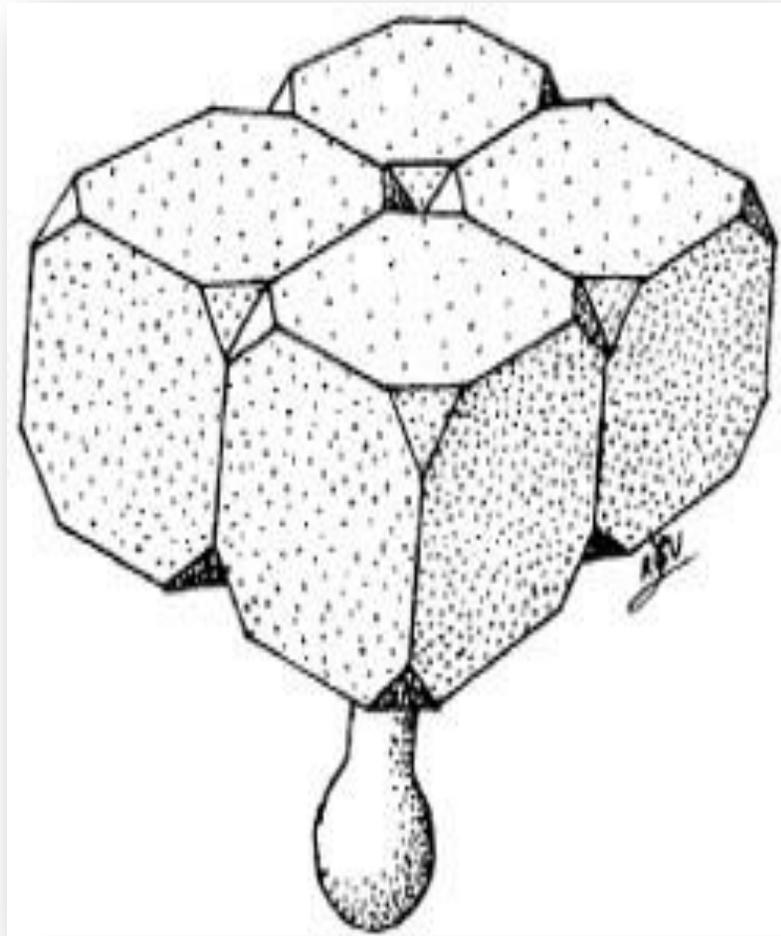


Figura 3- Representación tridimensional de la estructura de Neuraminidasa.

1.3 Evolución

Todos los subtipos de HA y N de Influenza A de mamíferos se encuentran en las poblaciones de aves acuáticas del mundo, y hay evidencia creciente de que los virus Influenza de mamíferos se originaron de una fuente aviar. En el caso del virus H3N8, parece ser que el gen codificante para la NP, se introdujo en las poblaciones equinas a finales del siglo XIX, y hasta el presente evoluciono en forma independiente como linaje único. Análisis filogenéticos sugieren que los virus H7N7 han evolucionado en forma similar, como linaje único por más de 100 años, pero hay evidencias de que ha sufrido rearrreglos en forma frecuente con el subtipo equino H3N6, hasta mediados de 1970. Luego de esta fecha, no ha habido evidencias de circulación de H7N7 en las poblaciones ecuestres (4, 5).

Los subtipos se nombran de acuerdo al lugar y fecha de su primer aislamiento, así como por sus antígenos constitutivos HA y N. La designación, no solo provee información histórica, también indica cambios temporales en la antigenicidad (Deriva Antigénica). El primer virus (prototipo) A/equine/1 (H7N7) fue aislado durante un brote de Influenza Equina en caballos en Czechoslovakia en 1956 y se le designo A/equine/1/Prague/1/56 (6). El virus A/equine/1 ha experimentado menor deriva antigénica que la que ha sufrido el subtipo A/equine/2, pero los análisis genéticos y antigénicos han revelado una división del A/equine/1 en dos subgrupos, los cuales sufrieron baja deriva antigénica dentro de cada subtipo y alta deriva antigénica entre ellos (7, 8). El primer subgrupo de A/equine/1 fue aislado entre los años 1956 y 1963 e incluye A/Cambridge/1/63, además del prototipo A/Prague/1/56. El segundo subgrupo contiene los virus aislados entre 1964 y 1977 e incluye A/Detroit/1/67, A/Switzerland/137/72, A/London/1416/73 y A/Newmarket/1/77. Debido a que no se han reportado casos de infecciones de Influenza A/equine/1 en animales vacunados, se cree que la deriva antigénica tiene mínima significación en términos de inmunidad vacunal (9).

Durante el mayor brote de Influenza Equina en USA durante 1964, se asumió que el virus causante de la enfermedad era antigénicamente diferente de los virus A/equine/1 aislados previamente, representando un salto antigénico. (10, 11). El salto provoco el cambio de ambas glicoproteínas HA y N con antígenos de un tipo diferente, y al igual que la deriva de los virus H7N7, puede haber ocurrido como resultado de que mutaciones del virus H7N7 se hayan rearrreglado con virus Influenza de otras especies, o menos probable, como resultado de su introducción por transferencia directa desde otras especies (7, 13). El primer aislamiento del virus H3N8 correspondió a equinos afectados en un hipódromo de Florida, y se nombró A//equine/2/Miami/1/63 (11). Subsiguientes sucesos de deriva antigénica dieron lugar al reconocimiento de dos variantes genéticas y antigénicas, una representada por A/Miami/63

(prototipo), A/Tokio/71 y A/Switzerland/79, y la siguiente representada por A/Fontainblue/79 (prototipo), A/Newmarket/79, A/Solvalla/79 y A/Kentucky/81 (prototipo). (12, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Debido a la existencia de cocirculación de estas variantes de H3N8 en las poblaciones equinas, la Organización Mundial de la Salud, recomienda desde 1983 la inclusión en formulaciones vacunales de cepas representantes del segundo grupo de A/equine/2 para aumentar la relevancia de las cadenas de las vacunas frente a las salvajes (16). Desde 1983 se ha encontrado deriva antigénica de A/equine/2, indicando que las cepas vacunales necesitan una continua actualización. A mediados de la década de 1980, un tercer subgrupo antigénico del virus H3N8 se representó por A/Tennessee/5/86, A/Johannesburg/86 y A/Kentucky/2/87. Posteriormente, el virus H3N8 aislado durante el mayor brote de Influenza Equina del oeste de Europa y Escandinavia en 1989, pareció representar un cuarto subgrupo, antigénicamente diferente de los aislamientos previos (17, 20). Además, hay fuerte evidencia de la continua cocirculación de virus de diferentes subgrupos antigénicos, en lugares geográficos y tiempos comunes.

En 1989, un brote severo de Influenza Equina afectó poblaciones de Jilin y Heilongjiang, en el norte de China. La gran morbilidad e inusual mortalidad, sugirieron la introducción de un virus que difería significativamente de los aislamientos previos (21). Subsecuentes análisis antigénicos y filogenéticos sugirieron que este virus evolucionó independientemente de los existentes H3N8, y su cercana relación genética con virus aviares, indican que pudo haber emergido por transferencia directa a los equinos, sin rearreglos, de un pool genético aviar (5).

La variación antigénica del virus Influenza Equina H3N8 es significativa en termino de inmunización y protección, pero, a diferencia de Influenza Humana y Aviar, las cadenas se han mantenido mas relacionadas con las de sus prototipos con homología superior al 70% (16). Ver Fig. 4 por detalles gráficos.

1.4 Epidemiología

El VIE es la mayor causa de enfermedades respiratorias en los caballos del mundo entero. Se han reportado brotes de Influenza Equina en muchos países. Sin embargo, hasta el presente, Nueva Zelanda e Islandia se han mantenido libres del virus. En América del Norte y en algunos países europeos, la infección es enzoótica con brotes regulares cada año y ciclos de explosión de brotes más severos cada cierta cantidad de episodios (22, 23).

Todo caballo, sin importar la edad, es susceptible a la enfermedad si no fue vacunado previamente. Sin embargo, la enfermedad prevalece particularmente en potrillos deportivos de 2 a 3 años de edad, debido a que la actividad turfística implica la continua exposición y mezcla de poblaciones de diferentes áreas geográficas en altas concentraciones en lugares poco ventilados (24, 25).

Como se mencionó anteriormente, el primer aislamiento de H7N7 fue A/equine/Prague/56. El virus no se ha vuelto a aislar desde 1979, pero se siguen encontrando anticuerpos neutralizantes específicos contra este virus en caballos no vacunados, por lo que se piensa que continúa circulando en forma subclínica (26, 27).

El subtipo H3N8, tuvo su primer aislamiento en 1963 en Miami, y como se citó anteriormente, correspondió al A/equine/2/Miami/63. Durante los próximos años H3N8 se diseminó por toda América y Europa. Desde entonces, la infección con Influenza H3N8 se ha convertido en un serio problema para las poblaciones equinas, a pesar de los intensivos programas de vacunación. Entre 1978 y 1981 varios brotes epidémicos de H3N8 afectaron equinos vacunados y sin vacunar de América del Norte y Europa (28, 29, 30, 31, 32). Las mayores epidemias ocurrieron en Sudáfrica en 1986 e India en 1987 (33, 34). En ambos casos, el virus se introdujo en una población susceptible desde equinos vacunados provenientes de Europa o América del Norte que cursaban la enfermedad en forma subclínica, lo cual se confirmó por análisis genéticos y antigénicos de aislamientos cotemporales en las diferentes zonas geográficas (35, 36).

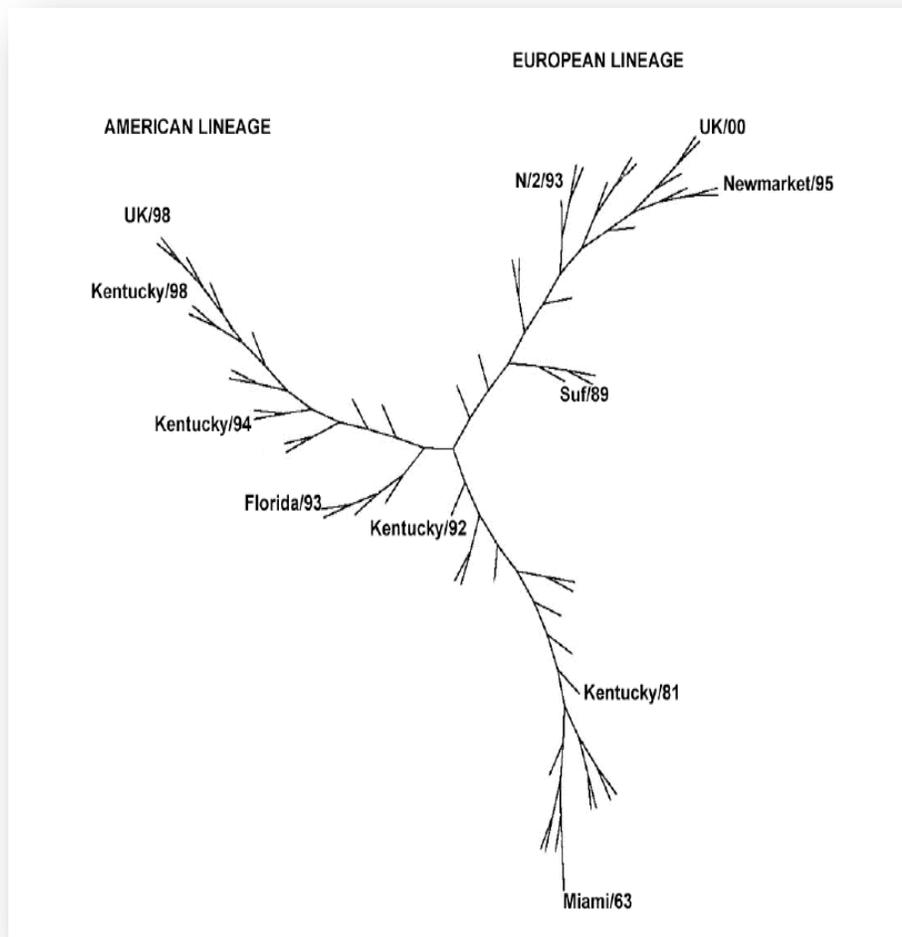


Figura 4 - Arbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de H3 HA1 de Influenza Equina, construido por el Método de Máxima Parsimonia.

En 1989, las epidemias ocurrieron en Europa y en China (37). Mientras que la epidemia de Europa fue causada por una cadena H3N8 que mostraba una deriva antigénica que comprometía la eficacia de la vacunación (38), la epidemia de China fue causada por una cadena H3N8 completamente diferente, más cercana a las cadenas aviarias H3N8 (39). De este modo, se presumió que el virus se transmitió directamente de las aves a los equinos, con tasas de morbilidad superiores al 80% y mortalidad del 20% en algunas poblaciones. En estos brotes, también se observó una inusual sintomatología de neumonía y enteritis.

En China durante la temporada 1993/1994, un segundo gran brote de epidemia de Influenza Equina en caballos no vacunados, afectó 1.5 millones de animales con tasas de mortalidad del 30%. La epidemia la causó un virus H3N8 convencional, relacionado con los aislados pertenecientes al brote de Europa de 1991 (40).

Desde 1963 se ha observado deriva antigénica de H3N8 dentro de un solo linaje, con una tasa de sustitución de 0.8 aminoácidos al año, comprometiendo la eficacia de la vacunación (41). Desde 1987 la evolución de los aislamientos europeos y americanos ha mostrado divergencia en diferentes linajes. Hoy en día, se han identificado dos familias de virus, representadas por los linajes europeos y americanos (41, 42). Consistentemente con el movimiento mundial de equinos, los virus tipo americano han sido aislados en Europa, y en menor medida (por razones desconocidas) el linaje tipo europeo no ha sido encontrado con tanta frecuencia en países americanos. El virus tipo americano parece haber divergido en tres linajes: un linaje de América del Sur, un linaje de Kentucky y un linaje de Florida, guardando similitud con los múltiples caminos de evolución del virus Influenza B (43).

Dos aislamientos de un brote de Influenza Equina en los Países Bajos en 1995 se caracterizaron genética y antigénicamente (44). Ambos aislamientos guardaban similitud con el linaje europeo. Las diferencias genéticas y antigénicas de estos aislamientos pueden deberse a la selección de variantes luego de su propagación en huevos embrionados (45). La caracterización de los aislamientos en Irlanda indica que ambos linajes, europeo y americano fueron responsables de los brotes observados en ese país (46).

Cuando aparecen nuevas variantes antigénicas, ocurren serios episodios epizooticos, caracterizados por la rápida diseminación y ocurrencia de brotes explosivos que afectan a más del 98% de los equinos susceptibles de todas las edades (47). La explosividad de los brotes lleva a la liberación y aerosolización de grandes cantidades de virus por provocar tos seca a principios de la enfermedad. La estabilidad de los viriones en los aerosoles le confiere protección en el traslado de hasta 32 metros o más. Existe un corto período de incubación (1 a 5 días), con aparición de signos clínicos durante la primera fase de la replicación viral en el epitelio respiratorio y una continua

liberación del virus durante los 10 días del ciclo viral (48, 49, 47, 50, 51, 52).

El nivel de inmunidad adquirido por exposición previa o vacunación, así como la severidad de los signos, influyen en el grado y duración de la liberación del virus, el potencial de diseminación y el patrón de infección de la población (49, 47, 51). Los caballos sin exposición previa ni vacunación desarrollan signos más severos, diseminan mayores cantidades de virus por períodos más prolongados y permiten aislamientos del virus con mayor facilidad (49, 53, 23).

La existencia de inmunidad previene la infección o provoca el pasaje de la enfermedad en forma subclínica con menor diseminación del virus. La mayoría de los brotes no se originan por la introducción de un caballo enfermo, sino por la introducción de un caballo con un curso subclínico de la enfermedad (9, 51). Investigaciones acerca de la infección viral por VIE en caballos vacunados, revelan que tienen inmunidad parcial, y pueden experimentar la infección y diseminación viral en forma subclínica (9, 51). Estos animales tienen gran importancia para la diseminación de la enfermedad, pero son difíciles de identificar.

No está definitivamente estudiada la persistencia del virus en las poblaciones equinas entre ciclos de epidemias. Se ha propuesto la existencia de un estado portador latente, pero no se ha probado, y parece poco probable debido a las características de virus y a su epidemiología, así como el hecho de que pese a los traslados a todas partes del mundo de equinos deportivos, Australia permanece libre de la infección. La hipótesis más certera sería la diseminación por parte de equinos parcialmente inmunizados, con infecciones subclínicas (23).

1.5 Trasmisión

El VIE se contrae por inhalación y es extremadamente contagioso. Un corto período de incubación (1 a 5 días) y tos persistente, caracterizan a la enfermedad Influenza en los equinos y contribuyen a su rápida diseminación.

La dosis viral de la exposición de equinos susceptibles determina la severidad de los síntomas y la eficacia de la vacunación (54). En las etapas tempranas de la infección se pueden realizar procedimientos de aislamiento para evitar la diseminación viral (55).

Las condiciones ideales para la diseminación de la infección se suscitan cuando los caballos viajan largas distancias por tierra o aire en ambientes cerrados, como sucede en los ambientes deportivos, como ser hipódromos, centros de entrenamiento, remates de equinos, haras, hospitales veterinarios o shows (57, 47). El confinamiento en espacios cerrados que den lugar al intercambio del aire exhalado en camiones y aviones, también contribuyen a la diseminación del virus; de

hecho, el transporte rápido a lo largo de grandes distancias de equinos ha sido clave en el estudio de la epidemiología del virus en las últimas décadas.

Los brotes de Influenza equina pueden ocurrir en cualquier momento del año, pero son más comunes al final del otoño, principios de invierno y en temporadas de mezcla, confinamiento y concentración de potrillos para las actividades deportivas. El estrés que implican estas actividades aumenta la susceptibilidad a la infección y la falta de ventilación de los espacios a los que están sujetos los equinos, conllevan a la diseminación del virus. Este virus sobrevive mejor en ambientes de baja humedad, y como todos los virus que se dispersan por aerosoles, su supervivencia se potencia durante la humedad y temperatura relativa del invierno. Se deberían tomar precauciones, al realizar la práctica común de cerrar ventanas de establos para conservar la temperatura en invierno, pues al dejar ambientes cerrados se provoca la diseminación del virus. Aunque la vía aérea es la más común, hay reportes de transmisión por materiales, agua y medios de transporte contaminados (57).

1.6 Signos clínicos y patología

La gripe equina se contrae por inhalación. El virus infecta las células del epitelio ciliado de las vías aéreas superiores e inferiores y pueden causar deciliación en grandes superficies de las vías respiratorias en 4 a 6 días (Fig. 5). Como resultado, el mecanismo de depuración mucociliar se ve comprometido y la tasa de remoción de la tráquea se puede ver reducida hasta 32 días después de la infección (58). Se desarrolla bronquitis y bronquiolitis, seguido de neumonía intersticial acompañada de congestión, edema e infiltración de neutrófilos. En general, los virus H3N8 causan enfermedad más grave que los virus H7N7, pero los virus del subtipo H3N8 son más pneumotropicos (59, 60), y se han asociado con miocarditis (61). Los signos clínicos de Influenza en animales no tratados previamente son fácilmente reconocibles. Influenza se caracteriza por un comienzo repentino con un período de incubación. El primer signo es una elevación de la temperatura corporal (hasta 41° C), que suele ser bifásica. Esto es seguido por una tos seca y profunda que libera grandes cantidades de virus en la atmósfera, a menudo acompañada de una descarga nasal cerosa, que puede llegar a ser mucopurulenta debido a una infección bacteriana secundaria. Otros signos clínicos comúnmente observados, son mialgias, inapetencia, y actividad en ganglios linfáticos submaxilares. La gravedad de la enfermedad varía con la dosis, la cepa del virus y el estado inmunológico del caballo (62, 63). Los caballos adultos sanos generalmente se recuperan sin complicaciones en 10 días, aunque la tos pueda persistir durante más tiempo. La

infección bacteriana secundaria puede prolongar el período de recuperación. Sin embargo, en potrillos, animales en malas condiciones y burros se han registrado tasas de mortalidad relativamente altas. Si no hay anticuerpos maternos en el momento de la exposición, los potrillos pueden desarrollar una neumonía viral que provoca rápidamente la muerte (64). Las muertes entre los animales adultos son generalmente una consecuencia de la infección bacteriana secundaria que conduce a la pleuritis, neumonía o púrpura hemorrágica. Las secuelas de la gripe equina pueden incluir faringitis crónica, bronquiolitis crónica y enfisema alveolar, que puede provocar sinusitis e infecciones de la bolsa gular.

Los signos clínicos en los animales parcialmente inmunes, como resultado de la vacunación o infección previa son más difíciles de reconocer, ya que puede haber poco o nada de tos o fiebre (65). Considerando que la propagación de la infección a través de un grupo de animales no tratados previamente siempre es rápida, han sido descritos brotes, en los que la infección en forma subclínica se distribuye en caballos vacunados durante 18 días antes de inducir signos clínicos reconocibles (66). También ha habido diagnóstico positivo de casos individuales de Influenza que se producen sin extenderse a otros animales en centros de entrenamiento de caballos Pura Sangre de Carrera.

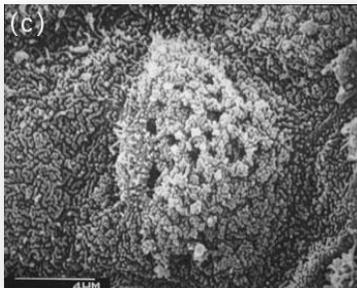
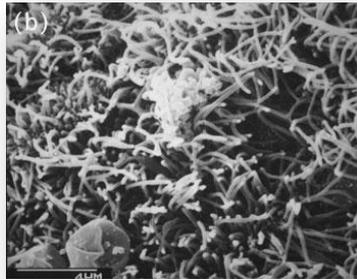
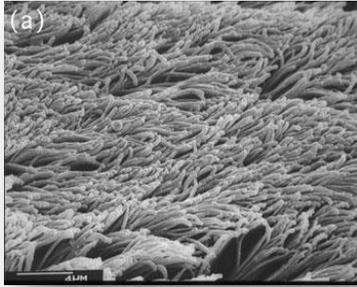


Figura 5- Efectos de la infección con VIE sobre el epitelio respiratorio ciliado. a) Epitelio ciliado sano, b) epitelio ciliado luego de tres días de infección, c) epitelio ciliado luego de seis días de infección, se observan grandes áreas de deciliación. Reproducido de Referencia 44.

1.7 Diagnóstico

Se ha demostrado que los caballos son a menudo, parcialmente inmunes a la vacuna de Influenza (en particular si las cepas de la vacuna no representan los virus en circulación) y que pueden propagar el virus en ausencia de signos clínicos. Estos animales representan un grupo de riesgo para la propagación de la infección. Así, nuestra capacidad de diagnóstico clínico, y subclínico en animales parcialmente inmunes, es fundamental en los intentos de control del VIE.

1.7.1 Detección de Antígenos

Luego de la infección primaria, los equinos pueden excretar el virus en las secreciones nasofaríngeas por 7 – 10 días, mientras que los equinos parcialmente inmunes excretan el virus en forma transitoria, por lo tanto, se debería sacar aspirados nasales dentro de las 24 horas posteriores a la aparición de fiebre, y en adecuado medio de transporte, remitirlos al laboratorio dentro de las 24 horas. El VIE puede ser aislado en huevos embrionados, mediante las rutas alantoidea y amniótica, y posterior análisis de actividad hemaglutinante. El análisis de IHA confirmatorio se deberá realizar con antisueros específicos de H7N7 y H3N8. Por lo general, se requieren cuatro a seis pasajes para evidenciar bajas concentraciones virales. En forma alternativa, el virus Influenza se puede aislar en la línea Madin Darby Kidney Cells (MDCK), sin embargo, la línea celular es sensiblemente menos susceptible que los huevos embrionados para el aislamiento del VIE y selecciona menor cantidad de variantes.

En la última década, se han desarrollado nuevos métodos de detección antigénica (inmunotinción de células infectadas, ELISA, PCR, etc.) para obtener una herramienta rápida en la fase aguda de la enfermedad. Recientemente, se ha descrito la técnica de Inmuno PCR, que combina las propiedades de ELISA y PCR en un test altamente sensible y rápido.

Un kit diagnóstico comercial que detecta la Nucleoproteínas, uno de los antígenos específicos de tipo de Influenza A humana, ha sido evaluado en Influenza Equina con buenos resultados. El test se destaca por ser, entre otros beneficios, muy rápido, brindando resultados en horas.

En contraposición, el aislamiento en huevos embrionados requiere tiempo para varios pasajes, necesarios hasta evidenciar actividad hemaglutinante, más el tiempo de su análisis por IHA. En el Reino Unido, Suecia e Irlanda se han aislado cepas que no crecen bien en huevos embrionados.

Los test de detección antigénica para el VIE en el pico de la infección, no son adecuados para detectar bajas concentraciones virales. La poca sensibilidad, se demostró en un estudio de desafío

realizado en Irlanda, donde los huevos embrionados y la técnica Nested PCR mostraron ser significativamente más sensibles que el test Directigen flu-A (Cullinane, sin publicar).

Considerando el rol de la deriva antigénica en la epidemiología del virus Influenza, es importante la realización de un diagnóstico primario que lo subtipifique, seguido de una caracterización. Los test de detección de Nucleoproteínas permiten una rápida subtipificación, que luego deja paso al aislamiento en huevos embrionados. En los últimos años, los métodos de PCR, han sido usados, con sensibilidad comparable al aislamiento, para la detección directa de material clínico. En este sentido, la amplificación por PCR del gen codificante de la Hemaglutinina procedente de muestras clínicas, seguido de su secuenciación, ha permitido avanzar en el estudio de caracterización de cepas. Llobi et al. mostraron la posible aparición de variantes del VIE luego de su propagación en huevos embrionados o MDCK, ya que aparecen algunas sustituciones de aminoácidos antigénicamente relevantes luego de su pasaje in vitro. La secuenciación del gen de la HA, directamente luego de RT PCR de aspirados nasales, puede brindar información importante para la vigilancia epidemiológica de la deriva antigénica, pero para un estudio completo, el aislamiento resulta indispensable para proveer cepas al estudio de análisis antigénicos y de reactividad cruzada.

1.7.2 Detección de Anticuerpos

Aunque sea epidemiológicamente útil, la herramienta de diagnóstico serológico de Influenza equina tiende a ser a posteriori, porque la toma de muestra corresponde al período de convalecencia, dos semanas después de la infección. Se necesita una segunda muestra en la fase aguda de la enfermedad para un diagnóstico definitivo. Esto se debe a que el nivel de anticuerpos inducidos por la infección detectada en una muestra en la fase aguda no puede distinguirse de los inducidos por la vacuna. Los test mayormente utilizados son IHA, SRH y Seroneutralización in vitro (SN). Tradicionalmente, se ha usado la IHA, por su alta sensibilidad de detección de anticuerpos anti H3N8, sin embargo, el test SRH ha mostrado tener mayor reproducibilidad y sensibilidad que IHA, ofreciendo ventajas al analizar equinos repetidamente vacunados.

Se considera evidencia de infección, un aumento de título cuatro veces mayor en las técnicas IHA y SN y un aumento del 50% o 25mm² en la técnica SRH. En estudios de colaboración internacional, realizados en suero humano, IHA y SRH mostraron tener sensibilidad equivalente en la medición de anticuerpos contra Influenza A, pero SRH logró tener mayor reproducibilidad a nivel de interlaboratorio. Dado que IHA resulta menos laborioso y más práctico, muchos laboratorios de diagnóstico, lo usan para el diagnóstico de Influenza Equina.

Se ha desarrollado un ELISA para detectar anticuerpos contra la proteína no estructural NSI (81, 82). Como esta proteína se produce durante una infección, pero no está incorporada en las vacunas con virus inactivados, en teoría, permite la diferenciación de los anticuerpos en respuesta a la infección de los inducidos por la vacunación con vacunas tradicionales. Con el desarrollo de vacunas vivas atenuadas, la utilidad potencial de esta prueba para la confirmación de la infección en los animales vacunados probablemente será obsoleta. Sin embargo, la actual tendencia hacia las vacunas genéticamente modificadas puede facilitar el desarrollo de técnicas de diferenciación de los animales infectados de los vacunados.

El diagnóstico por cultivo del virus a partir de las secreciones nasales puede tomar un mínimo de 2 o 3 días, y si se necesitan varios pasos para la confirmación del diagnóstico, se retrasa aún más. Un número de ensayos alternativos basados en el uso de un anticuerpo monoclonal para detectar la nucleoproteína en exudado nasal proporciona un diagnóstico en 24 h. De igual modo, se ha descrito un ELISA específico de VIE (83). Cuando se utilizó la prueba ELISA, en paralelo con el aislamiento del virus 1989, durante la epidemia del VIE en Gran Bretaña, se mejoró la tasa de detección de virus en un 44% (84). Existen varios kits de detección de Influenza humana, y, debido al alto grado de conservación de la nucleoproteína entre los virus Influenza, uno de ellos, el Directigen ha demostrado ser aplicable al diagnóstico del VIE (85). Es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección directa y cualitativa de de antígenos virales de Influenza A y B a partir de hisopados nasofaríngeos y exudados faríngeos de pacientes sintomáticos.

Estos métodos de detección directa son útiles en la aplicación del control, ya que pueden ser utilizados para detectar caballos que estén excretando el virus, a fin de reducir el ejercicio, para no exacerbar la enfermedad. También son un complemento al aislamiento del virus, que sigue siendo esencial para caracterizar virus nuevos y para proporcionar cepas de vacunas, ya que permiten que los esfuerzos de aislamiento del virus se centren en muestras detectadas como positivas.

1.8 Tratamiento individual y Control de brotes

La recomendación estándar para la gestión del VIE es de una semana de descanso completo por cada día de temperatura elevada, seguido por un retorno gradual al trabajo. El descanso de los caballos reduce la severidad de los síntomas clínicos, el período de recuperación y minimiza las secuelas crónicas. También disminuye la eliminación del virus, reduciendo así el riesgo de transmisión a otros caballos. Debe haber una adecuada accesibilidad al agua dulce y deben contar con soluciones electrolíticas, en un segundo balde de agua. Un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) pueden utilizarse en los casos con fiebre alta para evitar la inflamación

pulmonar en exceso y en las yeguas preñadas para reducir el riesgo de aborto. Los signos clínicos deben controlarse diariamente, sonidos secundarios en el pulmón y aumento de la fiebre prolongada es indicativo de infección bacteriana secundaria. Si esto sucede, debe ser iniciada una terapia antibiótica y deberá obtenerse muestras para cultivo bacteriano y pruebas de sensibilidad a los antibióticos en el laboratorio de diagnóstico. Una inmediata y eficaz cuarentena es la mejor manera de reducir al mínimo la propagación del virus.

1.9 Inmunidad natural y vacunas inactivadas

A nivel poblacional, el VIE ha desarrollado estrategias para lidiar con el sistema inmune. El virus ha adoptado un sistema de tropismo de huésped dual, en el que aves acuáticas sirven de reservorio, desde las cuales el virus puede transmitirse directamente a los mamíferos (27, 67). Por otro lado, el VIE sufre deriva y salto antigénico (67).

A nivel individual, la inmunidad generada por las vacunas inactivadas disponibles, recae en el mantenimiento de la circulación de anticuerpos específicos contra la HA (68, 69, 70, 71, 72, 73), por lo que existe una cercana homología entre las cepas vacunales y las de desafío (74, 75, 76).

En contraposición, la infección por el VIE induce mayor inmunidad a largo plazo, no dependiente del mantenimiento de la circulación de anticuerpos. Por ejemplo, ponies previamente infectados naturalmente, con niveles de anticuerpos bajos o incluso indetectables, resultaron estos protegidos contra la reinfección luego de más de un año de su primera exposición. Esto sugiere una diferencia en la calidad de la respuesta inmune luego de la infección natural y luego de la vacunación con vacunas inactivadas (77, 78).

El desarrollo de métodos de infección experimental que reproduzcan la sintomatología de la infección como en las infecciones naturales en los brotes, ha permitido medir la respuesta humoral y celular del virus y correlacionar los niveles de protección (79, 80).

Como la inmunidad prevista por vacunas inactivadas del VIE, depende de los niveles de anticuerpos circulantes contra HA, en ausencia de tales anticuerpos, los caballos vacunados son susceptibles a la infección. En contraposición, la infección con VIE induce inmunidad a largo plazo, independiente de la circulación de anticuerpos contra HA. Esto sugiere una diferencia importante en la respuesta inmune después de la infección, en comparación con la vacunación utilizando virus inactivado. Los componentes adicionales de la respuesta inmune que pueden estar implicados son la respuesta de la inmunidad celular y la mediada por los anticuerpos de las mucosas localizados en el sitio de infección.

La respuesta de la inmunidad celular al virus Influenza está bien definida en el hombre. La principal respuesta es la mediada por el desarrollo de Linfocitos T Citotóxicos (LTCs), restringidos al MHC de clase I CD8 +, que suelen ser detectables entre los 3 y 4 días después de la infección. Los LTCs CD8 + lisan las células infectadas por virus (86). Los epítopes reconocidos por LTCs en las proteínas HA, nucleoproteínas (NP), de matriz (M1) y en las PB2 del complejo polimerasa, son más conservados que los que participan en la inmunidad humoral. Los Linfocitos T helper CD4 + restringidas al MHC de clase II están involucrados, tanto en la respuesta humoral como en la celular, y pueden ejercer efectos citotóxicos, aunque en menor medida que LTCs CD8+. Mientras que los anticuerpos reducen la carga del virus y restringen la re-infección, los mecanismos de inmunidad celular probablemente desempeñan un papel más importante en la eliminación del virus durante el período de convalecencia (87, 88)

Se sabe bastante menos sobre la respuesta inmune celular de los caballos. La infección experimental de potrillos con el VIE induce una respuesta de LTCs antígeno específicos genéticamente restringidos, que persiste durante al menos seis meses (89) La generación de LTCs, en este caso, probablemente se produce a través del procesamiento de antígenos endógenos, seguido de la presentación de péptidos a través de MHC de clase I. En contraste, las vacunas a virus inactivado, no estimulan una respuesta significativa de LTCs, porque los antígenos se someten a una transformación exógena y presentación a través de MHC de clase II. La infección por el VIE genera respuestas mediadas por anticuerpos específicos de mucosas IgA y anticuerpos séricos IgGa e IgGb, mientras que una vacuna a virus inactivado, induce respuesta de sólo un tipo de IgG sérica (90).

En vista de estas diferencias en la respuesta inmune inducida por la infección y la vacunación con antígenos inactivados, se han desarrollado nuevas iniciativas de investigación, centradas en la reproducción de la respuesta inmune que siguen a la infección natural.

Recientemente, se han desarrollado una serie de vacunas para proporcionar una mayor estimulación del sistema inmune.

Hannant et al. (91) mostraron que caballos vacunados dos veces vía intranasal con VIE inactivado y adyuvado con toxina del cólera B, desarrollaban altos niveles de IgA específicos de antígeno y se mostraron clínicamente inmunes a la infección por virus desafío. Para sacar provecho de este hallazgo, en EE.UU. se desarrollo un régimen de vacunación alternativo (92), el cual consistió en un programa de dos inyecciones intramusculares, con una tercera dosis intranasal, seis meses después. Los ponies vacunados de acuerdo a este calendario estuvieron protegidos contra un desafío administrado seis meses después de la tercera dosis. Dicha vacuna intranasal atenuada contra Influenza, conteniendo una cepa adaptada al frío de A/eq/Kentucky/91 está comercialmente

disponible en América del Norte. La vacuna proporciona protección contra las últimas cepas aisladas de H3N8 de EE.UU. y Europa, cuatro semanas después de una sola dosis intranasal (93), con una protección que dura al menos seis meses después de la vacunación (94). La ausencia de respuesta humoral sistémica de los ponis vacunados sugiere la participación de mecanismos inmunes distintos de los anticuerpos séricos.

Más recientemente, ha sido autorizado en la Unión Europea, la primera vacuna a virus vivo basado en un poxvirus recombinante. La vacuna contiene dos construcciones de canaripox que expresan el gen HA de A/eq/Newmarket/2/93 (H3N8) y A/eq/Kentucky/94 (H3N8). Los primeros estudios han demostrado que, aunque brinda protección aún en ausencia de un adyuvante, su eficacia se ve aumentada al asociarse con un carbopol (95), e induce inmunidad dos semanas después de la vacunación, con protección parcial durante más de 10 meses después de la segunda dosis, demostrada por una reducción significativa en la clínica y excreción del virus tras infecciones experimentales. La protección se produjo, incluso cuando los anticuerpos específicos eran bajos o nulos (resultados no publicados), lo que sugiere que la vacuna está generando la respuesta inmune celular, lo cual ya se ha informado acerca de otras construcciones de canaripox en ratones (96) y seres humanos (97). Otro mecanismo posible es que una vacunación adecuada fortalece el sistema inmunológico y permite la rápida respuesta anamnésica de anticuerpos (la "recuperación") después del desafío.

Las vacunas de ADN ofrecen una alternativa potencial a las vacunas clásicas, demostrado por Lunn et al. (98). Ponies vacunado con tres dosis de ADN plásmidico que codifica HA, administradas por piel y mucosas, mostraron que la vacuna de ADN ofrece parcial o completa protección contra la infección desafío. Sorprendentemente, se asoció la protección con la presencia de IgG local, en ausencia de IgA en las secreciones nasales. Aunque estos resultados son prometedores y merecen más investigación, se necesitan mejoras en la prestación de sistemas para que esta tecnología se torne comercialmente viable y aplicable en la práctica veterinaria.

1.10 Potencia de vacunas

Actualmente, los principales marcadores de resistencia y recuperación de la infección por los virus Influenza, son los anticuerpos circulantes específicos para HA y NA (99). El avance en la evaluación de la eficacia protectora de las primeras vacunas se vio obstaculizado por la falta de métodos confiables para medir la concentración de HA y la respuesta de anticuerpos del huésped contra esta glicoproteína. Además, no había técnicas de desafío en equinos, reproducibles para la

evaluación de la protección proporcionada por la vacunación.

La concentración de HA de las vacunas, siempre se ha cuantificado mediante la aglutinación de células de pollo y la respuesta de anticuerpos contra HA, mediante Inhibición de la Hemaglutinación (IHA). Los primeros intentos de analizar la relación entre la protección generada por la cantidad de anticuerpos inducidos por la vacuna y la protección generada contra la infección fueron confusos debido a fallas técnicas, y por ende, Títulos de IHA desde 8 hasta 128 se consideraron como protectores. Posteriormente, el desarrollo de mejores métodos de medición de potencia de formulaciones vacunales, de respuesta de anticuerpos y de protección contra la infección, permitió avanzar en la normalización y diseño de vacunas. Una técnica muy confiable y evaluada a nivel internacional para la prueba de potencia in vitro, lo constituye la Inmunodifusión Radial Simple (SRD), la cual se ha desarrollado para la medición de HA inmunológicamente activas en vacunas. Otros estudio han demostrado que el ensayo de Hemólisis radial simple (SRH), es más reproducible que la prueba IHA para la medición de anticuerpos frente a HA. Además, existe una relación directa entre la potencia de la vacuna, en términos de concentración de HA, y anticuerpos contra HA estimulados por las vacunas inactivadas, medidos mediante SRH.

La evaluación de vacunas mediante el desafío por infección experimental de los caballos ha progresado en forma lenta, debido a dificultades en la reproducción de la clínica de la enfermedad (98, 99, 100, 101). En el presente, las dificultades han sido superadas mediante el uso de aerosoles nebulizados, un sistema de entrega que imita una infección natural, por la producción de gotitas infecciosas (diámetro <5 mm), capaces de llegar a las vías aéreas superiores e inferiores (D. Hannant, datos no publicados) y por evitar una concentración del inoculo de desafío en el sitio de muestreo. Mediante el uso de este método de desafío, se han realizado una serie de experimentos para medir la protección conferida por vacunas a virus inactivado con diversas variedades de adyuvantes y sistemas de presentación de antígenos. Un gran número de experimentos han utilizado la prueba de SRD para normalizar las vacunas inactivadas y la prueba de SRH en la medición de los anticuerpos en ensayos de desafío para evaluar la protección de la infección y su enfermedad. Estos estudios han determinado la relación entre la potencia de la vacuna, la circulación de anticuerpos contra HA y la protección que le confiere contra la infección y su enfermedad. Los niveles de anticuerpos necesarios para la protección contra el desafío con un virus antigénicamente similar fueron entre 120 a 154 mm², evidenciando que se requiere un umbral más alto para la protección con dosis crecientes de virus nebulizado (102). La epidemia de VIE de Sudáfrica en 1986, proporcionó una oportunidad poco frecuente para examinar la eficacia de la vacuna en una población donde no existía inmunidad natural. Desde el pre infección fue posible estimar que los niveles de anticuerpos con un valor de SRH de 160 mm² eran consistentes con una

tasa de protección del 90% de equinos seroconvertidos al ser expuestos a la infección.

La mayoría de las vacunas contra Influenza Equina contienen virus inactivado (con adyuvantes, que incluyen aceites, Alhydrogel o carbómero) o vacunas de subunidades (ISCOMs o micelas combinado con Quil A). Se encontró que las respuestas de anticuerpos estimulados por las vacunas que contienen fosfato de aluminio o hidróxido eran más duraderas que las inducidas por las vacunas acuosas de contenido antigénica equivalente. Los niveles de anticuerpos, sin embargo, disminuyeron, entre 16 a 20 semanas después de la segunda y tercera dosis de la vacuna. En cambio, la incorporación de un adyuvante polímero, mantuvo en un nivel elevado la cantidad de anticuerpos, por lo menos, seis meses después de la tercera dosis de la vacuna (104). Del mismo modo, la vacunación con tres dosis de ISCOMs contiene 15 mg de HA, resultado en un nivel de SRH de alrededor de 70 mm², 15 meses a partir de la tercera dosis (105). La histórica falta de estandarización de vacunas entre las diferentes fuentes y la normas poco exigentes de algunas licencias de las autoridades, se han traducido en el uso de productos con potencia insuficiente en términos de capacidad de estimular anticuerpos frente a HA. Morley et al. (106) describe un ensayo de campo usando una vacuna inactivada comercial, la cual no pudo demostrar diferencia entre el nivel de enfermedad de los animales vacunados y no vacunados durante un brote natural de la enfermedad en una población de caballos residentes en un hipódromo. La situación está mejorando con el establecimiento de preparaciones de referencia internacional de la Farmacopea Europea, para normalizar las pruebas serológicas de potencia en la evaluación de vacunas y la aplicación de reglamentos federales sobre las vacunas de Influenza Equina en Europa (107) y, más recientemente, en los EE.UU (9° CFR partes 112 y 2).

1.11 Optimización de programas de vacunación

Los calendarios de vacunación para las vacunas con virus inactivado requieren dos dosis con 4 a 6 semanas de diferencia seguido de dosis de refuerzo anual. Actualmente, los requisitos impuestos por la Federación Ecuestre Internacional (FEI) para competencias, indican necesario dos dosis de 4 a 6 semanas de separación y seis meses más tarde, una tercera dosis, seguido de refuerzos anuales. Los modelos matemáticos, validados experimentalmente con datos de campo, han demostrado que la vacunación reduce considerablemente tanto la incidencia, como el tamaño de las epidemias, lo cual significa que los grandes brotes del VIE son excepcionales entre los grupos de animales vacunados. Así, la aplicación de políticas de vacunación garantiza un nivel suficiente de inmunidad en la cabaña, para prevenir brotes a gran escala, que puedan dar lugar a la cancelación de

carreras y otros eventos ecuestres. Sin embargo, existen dudas acerca de que el anteproyecto de programa de tres dosis seguidas de la vacunación anual en hipódromos, proporcione una inmunidad suficiente para proteger a los caballos jóvenes de la enfermedad ante la ocurrencia de pequeños brotes del virus. La corta vida de la inmunidad proporcionada por las vacunas inactivadas ha sido reconocida por parte de las autoridades hípicas desde hace algunos años, y se desprende de varios estudios (109, 110, 112) que el plan de vacunación en tres dosis, de acuerdo a los requisitos mínimos de los Jockey Clubs que lo aplican, las normas y las recomendaciones del fabricante de vacunas, mantienen a los caballos con bajos títulos de anticuerpos durante varios meses entre la segunda y tercera dosis. Newton et al. (112) encontraron que los niveles de anticuerpos, medidos mediante SRH de equinos Pura Sangre de Carrera en hipódromos de Newmarket han disminuido por debajo del nivel de protección, luego de cuatro meses de la vacunación de refuerzo. Es importante destacar que este estudio coincidió con las ventas de otoño, un período de riesgo conocido para la transmisión del VIE en los potrillos Pura Sangre (113). Más tarde, observaciones en centros de entrenamiento de Newmarket confirmaron que los niveles de anticuerpos están influenciados, tanto por el tiempo transcurrido desde la última vacunación, como por el número total de vacunas previamente administradas (114). Cullinane et al. (115) demostraron que refuerzos mensuales beneficiarían a los caballos que puedan estar en alto riesgo durante este intervalo. En EE.UU se han aplicado regímenes de vacunación intensiva, con dosis de refuerzo cada 30 a 60 días, sin embargo, se sabe muy poco sobre los posibles efectos adversos de la administración de una vacuna potente con demasiada frecuencia, que pueda atenuar la respuesta inmune.

Utilizando un modelo estocástico para estudiar el riesgo de ocurrencia de un brote en una población de Pura Sangre de Carrera en un hipódromo típico, Park et al. (116) sugirieron que un aumento de la frecuencia de la vacunación en caballos a partir de 2 años, con boosters a los seis meses, ofrece un importante aumento en la protección sobre las vacunaciones anuales.

El momento de la primera vacunación puede ser fundamental para el desarrollo posterior de anticuerpos. Si bien se reconoce que los anticuerpos maternos, generalmente inhiben el desarrollo de la síntesis de anticuerpos neonatales, a menudo se supone que estos anticuerpos se deterioran luego de 3 a 4 meses. La tentativa es vacunar antes de la pérdida de los anticuerpos maternos, para evitar períodos ventana. Los potros nacidos de yeguas vacunadas durante el período de gestación tienen altos niveles de anticuerpos maternos a los dos días del nacimiento (117, 118, 119). En contraste, Liu et al. (125) informaron que los anticuerpos maternos persisten solo un corto período, y varios autores (121, 122, 123) encontraron que la mayoría de los potros, que habían tenido valores detectables de anticuerpos (HIA) a los tres meses de edad, quedaron

prácticamente sin protección a los seis meses. Cullinane et al. (123) sugieren que no sólo la vacunación durante la presencia de anticuerpos maternos interfiere con el desarrollo de la inmunidad activa, sino que repetir la vacunación en presencia de estos anticuerpos maternos puede inducir tolerancia.

Sobre la base de estas conclusiones, se recomendó que las yeguas deban ser vacunadas contra el VIE en las últimas 6 a 4 semanas de preñez para asegurar la transferencia de niveles protectores de anticuerpos en el calostro, y que los potrillos no deban ser vacunados hasta que sus anticuerpos maternos se hayan debilitado (es decir, no antes de seis meses de edad o cuando sean seronegativos).

1.12 Selección de cepas vacunales

La vigilancia de la deriva antigénica es una piedra angular de los programas de vacunación para el control de Influenza. Al igual que con otros virus de ARN, la replicación del VIE es propensa a errores, por lo tanto, los genes virales tienen una alta frecuencia de mutación. Muchas de estas mutaciones son intrascendentes o perjudiciales para el virus, pero las mutaciones que afectan a los sitios antigénicos de la HA (y N) pueden dar lugar a la deriva antigénica. La formulación de las vacunas de Influenza humana se revisa anualmente y casi todos los años se cambian para contemplar las cepas de virus circulante más representativas de todo el mundo. Históricamente, el cambio antigénico del virus H3N8 ha sido examinado con pruebas de IHA. Hay diversas opiniones sobre la relación antigénica de los virus H3N8 y la importancia que tienen las diferencias observadas con respecto de la inmunidad inducida. Por ejemplo, Hinshaw et al. (126) llegaron a la conclusión de que la mayoría de los virus aislados entre 1979 y 1981 fueron substancialmente diferentes de los virus prototipo de Miami /63 incluidos en la vacuna, según comparación mediante la infección en animales de experimentación y análisis de sueros por IHA, estableciendo, entonces, que representantes de la nueva variante deberían incluirse en las vacunas. Por otra parte, Burrows, et al. (127), sugirieron que la deriva antigénica menor detectada en los virus aislados entre los años 1963 y 1979 no justificaba un cambio en las cepas de la vacuna, porque los sueros posteriores a la vacunación de caballos inmunizados con el virus de Miami/63 tuvieron una elevada reacción cruzada en pruebas de IHA con los virus de 1979. Esta conclusión no tuvo en cuenta los resultados de Haaheim y Schild (129), los cuales establecían que la cepa de anticuerpos específicos es más eficaz en conferir protección que una que ejerza reacción cruzada.

Durante un brote de Influenza en el Reino Unido en 1989, sólo los caballos con niveles muy altos

de anticuerpos inducidos por vacunación resultaron estar protegidos contra la infección, sugiriendo la posibilidad de que los cambios antigénicos ocurridos en 1989 impidieron su neutralización por los anticuerpos estimulados por las vacunas que contienen Miami/63, Fontainebleau/79 o Kentucky/81. La secuenciación del gen de la HA1 y su análisis antigénico con el uso de anticuerpos monoclonales sugirieron que hubo diferencias significativas entre los representantes de una cepa de 1989 y la vacuna contra las cepas de uso corriente en el momento. La hipótesis fue probada mediante la vacunación de grupos de potrillos con vacunas monovalentes que contenían, tanto cepas de la vacuna, como una cepa de 1989, a los que se los desafió con la cepa experimental del virus de 1989 (130). Aunque todas las vacunas proporcionan protección clínica, su eficacia en términos de capacidad de eliminar la excreción de virus tiene una correlación directa con el grado de relación antigénica entre la cepa de la vacuna y la cepa desafío. A raíz de una reunión entre expertos en nuevas cepas del VIE de la OIE y la OMS, se recomienda que las vacunas de Influenza Equina, sean actualizadas, incluyan la cepa de 1989, y se hagan esfuerzos para aumentar la vigilancia y la caracterización de los virus (131).

El análisis filogenético de las secuencias de HA reveló que el virus H3N8, que ha evolucionado como un solo linaje (132), al parecer, se separó en dos linajes distintos a mediados de la década de 1980 (133), y a la fecha, los linajes siguen cocirculando de forma independiente; un linaje predominantemente aislado de Europa (con la excepción de un virus aislado en Canadá en 1990), mientras que otro linaje predominantemente aislado de los caballos en el continente americano. Es evidente, sin embargo, que el virus tipo americano se había introducido en Europa, al menos en una ocasión. La divergencia genética de los virus de Estados Unidos y Europa se refleja en su reactividad antigénica, planteando la cuestión de la importancia potencial de la geografía en las variaciones de las características antigénicas de la vacuna para la eficacia de su aplicación. Además de vacunación y experimental, estudios de reto en ponis sugirieron que las vacunas que contienen virus de la estirpe americana no pueden ser tan eficaces en la protección contra la infección, como la vacuna homóloga frente al desafío con el virus del linaje europeo (134). Observaciones de campo han apoyado la hipótesis de que las diferencias antigénicas entre los virus de los linajes de América y Europa son suficientes para afectar la eficacia de la vacuna. Durante un brote causado por un virus europeo, en Reino Unido durante 1995, que afectó Pura Sangre vacunados, se observó que aquellos caballos con niveles anticuerpos de más de 140 mm², estuvieron protegidos de la infección (135). Sin embargo, durante un brote causado por un virus estadounidense en 1998, cuando las vacunas utilizadas sólo contenían virus de linaje europeo, un cuarto de los caballos con nivel de anticuerpos superior a 140 mm² se infectaron (136). La cocirculación de variantes antigénicas significa que es importante basar la selección de nuevas cepas de la vacuna en el

conocimiento del virus predominante que circula en el campo. Luego de una nueva reunión de expertos de la OIE y de la OMS en 1995, se estableció una vigilancia más formal del sistema de vacunación (137), integrado por un panel internacional de expertos, incluyendo representantes de la OIE, la OMS y los laboratorios de referencia de Influenza, con los datos recogidos sobre los brotes, el rendimiento de la vacuna contra Influenza en el campo, y las características antigénicas y genéticas de las nuevas cepas aisladas del virus cada año. La vigilancia de expertos recomienda actualizar las cepas de la vacuna con las cepas que se publiquen en el Boletín de la OIE. Los criterios utilizados para decidir sobre la necesidad de actualizar cepas de la vacuna se basan en gran medida en los criterios utilizados para la Influenza humana, la selección de cepas de la vacuna, es decir, la detección de los cambios en la HA, que se distinguirá por HIA, ensayos con hurón y antisuero de caballo, la secuenciación del gen de la HA1 y la vacuna de desafío en el campo. La mejora de la vigilancia en el campo, la normalización de la potencia de las vacunas y la introducción de una vacuna contra la cepa del sistema de selección han permitido el desarrollo de vacunas con cepas actualizadas (138).

1.13 Vigilancia internacional

El creciente movimiento internacional de equinos para cría y competencia presenta un desafío en el control de Influenza Equina. Durante los últimos 20 años, han sido descritos varios brotes explosivos como consecuencia de la introducción de animales infectados en poblaciones indígenas susceptibles (139, 140) Debido al desarrollo económico y deportivo, es conveniente respetar los períodos de cuarentena al realizar movimientos de caballos, y así evitar la interrupción de los programas de competencia. Hay, por lo tanto, una confianza en la vigilancia de Influenza en la población y en el control realizado a través de la vacunación para evitar la propagación viral. Cuando estas medidas fracasan, y los caballos son transportados cursando la infección en forma sub clínica, se utilizan a menudo cortos períodos de cuarentena para evitar la introducción de la infección.

Existen reglamentos relativos a la circulación de animales basado en el uso y desarrollo de técnicas de diagnóstico y políticas de vacunación. La Comisión del Código de la OIE recomienda que la importación equina de los países que están libres del Influenza Equina deba exigir que todos los caballos que viajen desde las zonas endémicas, sean vacunados y hayan recibido su última dosis de refuerzo en un plazo de 2 a 8 semanas previos al viaje (141). Una medida adicional a ser aplicada, es la detección de anticuerpos mediante la técnica de SSR, para identificar los animales sensibles,

que requieran revacunación para aumentar sus niveles de anticuerpos antes de viajar. Se hace necesario el desarrollo de pruebas de diagnóstico más rápidas, que permitan el diagnóstico de animales a su desembarque y previa liberación en poblaciones locales susceptibles.

2. HERPESVIRUS EQUINO

2.1 Historia

Aunque la enfermedad respiratoria de los caballos fue reconocida y señalada en los primeros escritos de las enfermedades de los animales, la etiología compleja de este cuadro no fue descrita hasta 1954, cuando se desarrollaron y aplicaron los métodos y técnicas específicas de Virología. Aunque ya en 1911 Basset demostró que la causa de la enfermedad respiratoria equina era un agente filtrable, también Dimock y Edwards en 1922, sugirieron que el aborto equino era consecuencia de infección viral, no siendo posible demostrar sus afirmaciones, por no existir, en su momento, técnicas de aislamiento y caracterización de los virus relacionados. Más tarde, en 1930 estos mismos autores aislaron el virus responsable, y posteriormente Doll lo denominó virus de la Rhinopneumonitis (o Rinoneumonitis).

A partir de 1954, los investigadores han revelado que existen varios virus asociados a enfermedades respiratorias de los equinos, uno de los cuales es el virus de la Rhinopneumonitis, siendo también responsable de abortos. Más tarde, se dieron cuenta que debido a la alta prevalencia del virus y de la inadecuada inmunidad que producía la vacuna, los caballos padecían una reinfección (142).

Tras la puesta a punto de técnicas serológicas que puedan detectar en el animal infectado el desarrollo de anticuerpos humorales, se dio un gran avance en el estudio de estas enfermedades. Esta técnicas fueron la Fijación de Complemento, ,Seoneutralización in vitro y Enzimo Inmuno Ensayo (EIA) (143). Otro avance de gran importancia para el estudio de la enfermedad fue el aporte de Studdert y col., (145) que definieron mediante el análisis del ADN viral con la técnica Restricción Fragment Polymorphism (RFLP) para el ADN del virus Herpesvirus Equino (HVE), dos subtipos, el subtipo fetal y el subtipo respiratorio, al primero le llamaron HVE – 1, y al segundo HVE – 4.

Están incluidos en el amplio espectro de patógenos respiratorios capaces de causar enfermedad clínica del tracto respiratorio superior (ETRS) en el caballo doméstico (146, 148, 149, 150, 151, 152). HVE-1 y HVE-4 son ampliamente ubicuos en la población equina del mundo y son patógenos respiratorios primarios que pueden causar enfermedad del tracto respiratorio, sin necesidad de factores predisponentes. La evidencia sugiere que los dos Herpesvirus circulan y se transmiten durante todo el año. Mientras que las infecciones respiratorias en caballos con HVE-1 y HVE-4 son a menudo subclínicas, ambos virus tienen el potencial de causar brotes extendidos de enfermedad severa del tracto respiratoria superior. La mayoría de la enfermedad respiratoria por Herpesvirus

ocurre en los caballos jóvenes, con un riesgo más alto a la infección entre el destete y los dos años de edad.

2.2 Clasificación

Los Herpesvirus equinos (HVE), HVE-1 y HVE-4, pertenecen a la Familia *Herpesviridae*, Subfamilia Alphaherpesvirinae, Género Varicellovirus. Son especies cuyos genomas y fenotipos son semejantes, no obstante, importantes diferencias permiten individualizarlos en taxa distintos. Cuando se analiza la historia natural de ambos, se observa un alto grado de sobreposición en los sitios de replicación, cadenas epidemiológicas y producción de disturbios. Normalmente, la enfermedad desarrollada por la infección viral con HBV está asociada a la presencia de una especie, pero sucede en ocasiones, la presencia simultánea de HVE – 1 y HVE - 4 en un mismo animal.

Hasta 1981 HVE – 1 y HVE – 4 eran considerados como variantes antigénicas de una única especie viral, denominada como HVE – 1, siendo respectivamente designados como subtipos 1 y 2. El análisis del genoma por RFLP llevo posteriormente a su reclasificación en especies distintas, y luego de esta re-clasificación se alcanzó una mejor comprensión del papel que desempeñan ambos virus como causales de enfermedades.

Tabla 1- Herpesvirus equinos y sus hospederos naturales.

Designación ¹	Nombre común	Subfamilia	Genoma
Equus caballus			
HVE – 4	Equine rhinopneumonitis virus	℔	145
HVE – 1	Equine abortion virus	α	150
HVE – 3	Equine coital exanthema virus	α	148
HVE – 2	Slow – growing equine herpesvirus	α	192
HVE – 5	Slow – growing equine herpesvirus	β	179
Equus asinus			
AHV – 3	Asinine abortion virus	℔	147
AHV – 1	Asinine coital exanthema virus	℔	147
AHV – 2	Slow growing asinine herpesvirus	℔	No disponible
Gazella thomsoni			
HVE - 9 ²	-	α	No disponible

¹ De acuerdo a la nomenclatura en inglés, relacionada a tabla original (Crabb & Studdert, 1995).

² El HVE – 9 fue descrito en gacelas (Bovidae) y serológicamente relacionado con HVE – 1.

2.3 Morfología

HVE-1 y HVE-4 poseen un genoma de doble cadena ADN (150 kb), contenido dentro de una cápside proteínica icosaédrica de 120 – 200 μm, rodeada por una delicada envoltura lipídica que posee una docena de glicoproteínas diferentes (Fig. 6). La fragilidad de la envoltura lipídica limita la supervivencia de los Herpesvirus en el ambiente y los hace muy sensibles a la destrucción por desinfectantes comunes.

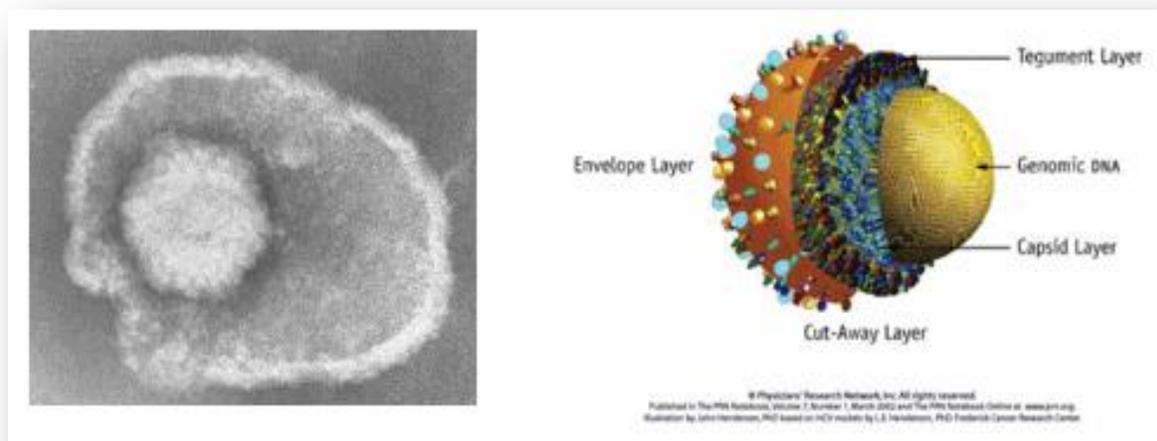


Figura 6 - Fotomicrografía electrónica de una partícula de virion de Herpesvirus equino tipo 4 (HVE-4) teñida por contraste. b) Representación tridimensional de su morfología.

La estructura central de la nucleocápside, formada por 162 capsómeros huecos arreglados en una estructura icosaédrica, contiene al ADN viral. La nucleocápside está rodeada por una membrana lipídica flexible (envoltura) conteniendo numerosas glicoproteínas que codifican para el virus.

2.4 Genoma

La organización del material genético de HVE – 1 y HVE – 4 es muy semejante, El genoma presenta la arquitectura típica de la Subfamilia Alphaherpesvirinae (Fig. 7), dividiéndose en regiones UL (Unique Large Region) y US (Unique Short Region). La region US está flanqueada por dos conjuntos de secuencias repetidas denominadas IRS (Internal Repeated Sequence) y TRS (Terminal Repeated Sequence) (145).

En la década de 1990, se secuenció el genoma completo de un aislamiento de HVE – 1. La secuencia tenía 150. 223 pares de bases, con una composición G + C de 56, 7%. Existe registro de una secuencia genómica completa para el HVE – 4, con 145. 597 pares de bases. Los genomas de HVE – 1 y HVE – 2 tienen 76 genes (80 se consideran como repeticiones), dispuestos de manera colineal en casi su totalidad. El grado de identidad entre secuencias de nucleótidos, tomando pares individuales de genes homólogos, varía entre 55% y 84%. En relación a las secuencias de aminoácidos, la identidad varía entre 55% y 96% (148).

La comparación electro fenotípica obtenida mediante el análisis de restricción de aislamientos de HVE – 4 de diferentes zonas geográficas, indica una gran estabilidad genética, con poca variación intraespecífica. Entre los aislamientos de HVE – 1, se encuentra una mayor variabilidad, con aparente relevancia epidemiológica (147).

Los dos tipos del Herpesvirus, aislados mundialmente, comprenden un grupo notablemente homogéneo con mínima diversidad genética o antigénica (149). La diversidad de la secuencia de nucleótidos para cada tipo de virus puede demostrarse, pero es limitada. La comparación de la secuencia genómica completa de dos aislamientos no relacionados de HVE-1 ha revelado sólo 42 diferencias entre nucleótidos que dan lugar a cambios en los aminoácido que codifican. Por lo tanto, HVE-1 y HVE-4 están constituidos por múltiples cepas con mínima heterogeneidad genética, aunque demostrable que cocirculan y presentan diferencias en su potencial patogénico. Los dos Herpesvirus son fácilmente distinguibles por diferencias en los perfiles electroforéticos de los fragmentos tratados con enzimas de restricción, como se aprecia en la Fig. 9.

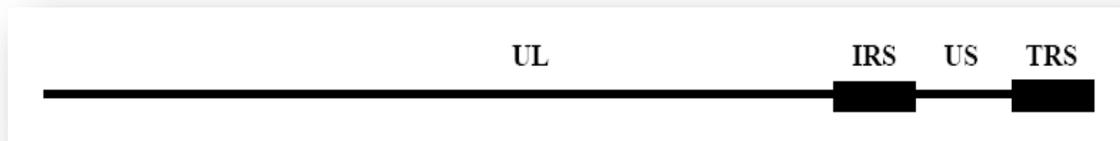


Figura 7– Organización genómica de los virus de la Subfamilia Alfaherpesvirinae.

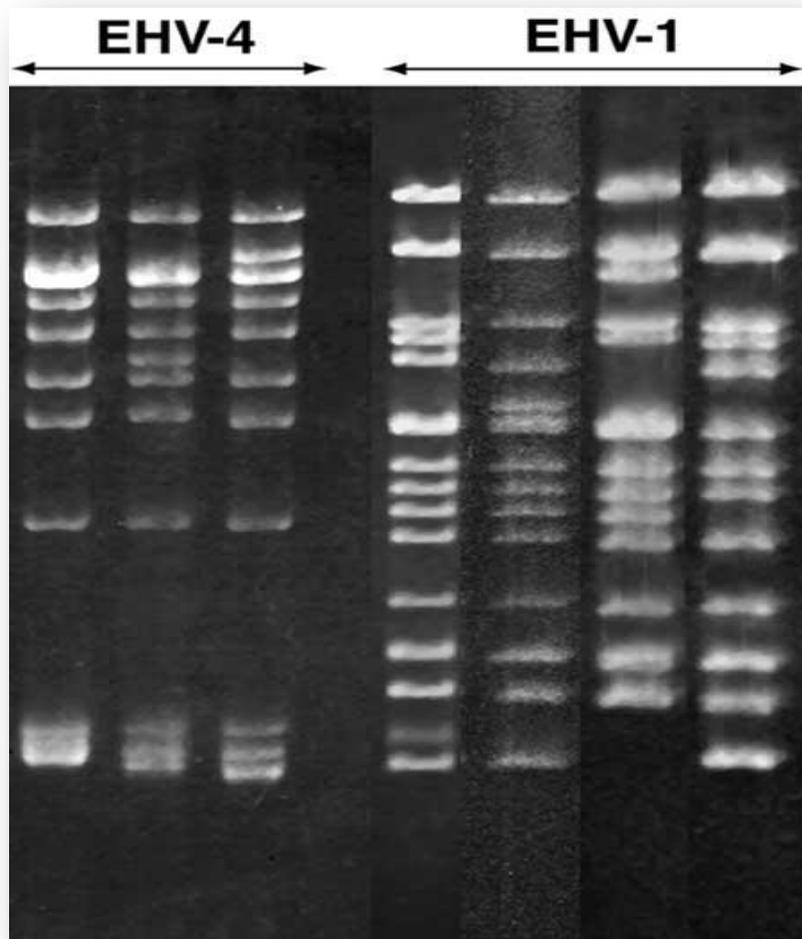


Figura 8- Perfiles electroforéticos en gel de agarosa de fragmentos de ADN de HVE-1 y HVE-4 generados por digestión con BAMHI. Reproducido de Referencia 151.

2.5 Antigenicidad

La diversidad antigénica también es limitada (152). Cada virus existe como un solo serotipo neutralizante. Los virus son antigénicamente estables y no exhiben los cambios graduales, continuos del epítotope de sus glicoproteínas superficiales, que es característico del VIE. Debido a que el reservorio biológico de los Herpesvirus en estado latente está excluido del reconocimiento por el sistema inmune del huésped, la selección inmunomediada de variantes antigénicas que ocurren espontáneamente, no es una actividad biológica significativa. La vigilancia virológica de nuevos aislamientos para detectar variantes antigénicas no es una actividad relevante para el control general de la enfermedad respiratoria del tracto superior causada por HVE.

La inducción de inmunidad protectora contra los Herpesvirus está asociada con una fuerte respuesta humoral e inmune celular tanto en los compartimentos mucosos sistémicos como respiratorio.

Las cuatro prioridades críticas que debe tener en cuenta el personal veterinario involucrado en el manejo y control de ETRS producidas por Herpesvirus son: a) Medidas eficaces de prevención, b) Diagnóstico rápido frente a un brote, c) Intervención terapéutica en los casos clínicos individuales, d) Control de la diseminación de la infección durante los brotes de la enfermedad.

2.6 Prevalencia de la enfermedad respiratoria

Pocas investigaciones se han realizado para evaluar el significado cuantitativo de HVE-1 o HVE-4 en ETRS (147, 157, 163). De los pocos estudios disponibles, se pueden alcanzar las siguientes conclusiones sobre la importancia de HVE-1 y HVE-4 como causas del cuadro clínico de ETRS en el equino:

- 1- La relativa importancia de los varios agentes etiológicos virales equinos responsables de ETRS (Herpesvirus, VIE, Rinovirus, Arteritis Equina, etc.) fluctúa ampliamente año tras año y depende de la situación geográfica y las características específicas de cada población equina (por ejemplo, edad, tamaño y densidad de la población, medio ambiente, estado de actividad, historia de vacunación y exposición, y manejo de los animales).
- 2- Ni la incidencia anual precisa (número de casos /1000 caballos) para ETRS por HVE-1 y HVE-4, ni la proporción exacta de casos clínicos totales de ETRS virales atribuibles a los dos Herpesvirus ha sido determinado en estudios sobre poblaciones definidas de equinos.
- 3- La ocurrencia de la enfermedad del tracto respiratoria por HVE-1 o HVE-4 en potros menores

de tres meses de edad es rara (particularmente en los potros de madres vacunadas), probablemente debido a la protección pasiva de los anticuerpos maternos.

4- La carga más pesada de ETRS causada por HVE-4 es llevada por los potrillos durante su primer año de vida; es decir como crías y al destete entre los 4 y 12 meses de edad. El HVE-4 es así un agente etiológico importante para los cuadros de la leve enfermedad respiratoria superior de los potrillos normalmente descrita como los "mocos del potrillo".

5- En sitios donde se llevan a cabo grandes operaciones de manejo de yeguas, la importancia relativa de HVE-4 como causa de ETRS también es significativa en caballos de un año de edad reunidos para actividades asociadas con las ventas anuales. Se puede esperar que aquellos caballos que escaparon a la infección de HVE-4 hasta el año de edad, presentaran episodios clínicamente más severos de enfermedad respiratoria.

6- En los caballos de dos a tres años de edad, en entrenamiento o en el circuito de competiciones, que se encuentran en estrecho contacto y confinamiento con otros animales de diversos orígenes, en espacios confinados como la pista de carreras o en la arena de eventos, es común que se presenten brotes de enfermedad respiratoria viral.

7- Epizootias de enfermedad respiratoria del tracto respiratorio superior por HVE-1 o HVE-4 se han descrito en tales situaciones, con algunos brotes que resultan en secuelas neurológicas. Cuantitativamente, los brotes causados por Herpesvirus generalmente ocupan el segundo lugar en importancia después del VIE, en el riesgo de producir ETRS agudo en caballos de 2 y 3 años de edad.

8- Los caballos mayores de 3 años de edad que ya han estado expuestos, continúan mostrando evidencia serológica de reinfecciones periódicas por el HVE-1 y HVE-4 a lo largo de sus vidas con sólo mínimos y transitorios signos clínicos de infección del tracto respiratorio. En tales animales, sin embargo, los riesgos de secuelas severas de aborto y/o enfermedad neurológica subsiguientes a la infección respiratoria sub clínica por HVE-1 no son eliminados.

2.7 Epizootiología

Tanto el HVE-1, como el HVE-4, son enzoóticos en la mayoría de las poblaciones de equinos domésticos. Se ha documentado la exposición generalizada en caballos adultos a HVE-4, demostrable por las proporciones altas de seropositividad (152) A la edad de 2 años, la mayoría de los caballos han seroconvertido a HVE-4 (164) La seroprevalencia es menor para HVE-1. Los dos Herpesvirus han evolucionado para ocupar un único nicho ecológico dentro del caballo, que

permite la persistencia viral después de la infección (latencia) sobre el curso de la vida del animal individual. El reservorio epizootológico para HVE-1 y HVE-4 es el gran y globalmente distribuido grupo de caballos portadores latentes que intermitentemente diseminan el virus, que pueden comprender aproximadamente la mitad de una población dada de equinos (165). El ciclo epizootológico de los dos Herpesvirus equinos es un ciclo continuamente repetitivo de tres eventos consecutivos que amplifican y mantienen la reserva del virus:

Transmisión intergeneracional (vertical) de los virus de madre infectada latente al potrillo;
El establecimiento de latencia viral pos-infección en los potros afectados; y, la reactivación periódica y diseminación del Herpesvirus latente para producir transmisión homogeneracional (horizontal) de virus de caballo a caballo (Fig. 9).

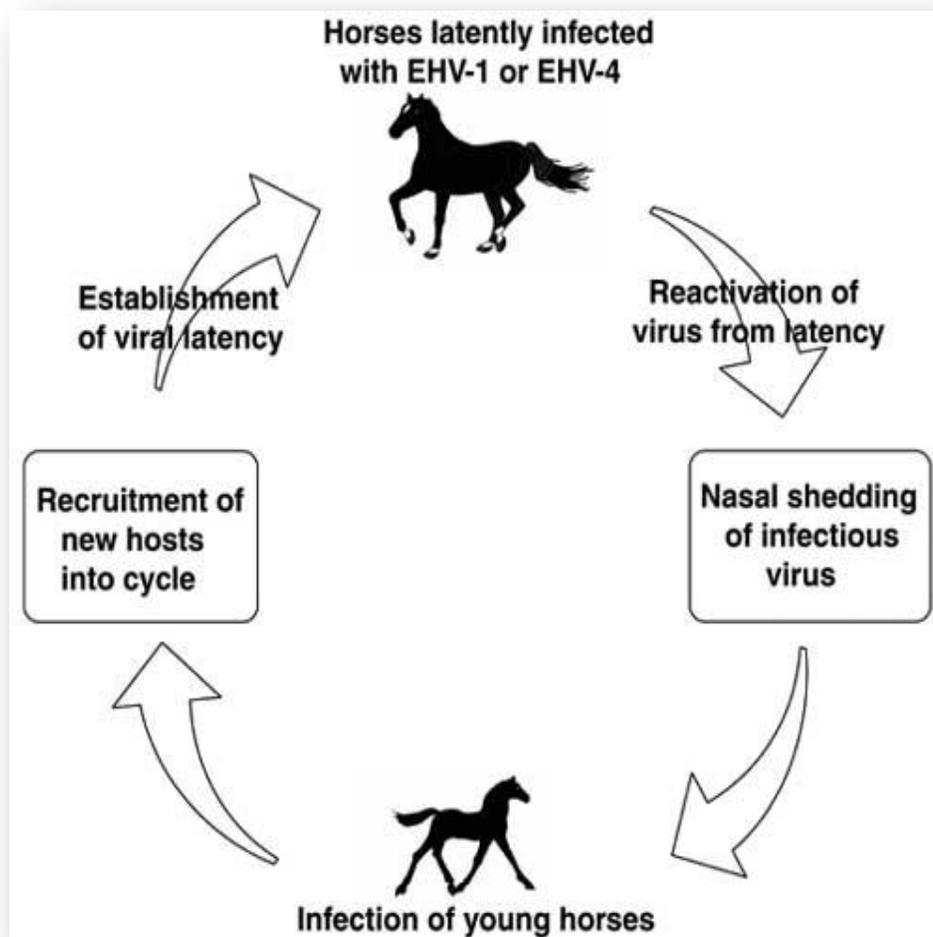


Figura 9- Ciclo de vida biológico de HVE-1 y HVE-4, ilustrando el papel central del caballo portador latentemente infectado como reservorio a partir de los cuales los Herpesvirus son transmitidos perpetuamente a las nuevas generaciones de huéspedes equinos.

Dentro de cada individuo equino, el ciclo de vida biológico de HVE-1 y HVE-4 puede describirse como un reservorio intrahuesped de virus replicativamente inactivo (latente) con episodios de reactivación durante el cual el virus infeccioso es eliminado del reservorio hacia las secreciones nasales con la oportunidad de transmitirse a los huéspedes equinos susceptibles. En este anciano patrón evolutivo cíclico del Herpesvirus equino: a) la infección, b) el establecimiento de latencia, c) la reactivación periódica fuera de la latencia, y d) la transmisión por vía respiratoria a nuevos huéspedes, la mayoría de los caballos son reclutados a temprana edad dentro del reservorio epizootiológico para HVE-1 y HVE-4. En este ciclo epizootiológico de HVE-1 y HVE-4, la transmisión es principalmente silenciosa, ya que la mayoría de los casos de la transmisión producen infecciones no aparentes del tracto respiratorias o signos clínicos tan leves que no causan alarma (164, 166, 168). Por lo dicho, los porcentajes de seroconversión para los dos Herpesvirus exceden la incidencia clínica de ETRS reconocible asociada con la infección viral. Es solamente el caso ocasional (o brote) de infección de la zona respiratoria al lado de los dos Herpesvirus equinos que se eleva sobre la actividad generalmente silenciosa de la transmisión para producir un nivel del daño del tejido dentro del tracto respiratorio suficientemente severo como para dar lugar a ETRS clínicamente declarada.

La enfermedad respiratoria causada por HVE-1 o HVE-4 está típicamente más ampliamente distribuida entre los caballos jóvenes, observándose la mayoría de los brotes en el período entre el destete y los 2 a 3 años de edad (150). Los factores de riesgo para estos brotes de ETRS causadas por Herpesvirus incluyen sobrepoblación, alta carga parasitaria, estado nutricional pobre, temperaturas climáticas extremas, enfermedades concurrentes, y la mezcla de animales pertenecientes a diferentes grupos sociales. La transmisión de la infección por HVE-1 y HVE-4 entre los caballos es altamente eficaz, y los brotes de enfermedad respiratoria pueden extenderse rápidamente en poblaciones equinas susceptibles. En algunos brotes de enfermedad respiratoria por Herpesvirus en zonas densamente poblados de caballos susceptibles, la morbilidad puede acercarse al 100%. El cuadro clínico más común para brotes de Rhinopneumonitis es una baja morbilidad con alto porcentaje de infección subclínica demostrada por la seroconversión al virus.

2.8 Latencia

El caballo infectado portador crónico es aquel donde el HVE-1 o HVE-4, (o ambos) persisten, posteriormente a la exposición, de manera no infecciosa más allá del período usual de recuperación de la infección aguda del tracto respiratorio. La proporción de portadores asintomáticos es alta, con aproximadamente un 60% de los caballos que se recuperan de la infección respiratoria primaria con los dos Herpesvirus, volviéndose portadores infectados latentes de por vida, capaces de servir como una fuente de infección para caballos susceptibles (165, 169). Los reservorios celulares para los virus latentes HVE-1 y HVE-4 son las neuronas sensitivas de los ganglios del trigémino y linfocitos T de los ganglios linfáticos que drenan al tracto respiratorio superior (por ejemplo, nódulos linfáticos submandibulares, retrofaríngeos y bronquiales) (170, 171). En estas células el genoma viral está presente sin la producción de partículas virales infecciosas. El genoma del Herpesvirus latente persiste en estado no integrado, transcripcionalmente restringido. Mientras que el estado infeccioso de HVE-1 y HVE-4 está expuesto a la fuerza total del control inmune del animal, en el Herpesvirus latente el virus está protegido del reconocimiento y destrucción por el sistema inmune y puede permanecer con el huésped de por vida, aun en presencia de una fuerte inmunidad adquirida.

El estado del portador latente es extremadamente importante para el mantenimiento y difusión del HVE-1 y HVE-4 y para su éxito como patógeno del caballo, diseminado y profundamente atrincherado. Dado que la latencia del Herpesvirus es un estado reversible, los genomas del virus latente pueden reactivarse para recobrar su plena actividad transcripcional con una producción consecuente de virus infeccioso. La reactivación periódica del HVE-1 y HVE-4 latente está asociada con episodios de estrés o administración de corticoides (172, 173). Los estímulos para la reactivación del Herpesvirus son diversos e incluyen cirugía, pensión, parto, transporte prolongado, destete, lactación, condiciones climáticas inclementes, y disrupción social. La reactivación del Herpesvirus latente puede ocurrir con ausencia de signos clínicos concurrentes. Se ha documentado la excreción de virus en el tracto respiratorio de caballos portadores, en quienes el virus latente se ha reactivado, y la excreción de virus reactivado hacia el moco respiratorio, no acompañado por signos clínicos (170).

2.9 Patogénesis

El tracto respiratorio es la vía natural de entrada para HVE-1 y HVE-4, y la mucosa del epitelio respiratorio es el tejido blanco primario para la infección (148, 174, 175). La infección respiratoria se transmite por el contacto físico estrecho con otro caballo que esté eliminando activamente el virus infeccioso en sus secreciones respiratorias. Los aerosoles infecciosos generados por expiraciones forzadas y rápidas (resoplidos) están formados por partículas con una alta carga viral. Estos aerosoles pueden expandirse por cortas distancias entre los establos o corrales. La eficacia de transmisión por el aerosol y la consecuente capacidad de difusión rápida de infecciones por Herpesvirus generalmente son menor que las que se observan con el VIE. La transmisión del virus por vía indirecta a través de la contaminación de personas (manos), alimento y bebederos, endoscopios, y otros fómites, también es posible.

El período de la incubación de la infección respiratoria después de la exposición natural al Herpesvirus toma entre 2 y 5 días. Los caballos infectados por primera vez pueden eliminar virus por períodos prolongados (hasta 14 días). El pico máximo de excreción viral sucede durante los primeros días después del comienzo de descarga nasal y coincide con la fase febril de la infección. La severidad de la enfermedad está influenciada por la historia previa de infección, el estado de salud, infecciones concurrentes, estrés, y variación de la virulencia de la cepa del Herpesvirus que está infectando.

La patología de ETRS causada por Herpesvirus se caracteriza, por lesiones focales, con destrucción y exfoliación del epitelio respiratorio nasofaríngeo (hasta la capa basal), un aumento de eliminación de secreciones glandulares respiratorias, y una respuesta inflamatoria vigorosa concomitante que incluye infiltración de células mono nucleares en la lámina propia por debajo del epitelio destruido (Fig. 10) (174, 176). Los signos respiratorios de HVE-1 o HVE-4 (descarga nasal y fiebre) comienzan por el efecto citopático del virus que produce destrucción del epitelio de las vías aéreas. Algunos potros pueden desarrollar lesiones pulmonares leves (177). Rápidamente, después de la replicación en el epitelio del tracto respiratorio superior, el virus es transportado por las células dendríticas migratorias y macrófagos a los ganglios linfáticos drenantes (Fig. 11) (178).

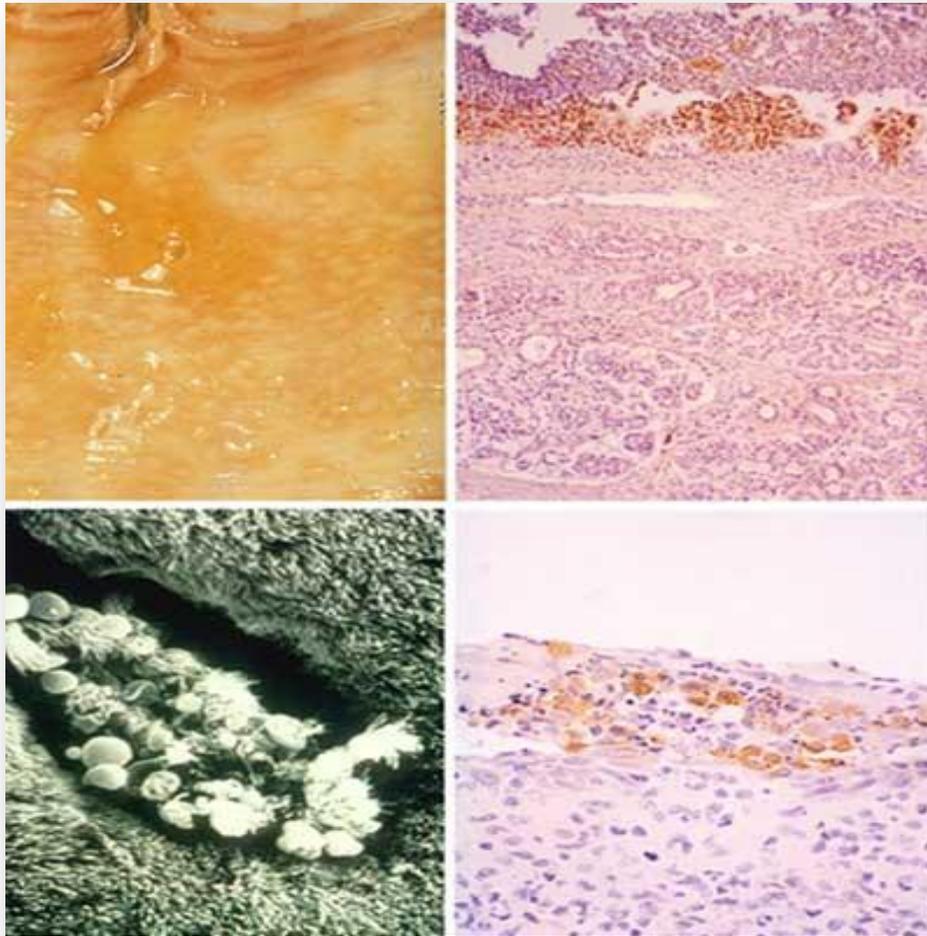


Figura 10 - Enfermedad respiratoria equina causada por HVE-1 o HVE-4 que demuestran las lesiones herpéticas vesiculares en el mucosa nasal (arriba-izquierda), destrucción focal de las células respiratorias epiteliales ciliadas (abajo izquierda), y la presencia de antígenos virales (coloración marrón) en las células del epitelio nasal (derecha). Reproducido de Referencia 175.

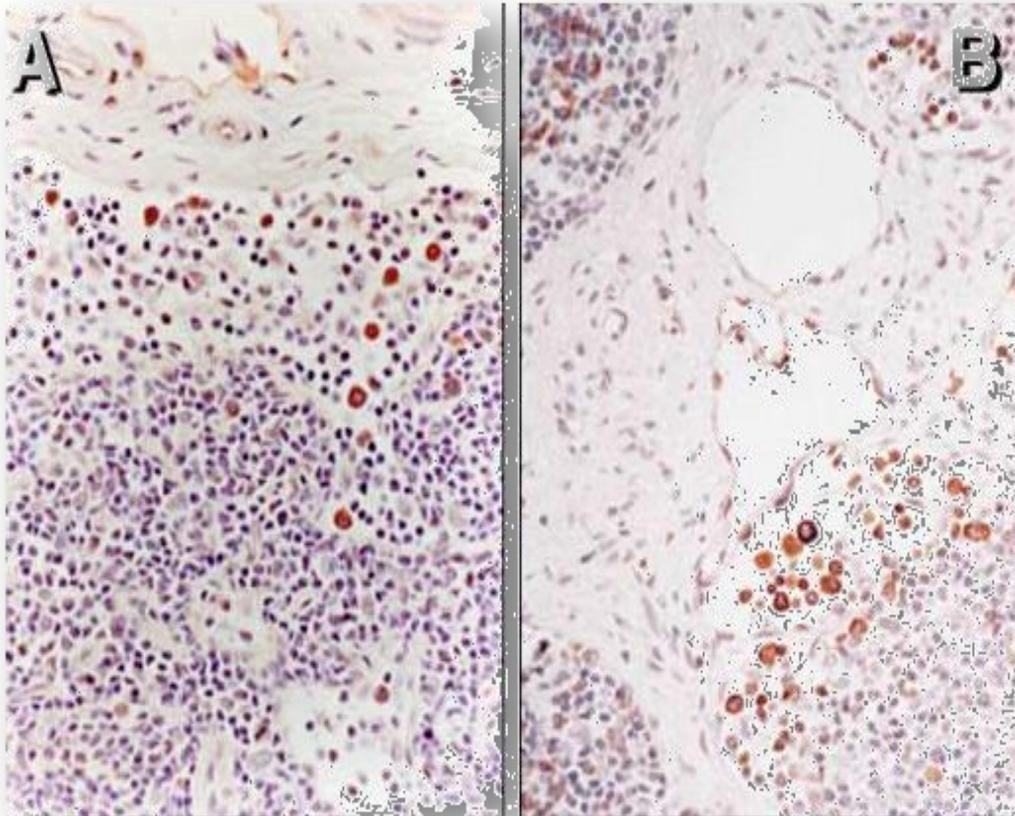


Figura 11- Técnica de coloración por inmunoperoxidasa para antígeno de HVE-1 en leucocitos mononucleares dentro del ganglio linfático submandibular de un caballo infectado. Los linfocitos que contienen al antígeno viral están presentes en el seno subcapsular (A), el seno medular (B), y dentro del parénquima de la corteza (A) del ganglio linfático. Reproducido de Referencia 175.

La infección de leucocitos mono nucleares dentro los ganglios linfáticos resultan en una viremia asociada a los leucocitos, que puede persistir durante varios días. Con HVE-1 en particular, la difusión viral a otras vísceras es común y a menudo da lugar a una infección ampliamente difundida de las células de los endotelios vasculares. Esta vasculitis en los vasos sanguíneos del sistema nervioso central o del útero grávido es la base la patogenia de las secuelas posteriores a cuadros respiratorios por HVE-1, ya sea de aborto o de enfermedad neurológica (152, 174).

2.10 Presentación clínica

La enfermedad ETRS por HVE-1 o HVE-4 si no presenta complicaciones se desarrolla con rinitis aguda y faringitis, con la posibilidad de extenderse a las vías respiratorias más distales causando traqueo bronquitis, bronquiolitis, y/o pulmonitis (148, 149, 152, 176). Los cuadros clínicos se presentan con mucha variación entre los distintos individuos y puede ir desde cuadros de enfermedad no aparente hasta la pulmonía viral primaria, que pueden comprometer la vida del animal.

El cuadro clínico característico y más constante de ETRS HVE es la presencia de descarga nasal bilateral (152) En las fases tempranas de infección, la descarga nasal es acuosa, escurre libremente y frecuentemente pasa inadvertida por el personal. Las secreciones claras (cerosas) contienen altos títulos de virus infecciosos. A medida que la infección progresa, el aspecto de la descarga nasal cambia rápidamente (entre el segundo y tercer día) pasando de ser acuosa a un estado mucilaginoso más denso, de color blanquecino, con presencia de células epiteliales de descamación y leucocitos inflamatorios.

Las secreciones nasales viscosas se secan a menudo formando incrustaciones fácilmente reconocibles en y alrededor de los orificios nasales del caballo afectado. La infección bacteriana secundaria que se puede producir a los 4 -5 días después del ataque clínico, cambia las características del exudado nasal que se vuelve más espeso, más opaco y amarillento (mucopurulento).

Otras manifestaciones clínicas, variablemente asociadas con la infección respiratoria por HVE, incluyen pirexia, linfadenopatía submandibular, conjuntivitis que se manifiesta con una descarga ocular leve, letargo y anorexia. La fiebre puede oscilar desde leve hasta temperaturas de 41° C. En todos los casos, salvo los severos, el apetito se mantiene normal durante la infección. Ocasionalmente, se pueden presentar signos clínicos por el compromiso del sistema respiratorio inferior, debido a complicaciones por infección viral o bacteriana (o ambos), observándose tos,

sonidos anormales a la auscultación, esfuerzo respiratorio aumentado, etc.

El comienzo de la enfermedad respiratoria asociada con la infección por HVE-1 o HVE-4 es abrupto y sigue un curso agudo. Los signos clínicos son muy intensos y la excreción viral es más abundante durante los primeros días de infección. En los casos de HVE, ETRS que no presenten complicaciones, el pronóstico es bueno para la recuperación plena, la resolución espontánea de los signos clínicos sucede hacia fines de la segunda semana, y los porcentajes de mortalidad son bajos. Las infecciones bacterianas secundarias severas pueden prolongar la enfermedad y pueden comprometer el pronóstico de supervivencia.

El análisis de hematológico de caballos con ETRS producida por Herpesvirus normalmente revela una leucopenia mixta (neutropenia y linfopenia) durante varios días posteriores al comienzo de los signos clínicos. En casos complicados por infección bacteriana, leucocitosis neutrofílica e hiperfibrinogenemia pueden seguir a la leucopenia inicial asociada con la infección viral (179).

Los caballos afectados severamente con la enfermedad respiratoria por el Herpesvirus son comúnmente observados en brotes que involucran a animales destetados y de un año sin antecedentes previos de exposición al virus y en los que sus anticuerpos maternos ya han declinado a niveles no detectables. Las infecciones subsecuentes con los Herpesvirus son generalmente más transitorias y clínicamente menos severas. Después de múltiples infecciones por HVE-1 o HVE-4 en un caballo, los resultados de la re-exposición solo producen infecciones del tracto respiratorio, clínicamente no detectables. La enfermedad respiratoria con signos clínicos manifiestos, debido a HVE-1 o HVE-4, es por consiguiente rara en los caballos adultos totalmente maduros. La enfermedad respiratoria causada por HVE-1 o HVE-4 no es totalmente distinta, desde el punto de vista clínico, de los cuadros producidos por otros patógenos respiratorios virales del caballo. Igualmente, los casos de ETRS causados por HVE-1 y HVE-4 son clínicamente y patológicamente indistinguibles, requiriendo de los procedimientos auxiliares de laboratorio para la diferenciación diagnóstica.

2.11 Complicaciones y secuelas

El daño causado por los Herpesvirus a la barrera protectora de la mucosa respiratoria predispone a los caballos afectados a las infecciones bacterianas oportunistas. Como resultado, la rinofaringitis bacteriana secundaria (principalmente por el *Streptococcus equi zooepidemicus*) normalmente acompaña a la ETRS por HVE y contribuye a la severidad total de la enfermedad. En ausencia de terapia antibiótica apropiada, las vías aéreas inferiores involucradas (con el desarrollo consecuente de traqueo bronquitis bacteriana, bronquiolitis, o pulmonía) puede complicar aún más el cuadro primario de ETRS iniciado por HVE-1 o HVE-4. La invasión secundaria con cepas de *S. equi zooepidemicus* derivadas de clonación con una virulencia exacerbada pueden influir dramáticamente en la severidad y duración de la enfermedad y puede asociarse con los niveles aumentados de morbilidad y los riesgos mayores de mortalidad.

Mientras HVE-4 es un patógeno del tracto respiratorio cuya replicación se restringe ordinariamente la mucosa del epitelio del aparato respiratorio superior y al tejido linfoide regional, las consecuencias potenciales para la salud por la infección de HVE-1 se extienden más allá del tracto respiratorio. HVE-1 tiene el potencial para causar enfermedades más serias e invasoras involucrando a los órganos de otros sistemas. Incluso en la ausencia de signos claros de enfermedad respiratoria, la infección por HVE-1 (y raramente también por HVE-4) puede conducir al riesgo de cinco secuelas clínicas importantes (aborto, mortalidad neonatal, mieloencefalopatía, infección pulmonar vasculotrópica, y enfermedad ocular). Existen cepas altamente virulentas (hipervirulentas) de HVE-1 que poseen la capacidad de causar una alta tasa de ataque de estas secuelas clínicas (175, 181).

Aborto - Aborto a finales de la gestación como resultado de la diseminación viral al feto que sigue la infección respiratoria con HVE-1, en yeguas preñadas se ha reconocido durante muchos años como una de las principales causas de pérdidas de fetos equinos. Muchas ocurrencias de aborto asociadas con la infección de HVE-1 involucran solamente una o dos yeguas en un grupo. Sin embargo, la enfermedad epidémica causante de abortos cobra altos porcentajes de pérdidas de potros. La infección por HVE-1 del tracto respiratorio de la yegua que precede el aborto por Herpesvirus, normalmente es asintomática. Aquellas yeguas preñadas con fetos infectados con HVE-1 abortan rápidamente sin signos inminentes y aparte del evento del aborto, son clínicamente normales. Su eficacia reproductiva subsiguiente no está comprometida. El feto abortado que se presenta sin descomposición pos mortem, se muere de anoxia durante la rápida separación progresiva de la placenta y el endometrio que precede inmediatamente al evento de expulsión. El feto abortado posee altos niveles de virus y muestra evidencia extensa histopatológica de infección

en múltiples órganos. Abortos causados por HVE-4 también existen, pero con una frecuencia mucho menor que la asociada con la infección de HVE-1.

Mortalidad neonatal. Los fetos infectados con HVE-1 durante la gestación tardía pueden llegar a nacer vivos a término pero enfermos al nacimiento o uno a dos días después del parto (182, 185). Los potros están débiles, no se alimentan, se tornan letárgicos, tienen fiebre, presentan hipoxia, y problemas respiratorios severos. El deterioro clínico en los potros infectados en el útero con HVE-1 ocurre rápidamente, y el pronóstico es siempre grave. La mortalidad en los potros congénitamente infectados se acerca al 100%, ya que la neumonía viral lleva a la falla respiratoria pocos días después. Los potros son muy susceptibles a la enfermedad bacteriana secundaria. La progresión y el resultado de la enfermedad no son modificados por el cuidado intensivo en la lactancia, y la terapia antiviral exitosa con análogos de nucleótidos acíclicos sólo se ha informado en pocas ocasiones. La infección de HVE-1 congénita puede ser epizootica y puede ocurrir en asociación con un brote de abortos por HVE-1. Excepcionalmente, HVE-4 también puede causar enfermedad neonatal similar a la causada por HVE-1 (186).

La Mieloencefalopatía está ampliamente reconocida como una posible secuela clínica de la infección del tracto respiratorio por HVE-1, la mieloencefalopatía por Herpesvirus equino es una enfermedad rara pero devastadora (187, 188). Casos aislados de enfermedad neurológica producidos por HVE-4 también se han identificado (189, 190). El intervalo entre la infección inicial del tracto respiratorio por el Herpesvirus y el comienzo de los signos neurológicos es 6 a 10 días. Aunque los signos neurológicos son variables, la manifestación clínica más común de la enfermedad es ataxia de miembros posteriores que puede progresar a recumbencia. Los problemas neurológicos son el resultado de vasculitis isquémica, trombocítica presente en los pequeños vasos sanguíneos del sistema nervioso central. Los signos neurológicos aparecen de repente, llegan a su intensidad máxima dentro de 2 a 3 días y generalmente no son progresivos. El pronóstico para los caballos no recumbentes es favorable, pero no lo es para los animales que permanecen recumbentes por períodos mayores de 2 días.

En cuanto a la infección pulmonar vasculotrópica, se ha informado de varios casos de enfermedad hiperaguda, generalizada, tras las infecciones respiratorias causadas por HVE-1 en caballos adultos jóvenes (191). El nuevo síndrome, denominado "infección vasculotrópica pulmonar por HVE-1", se caracteriza por fiebre alta, anorexia, severa depresión, respiración forzada y mortalidad elevada. No hay signos neurológicos. Los caballos afectados pueden encontrarse muertos. El inicio de la condición signos es súbito, y su curso de progresión a la muerte es rápido. El hallazgo dominante en la necropsia es una vasculitis multisistémica, particularmente prominente en los pequeños vasos sanguíneos de los pulmones.

Enfermedad ocular - Las infecciones del tracto respiratorio en potros asociados con cepas hipervirulentas de HVE-1 pueden estar acompañadas por enfermedad ocular seria, que se manifiesta como uveítis y/o corioretinitis (192) En los casos más severos se han observado destrucción extensa de la retina y ceguera. Potros lactantes hijos de yeguas involucradas en brotes de con alta proporción de enfermedad neurológica de HVE-1, parecen presentar mayor riesgo para esta secuela de la infección respiratoria por HVE-1 (186).

2.12 Diagnóstico

2.12.1 Detección de Antígenos

La identificación rápida, inequívoca del agente etiológico de un brote de ETRS dentro de un grupo de caballos es esencial para ayudar al personal veterinario a tomar las decisiones del tratamiento y planear las estrategias para controlar la diseminación epizootica de la infección. Los diagnósticos diferenciales claves para ETRS viral en el caballo incluyen, además de HVE-1 y HVE-4, VIE, Adenovirus, Rinovirus y Arteritis Equina. Dado que los signos clínicos solos no son suficientes para diferenciar a los Herpesvirus de otras causas comunes de ETRS equina, pruebas de laboratorio son necesarias para realizar el diagnóstico. La confirmación del diagnóstico de ETRS por Herpesvirus está basada en demostrar la presencia de HVE-1 o HVE-4 en secreciones nasofaríngeas o en los leucocitos de sangre venosa de los caballos afectados.

El éxito de diagnóstico de laboratorio para HVE-1 y HVE-4 se ve influenciado por las técnicas utilizadas para la colección, manejo, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras clínicas. El éxito aumenta cuando se toman las muestras de mucosidades nasales dentro de las 48 horas del comienzo de la enfermedad cuando el caballo todavía presenta fiebre y una descarga nasal cerosa. Las muestras de secreciones respiratorias se obtienen con un hisopo de algodón (por ejemplo, un hisopo uterino) que se inserta a través del meato nasal ventral, avanzando por la nasofaringe. Los hisopos deben ponerse en un medio de transporte fluido que contiene antibióticos y deben conservarse en hielo para conservar la viabilidad del virus para inoculación y cultivo de tejidos. Por lo menos 20 ml de sangre venosa debe colectarse para intentar el aislamiento del virus y debe transportarse al laboratorio refrigerado, más no congelado. El período óptimo para lograr el aislamiento del virus en la sangre es entre 4 a 10 días después del comienzo de la enfermedad respiratoria. El transporte rápido al laboratorio y el procesamiento inmediato también es

importante para el éxito del diagnóstico de laboratorio de infecciones por HVE-1 y HVE-4.

Los métodos disponibles en el diagnóstico de laboratorio para Herpesvirus, incluyen el aislamiento del virus, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Inmunofluorescencia para detección de antígenos virales, y pruebas serológicas (209). La prueba del laboratorio para HVE-1 o HVE-4 que brinda los mejores resultados, es el aislamiento del virus de secreciones nasofaríngeas o de los leucocitos sanguíneos, después de su inoculación en monocapas de cultivos celulares susceptibles. Los efectos citopáticos de HVE-1 y HVE-4 son característicos, y puede hacerse identificación serológica de los dos Herpesvirus con anticuerpos monoclonales tipo específicos (210). Los procedimientos normales tienen la desventaja de necesitar varios días para obtener resultados, lo que los hace de menor utilidad para el clínico.

La amplificación de ADN viral mediante PCR es un ensayo rápido, sensible y utilizado con más frecuencia para la detección de la infección del tracto respiratorio por HVE-1 o HVE-4 (211, 214). Pueden procesarse en PCR para detección de Herpesvirus las mismas muestras utilizadas para el aislamiento viral.

Los métodos de detección de antígeno también existen para el diagnóstico rápido de HVE-1 y HVE-4 directamente del material clínico. Pueden colorearse células de las secreciones nasofaríngeas usando anticuerpos inmunofluorescentes que revelan la presencia de los antígenos de Herpesvirus. Cuando se usan los métodos de detección directos de antígeno para un diagnóstico rápido de laboratorio de HVE-1 o HVE-4, es importante confirmarlos por el aislamiento del virus.

2.12.2 Detección de Anticuerpos

Muestras de suero apareadas se requieren para el diagnóstico serológico confiable de infección por el Herpesvirus equino (215). La muestra de suero agudo debe obtenerse dentro de los 2 - 3 días del comienzo de la enfermedad, y la muestra convaleciente aproximadamente 3 semanas después. Un resultado positivo es un incremento en cuatro diluciones o mayor en el título de anticuerpos específicos contra el virus entre las muestras de suero del estado agudo y convaleciente. Debido a que el anticuerpo inducido por la vacunación puede confundir la interpretación de resultados serológicos, la historia de la vacunación del animal debe tenerse en cuenta para asegurar que la seroconversión refleje la infección en lugar de una reciente vacunación por Herpesvirus. En una sola muestra de suero, la prueba de la fijación de complemento, Seroneutralización in Vitro (SN) o ELISA de IgM pueden proporcionar evidencia de una reciente infección por HVE-1 o HVE-4 (185).

La identificación ante mortem de caballos portadores crónicos infectados latentemente con HVE-1 o HVE-4 es difícil; ya que no hay presencia de virus infeccioso, ni antígenos virales, y los signos clínicos no están presentes.

2.13 Tratamiento individual y Control de brotes

En un brote de ETRS por Herpesvirus dentro de una población de caballos susceptibles, la infección a menudo se extiende rápidamente, la proporción del ataque puede ser alta y se pueden observar consecuencias económicas significativas así como sobre el bienestar de los animales. La intervención inmediata con medidas de control de enfermedades infecciosas se requiere para la contención exitosa de la infección en su foco original y la reducción del impacto negativo de la epizootia. La prioridad para el manejo de un brote activo de Rhinopneumonitis Equina es la prevención de la diseminación del virus de los caballos inicialmente infectados a otros miembros del grupo y más allá del grupo afectado a los caballos cercanos ya sea dentro o fuera del establecimiento. La aplicación de las prácticas de aislamiento, cuarentena y desinfección son los puntos cruciales en el manejo del brote (196, 212).

Los animales clínicamente enfermos deben retirarse de su grupo residente, aislándolos del resto de la población, hasta que el peligro de transmitir la infección haya pasado. Una zona vacía, con espacio suficiente para evitar la transmisión por aerosol del virus, debe rodear el área de aislamiento. El tránsito innecesario de personal o caballos deben restringirse al máximo en el área

de aislamiento. El personal que atiende a los caballos puesto en el aislamiento debe instruirse sobre los procedimientos específicos a ser usados para controlar el la diseminación de la infección. Estos individuos deben usar ropa exterior de protección, guantes de látex desechables, y calzado sumergible en desinfectante, los cuales debe quitarse al dejar el área de aislamiento. El lavado frecuente de las manos y el uso de desinfectantes son beneficiosos para minimizar la contaminación de Herpesvirus por vía de fómites contaminados. Preferiblemente, el personal encargado de los animales en aislamiento, solo atenderá ese grupo. La diseminación indirecta del virus del foco de infección por objetos inanimados contaminados puede prevenirse por la limpieza completa con detergente y agua seguidas por una desinfección vigorosa con el compuestos fenólicos o iodóforos para inactivar al virus presente en las superficies contaminadas (manos, calzado o ropa del personal encargado del cuidado del animal, sogas, silla, freno, mordida, cubos de agua o alimento; paja para cama; utensilios de cuidado y de limpieza del establo, los instrumentos de uso veterinario; etc.). Una revacunación dada a los caballos no expuestos, susceptibles, para montar una barrera inmune alrededor del brote infeccioso, también puede ayudar a reducir el brote.

Todos los caballos en contacto físico o que compartan instalaciones con animales clínicamente afectados (incluyendo aquellos en los potreros adyacentes, establos, áreas de tratamiento, etc.) deben ser considerados como expuestos al virus, y deben permanecer confinados en sus respectivos establos o potreros, y deben ser puestos bajo una cuarentena con movimientos restringidos. La reagrupación y mezcla de caballos que estuvieron en contacto, durante un brote activo de ETRS por Herpesvirus crea un gran riesgo de transmisión del virus infeccioso entre grupos adicionales de caballos. El movimiento de caballos dentro y hacia fuera del establecimiento afectado debe restringirse hasta que el brote haya finalizado. Un brote de ETRS por Herpesvirus puede ser considerado de haber finalizado, cuando pasan 21 días sin la ocurrencia de nuevos casos clínicos. Acabado el brote, el área usada para el aislamiento, debe limpiarse completamente y desinfectarse. La viabilidad del Herpesvirus fuera del cuerpo del caballo es bastante pasajera, por lo que, despoblando el área por un período de 21 días, puede ser considerada segura para repoblar con caballos sin el riesgo de infección.

2.14 Prevención

La eliminación del Herpesvirus equino de las manadas es virtualmente imposible debido a la característica del estado portador. La prevención de la enfermedad, en lugar de enfocar los

esfuerzos a la erradicación o el tratamiento de la enfermedad, ofrece el medio más eficaz para controlar la ETRS causada por Herpesvirus y sus posibles secuelas. Las estrategias dirigidas a reducir el impacto económico y del bienestar asociadas con las infecciones respiratorias por HVE-1 y HVE-4, incluyen la inmunización profiláctica y la aplicación de prácticas de manejo preventivas.

La Vacunación contra la enfermedad respiratoria causada por HVE-1 y HVE-4 se recomienda como la parte del programa preventivo, para todos los caballos bajo riesgo de adquirir la infección (199, 200). Virtualmente todos los potros tienen títulos de anticuerpos específicos para HVE-1 y HVE-4 que se pueden medir después de la ingestión del calostro de la madre. Los anticuerpos maternos para HVE-1 y HVE-4 decaen exponencialmente con una vida media de 26 días. Los potros se vuelven seronegativos y por consiguiente totalmente susceptibles a la infección a los 5 - 6 meses de edad. Deben administrarse vacunaciones y subsecuentes revacunaciones, por consiguiente para proporcionar un nivel máximo de protección inmune al potrillo joven, para prepararlo al estrés asociado con el destete, el transporte, reagrupación, la introducción en nuevos grupos sociales, ventas, entrenamiento y competencias. Un esquema razonable de vacunación para ETRS por Herpesvirus es, dos dosis por vía intramuscular a intervalos de 3 semanas justo antes del destete, con revacunación con una dosis simple cada 3 a 6 meses (dependiendo del nivel de riesgo) posteriormente, mientras el caballo está entrenando, corriendo, o asistiendo a eventos. Se obtienen títulos de anticuerpos mayores cuando la dosis primaria de vacuna se retrasa hasta que los potros cumplan cinco meses de edad (201). En los grupos grandes de animales, el logro de una cobertura de vacunación alta puede ayudar a reducir la diseminación de infección debido a los beneficios agregados de inmunidad poblacional. Las yeguas preñadas deben inmunizarse siguiendo las instrucciones del fabricante, con un producto que haya demostrado por los estudios de vacunación y desafío, ser eficaz previniendo el aborto de HVE-1 (202, 203). Ninguna vacuna actual ha demostrado ser eficaz para proteger contra la manifestación nerviosa causada por la infección del Herpesvirus. Actualmente están disponibles vacunas inactivadas y a virus vivo atenuado.

Todas las vacunas comercializadas en la actualidad para Rhinopneumonitis Equina están indicadas para la administración intramuscular. Vacunas combinadas que contienen VIE y los dos Herpesvirus están disponibles para su uso. Para evitar cualquier efecto adverso de aparición de reacciones locales por la vacunación (inflamación, dolor muscular y letargo) en su desempeño en la competencia, no deben aplicarse las vacunaciones 7 a 10 días antes de un evento deportivo. La vacunación de potrillos jóvenes no previene la infección respiratoria, pero disminuye la intensidad de los signos clínicos y la magnitud y duración de la excreción de virus infeccioso. El estado de portador latente, tampoco es prevenido por la vacunación. Por consiguiente, la meta actual de la vacunación para la ETRS por Herpesvirus es la disminución de la severidad de la enfermedad

respiratoria y reducción de la difusión de la infección dentro de la población. Debido a que la inmunidad a HVE-1 y HVE-4 generada por la vacunación es de corta duración, revacunaciones frecuentes son necesarias para la eficiencia máxima. El desarrollo de una vacuna más eficaz para la enfermedad respiratoria por el Herpesvirus en equinos jóvenes es claramente una prioridad.

Aunque hay controversia en la literatura en materia de protección cruzada entre HVE-1 y HVE-4, y algunos informes reclaman protección cruzada unilateral (211), está generalmente aceptado que a fin de maximizar la respuesta inmune al HVE, las vacunas deben contener los dos subtipos. El HVE-4 es genéticamente más estable, mientras que han sido identificados dos tipos (1P y 1B) para HVE-1. Allen et al. (212) reportaron un repentino aumento del tipo 1B a principios de la década de los ochenta en Kentucky. Recientes estudios en Europa han demostrado que la mayoría de los HVE-1 aislados todavía pertenecen a la variante de 1P (213, 214). El impacto de la variación de la tensión en rendimiento de la vacuna no ha sido claramente establecido. Los programas de control se basan en vacunación y prácticas de gestión destinadas a reducir el riesgo de introducción del virus y su transmisión a poblaciones de caballos susceptibles.

2.15 Las vacunas actuales

El objetivo de la vacunación contra HVE-1 y HVE-4 es proteger a los caballos frente a la enfermedad de las vías respiratorias y evitar el aborto. Las primeras vacunas contenían preparados de HVE-1 inactivado a partir de tejidos de potros o hámster infectados (215, 216), pero se abandonó el uso de estas vacunas a causa de pobre inmunogenicidad y reacciones adversas locales y sistémicas.

Posteriormente, Doll et al. (217) desarrollaron una vacuna viva modificada contra HVE con administración intranasal. La vacuna contiene un HVE-1 adaptado al hámster y se utilizó en un "programa de control de infecciones para la inmunización de yeguas contra el aborto". Se recomienda utilizar esta vacuna durante las primeras etapas del embarazo, ya que contiene virulencia residual que podría causar un aborto si se administra más adelante durante la gestación. La vacuna se utilizó hasta la aparición y disposición de vacunas derivadas de cultivo de tejidos, incluyendo las vacunas inactivadas y vivas modificadas. Mayr y col. (218) desarrollaron una vacuna viva modificada contra HVE-1 derivada de la cepa cultivada en células de riñón de embriones de porcino (Rach). Un completo análisis molecular reveló que la supresión del gen 67 es responsable de su atenuación (219). El trabajo de Jessett et al. (220) ha renovado el interés en esta vacuna que ha sido ampliamente utilizada durante muchos años en Alemania. Tres dosis de la vacuna

proporcionan muy alto nivel de protección contra la enfermedad clínica y casi elimina la viremia después de la infección. Estos resultados difieren con informes anteriores sobre la eficacia de esta vacuna en la prevención de la viremia y el aborto (221, 222). Los informes sobre el uso de la vacuna sugieren una buena seguridad, aunque la vacuna es potencialmente patógena para el feto equino, como se demostró después de la inoculación intra-uterina de la cepa de la vacuna (223). Entre otras, la vacuna viva contra HVE-1 producida en células VERO tuvo que ser retirada del mercado después de estar asociada con mieloencefalitis pos vacunal (224). Recientemente, un mutante sensible a la temperatura de una cepa de HVE-1 fue evaluada por su capacidad de proteger a los caballos contra la infección de las vías respiratorias y la viremia siguiente a la infección desafío (225). Varias vacunas inactivadas han probado su eficacia en modelos experimentales para equinos. Thomson et al. (226) demostraron que un HVE-1 parcialmente purificado, inactivado con formaldehído y combinado con adyuvante produce buenas respuestas humorales a HVE-1, pero no a HVE-4. La vacunación con un carbomero inactivado con adyuvante en una vacuna HVE-1/HVE-4, parcialmente protegió los ponis testeados contra la enfermedad clínica y la excreción del virus tras un desafío con HVE-1 y HVE-4 (227). Tres dosis de la vacuna protegieron significativamente a yeguas preñadas contra el aborto, aunque no se impidió la viremia tras el desafío (228). Aunque un adyuvante oleoso en una vacuna a virus inactivado redujo la incidencia de abortos en Kentucky después de su lanzamiento, la vacuna no protegió contra el aborto en un modelo de provocación experimental (229). Ninguna protección se ha podido demostrar con una vacuna experimental ISCOM de HVE-1, a pesar de los altos niveles de neutralización de anticuerpos por la técnica de Seroneutralización in Vitro (SN) en el momento de desafío (230). Vacunas inactivadas contra HVE, en general, no ofrecen protección a largo plazo contra el desafío de virus, aunque brinda 6 meses de inmunidad contra la enfermedad clínica, hecho demostrado con una vacuna inactivada con carbomero sin adyuvante (231).

Los resultados de estos estudios mostraron que las vacunas inactivadas convencionales de HVE brindan protección clínica y virológica parcial contra las infecciones respiratorias con HVE-1 o HVE-4, y no impiden la viremia asociada ni protegen completamente contra el aborto. Las variaciones en los resultados sobre la protección obtenida en los diferentes estudios, pueden ser el resultado de la utilización de yeguas en distintas etapas del embarazo o puede estar relacionado con diferencias entre las razas.

Estrategias de vacunación

La vacuna ideal de HVE debe proteger contra las infecciones respiratorias y evitar la aparición de viremia en la infección. Las estrategias de vacunación contra HVE que tienen como único propósito estimular la respuesta de anticuerpos sistémicos, ciertamente no consiguen estimular el sistema inmunológico (232). Los esfuerzos futuros en el desarrollo de vacunas deben incluir investigaciones en la estimulación de la respuesta de mucosas y potenciar la respuesta inmune celular. Las vacunas recombinantes, incluidas las mutantes con supresión de genes, vectores y vacunas de ADN, se espera que puedan generar este tipo de respuestas inmunes, y de varias vacunas experimentales se ha evaluado su protección contra el HVE.

Una cepa de HVE con el gen gE / gI deletado fue considerado seguro para los caballos, pero brindó protección parcial contra un desafío con HVE-1 (233). Una vacuna experimental basada en un mutante timidina quinasa-negativos (CT), no previno la viremia después del desafío con HVE-1 (234, 235). Una vacuna canarypox de HVE recombinante que contiene los genes gG, gC y gD de HVE-1, redujo significativamente la excreción del virus tras el desafío, pero no protegió contra la viremia asociada (236).

Los resultados de esos estudios indican claramente que para el Herpesvirus, se necesitan más investigaciones que identifiquen los antígenos inmunodominantes y su interacción con el sistema inmunológico. La investigación ha comenzado para abordar esta cuestión (237). Además, poco se sabe acerca de los genes de virulencia de HVE, que podrían ser candidatos para las supresiones específicas, a fin de desarrollar vacunas seguras y eficaces. La mayoría de los conocimientos de la función de las proteínas de diferentes HVE proviene de experimentos en modelos de roedores, que no necesariamente son relevantes para el caballo. De momento, el potencial real de las vacunas candidatas, debe ser probado en los modelos actuales de equinos, una tarea difícil en vista de la dificultad de encontrar equinos seronegativos a HVE.

2.16 Estrategias de manejo preventivo

Las recomendaciones de manejo están basadas en las prácticas de a) la segregación de caballos en los establecimientos en grupos pequeños, b) el manejo de cada grupo como una unidad aislada, y c) la reducción del estrés. Una estrategia eficaz para reducir el riesgo de brotes a gran escala de ETRS por HVE-1 o HVE-4, que afecte a un gran porcentaje de la población, es la subdivisión de la

población equina a riesgo en los establecimientos en grupos más pequeños y el mantenimiento de estos grupos como unidades cerradas, físicamente separadas. Para la máxima eficacia, el tamaño de cada grupo debe ser tan pequeño como los medios físicos razonablemente lo permitirán, manteniendo a cada grupo bajo condiciones que limiten la transmisión de virus entre los ellos. Los grupos se formarán agrupando a los animales por edad, estado de la gestación, actividad, y frecuencia de cambio de animales individuales. Deben ponerse restricciones en el movimiento de caballos dentro y fuera de los grupos establecidos, y particularmente debe evitarse el contacto con caballos transeúntes.

El peligro mayor para introducir la infección del Herpesvirus exógena está en la introducción de caballos nuevos en los grupos establecidos, sobre todo aquellos que han tenido recientes oportunidades de estar expuestos a la infección, en exposiciones o reuniones grandes, entremezclados con gran número de caballos de diversas fuentes (ventas, concursos hípicas, los establos, hipódromos, competiciones, centros de entrenamiento, etc.). La introducción de cualquier caballo nuevo en un grupo cerrado debe precederse por un período de 21 días de aislamiento. Un caballo temporalmente removido de un grupo para propósitos que pueden incluir transportes prolongados o su contacto con otros caballos (servicio exhibiciones, entrenamiento, tratamiento veterinario, ventas, etc.) también debe pasar un período de 21 días en aislamiento y evaluación de signos de la infección antes de su reintroducción a su grupo.

Otro paso de manejo importante en la prevención de la enfermedad respiratoria por Herpesvirus es la disminución de la reactivación inducida por el estrés y la diseminación de virus del caballo portador latentemente infectado dentro del grupo. Las medidas para controlar la frecuencia de la reactivación de Herpesvirus latente están orientadas a minimizar el estrés causado a los caballos por las aglomeraciones, estado nutricional pobre, altas cargas parasitarias, transportes prolongados largo, la desorganización de grupos sociales establecidos, estado climático, destetes masivos, etc.

3. INTERFAZ DE LA BASE DE DATOS DEL SISTEMA MUNDIAL DE INFORMACIÓN ZOOSANITARIA (WAHID)

3.1 Tareas realizadas

La interfaz WAHID provee acceso a todos los datos que se mantienen dentro del nuevo Sistema Mundial de Información Zoosanitaria (WAHIS) (241).

Una extensa gama de información está disponible desde:

Notificaciones inmediatas enviadas por los Países Miembros en respuesta a los eventos excepcionales de enfermedad que están sucediendo en estos países, así como también los informes de seguimiento acerca de estos eventos.

Informes semestrales describen las situaciones de las enfermedades de la Lista de la OIE en cada País Miembro.

Informes anuales proveen más información sobre los antecedentes de sanidad animal, laboratorios y facilidades de producción de vacuna, etc.

3.2 Notificaciones e informes de enfermedades provocadas por VIE y HVE

A continuación se detallan los resúmenes de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de las enfermedades provocadas por VIE y HVE.

3.2.1 Influenza Equina

Tabla 2–Situación zoonositaria del Uruguay. Resumen de la ocurrencia de la enfermedad provocada por VIE en el período 2005 – 2009. Reproducido de Referencia 241.

Enfermedad	Estatus semestrales				
	2005	2006	2007	2008	2009
Influenza equina	Sin Notificación Inmediata ni Informe de Seguimiento en el período				

Tabla 3- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por VIE durante 2009. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Focos						
			Especies	Susceptibles	Caso	Muerto	Destruído	Sacrificados
India	En curso	40	Especies					
			Équidos	17733	19523	21	0	0
			Animales	17733	19523	21	0	0
Japón	Resuelto 02/07/09	120	Especies					
			Équidos	15354	2512	0	0	0
			Animales	15354	2512	0	0	0
Total			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
			Équidos	33087	22035	21	0	0
Número total de animales afectados			Todas	33087	22035	21	0	0

Tabla 4- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por VIE durante 2008. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Focos						
			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
Egipto	Resuelto 29/09/08	7						
			Équidos	3538	617	0	0	0
			Animales	3538	617	0	0	0
India	En curso	40						
			Équidos	17517	19273	16	0	0
			Animales	17517	19273	16	0	0
Japón	Resuelto 02/07/09	120						
			Équidos	15354	2512	0	0	0
			Animales	15354	2512	0	0	0
Mongolia	Resuelto 01/05/08	7						
			Équidos	44304	9503	9	0	0
			Animales	44304	9503	9	0	0
Total			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
			Équidos	213872	38241	34	0	0
Número total de animales afectados			Todas	213872	38241	34	0	0

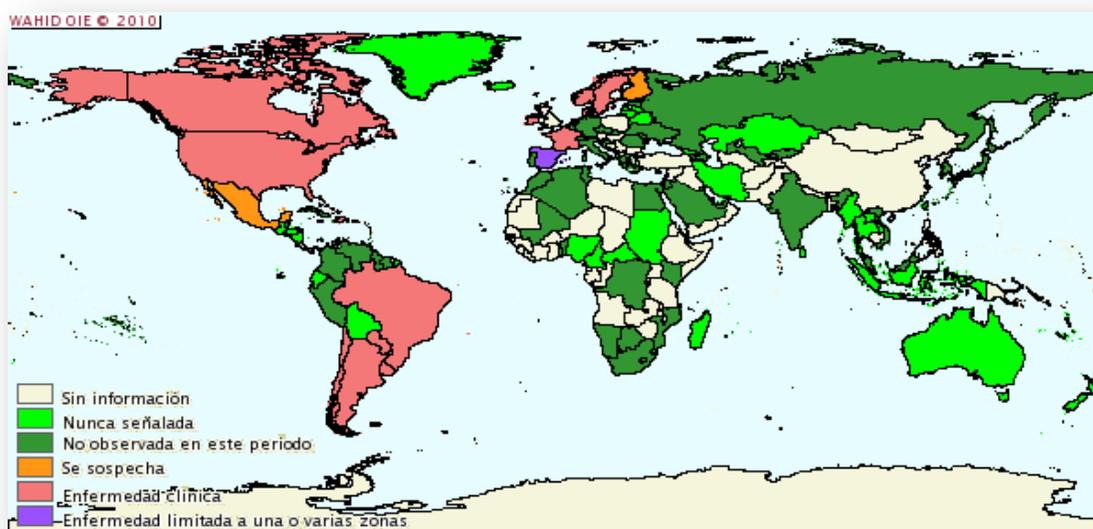
Tabla 5- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por VIE durante 2007. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Focos	Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
Australia	Resuelto 25/12/07	240						
			Équidos	2741	1497	1	0	0
			Animales	2741	1497	1	0	0
China	Resuelto 04/07/08	3						
			Équidos	130000	5515	0	0	0
			Animales	130000	5515	0	0	0
Japón	Resuelto 02/07/09	120						
			Équidos	14483	2335	0	0	0
			Animales	14483	2335	0	0	0
Mongolia	Resuelto 01/05/08	7						
			Équidos	44304	9503	9	0	0
			Animales	44304	9503	9	0	0
Total			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
			Équidos	191528	18850	10	0	0
Número total de animales afectados			Todas	191528	18850	10	0	0

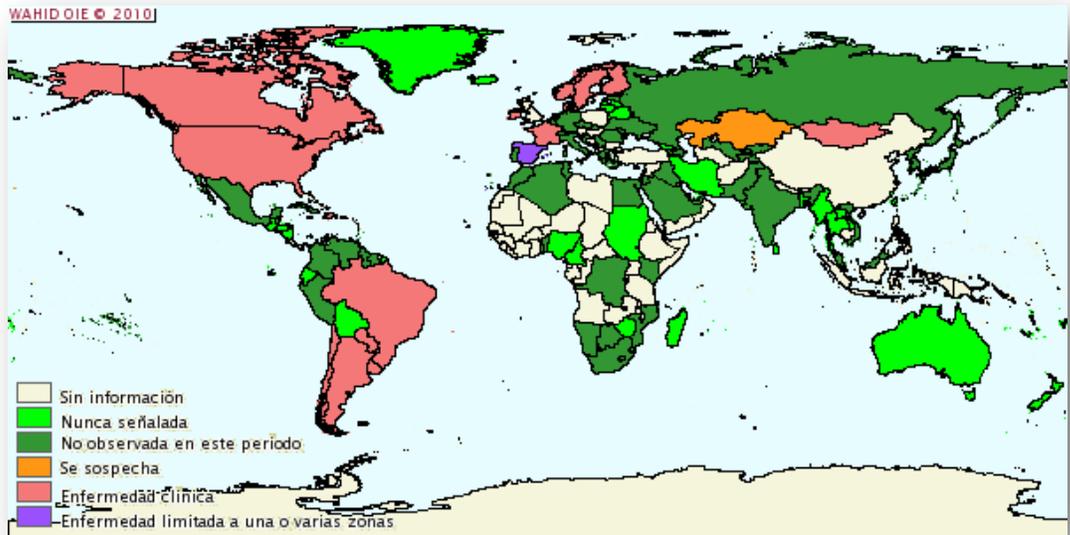
Tabla 6-Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por VIE durante 2006. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Número de focos	Animales afectados
Número total de animales afectados			0

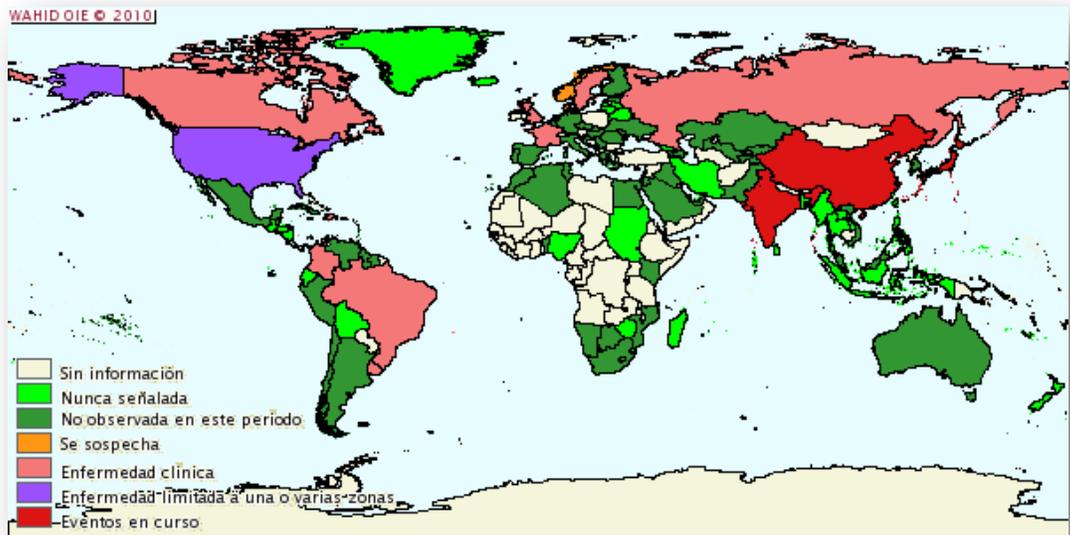
Mapa 1- Distribución de la enfermedad provocada por VIE durante 2006. Reproducido de Referencia 241.



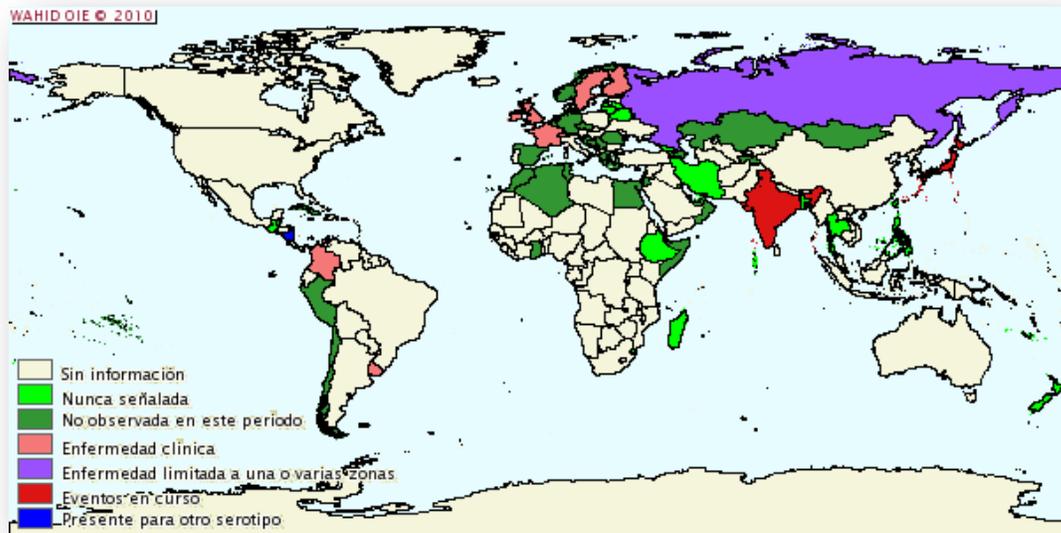
Mapa 2- Distribución de la enfermedad provocada por VIE durante 2007. Reproducido de Referencia 241.



Mapa 3- Distribución de la enfermedad provocada por VIE durante 2008. Reproducido de Referencia 241.



Mapa 4- Distribución de la enfermedad provocada por VIE durante 2009. Reproducido de Referencia 241.



3.2.2 Rhinopneumonitis Equina

Tabla 7– Situación zoonosanitaria del Uruguay. Resumen de la ocurrencia de la enfermedad provocada por HVE en el período 2005 – 2009. Reproducido de Referencia 241.

Enfermedad	Estatus semestrales					
	2005	2006	2007	2008	2009	*
HVE – 1 / 4	Sin Notificación Inmediata ni Informe de Seguimiento en el período					

Tabla 8- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por HVE - 4 durante 2006. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Número de focos	Animales afectados
Número total de animales afectados			0

Tabla 9- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por HVE - 4 durante 2007. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Número de focos	Animales afectados
Número total de animales afectados			0

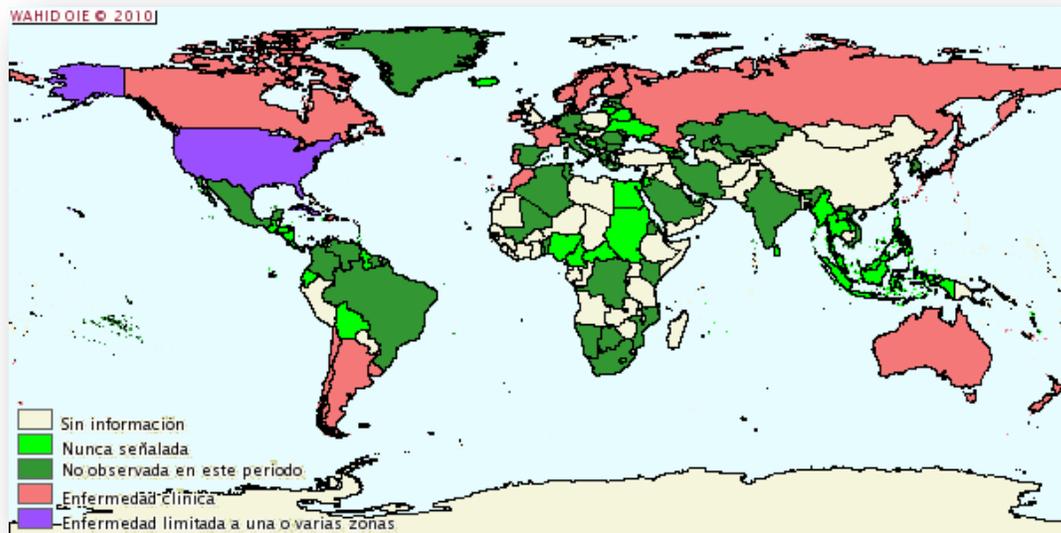
Tabla 10- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por HVE - 4 durante 2008. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Focos	Animales afectados					
			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
Israel	Resuelto 03/04/08	1						
		Équidos	13	1	0	0	0	
		Animales	13	1	0	0	0	
Total		Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados	
Número total de animales afectados		Équidos	13	1	0	0	0	
		Todas	13	1	0	0	0	

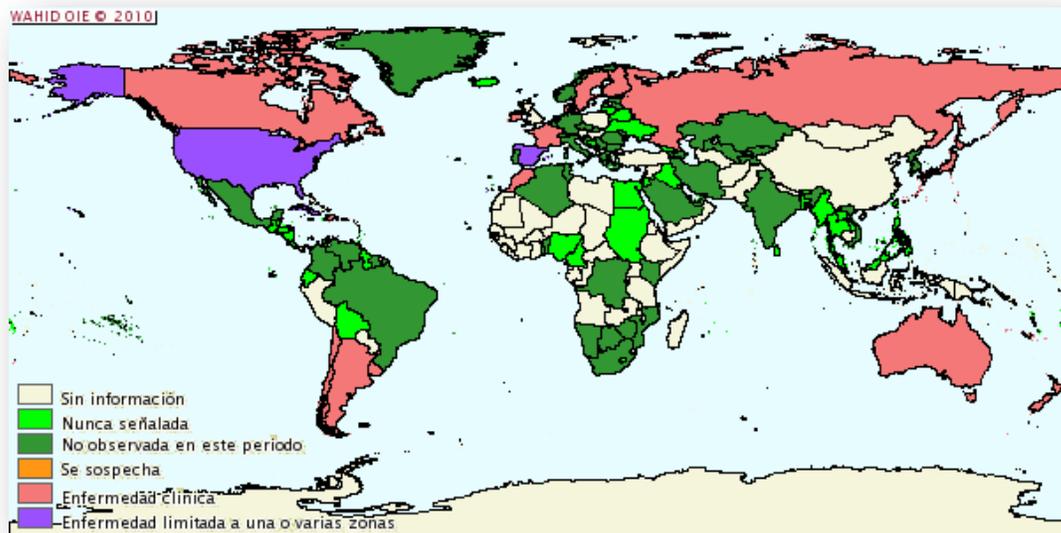
Tabla 11- Resumen de las Notificaciones inmediatas e Informes de seguimiento de la enfermedad provocada por HVE - 4 durante 2009. Reproducido de Referencia 241.

País	Estatus	Número de focos	Animales afectados					
			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
Croacia	Resuelto 24/07/2009	2	Especies					
			Équidos	15	15	1	0	0
			Animales	15	15	1	0	0
Sudáfrica	Resuelto 31/07/09	2	Especies					
			Équidos	325	22	18	1	0
			Animales	325	22	18	1	0
Total			Especies	Susceptibles	Casos	Muertos	Destruídos	Sacrificados
			Équidos	340	37	19	1	0
Número total de animales afectados			Todas	340	37	19	1	0

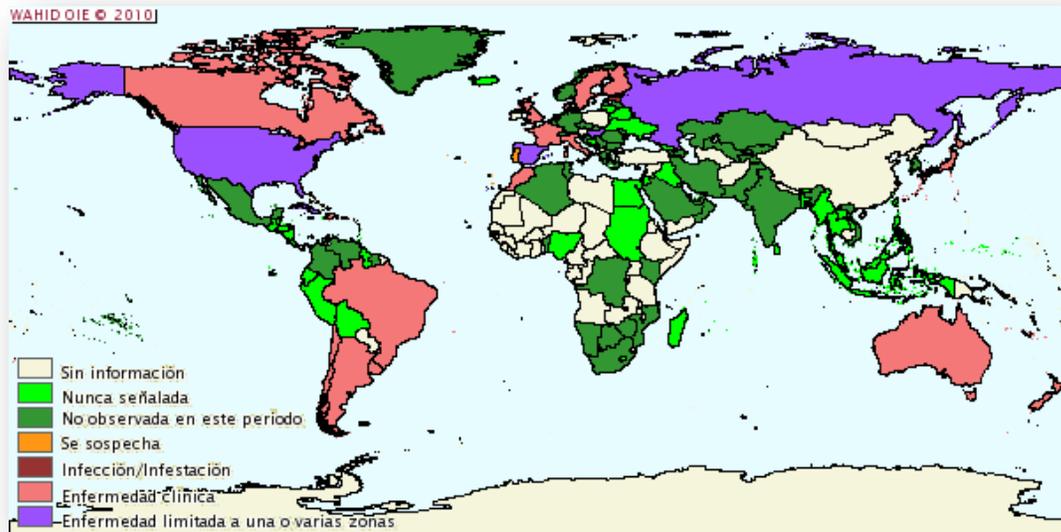
Mapa 5- Distribución de la enfermedad provocada por HVE durante 2006. Reproducido de Referencia 241.



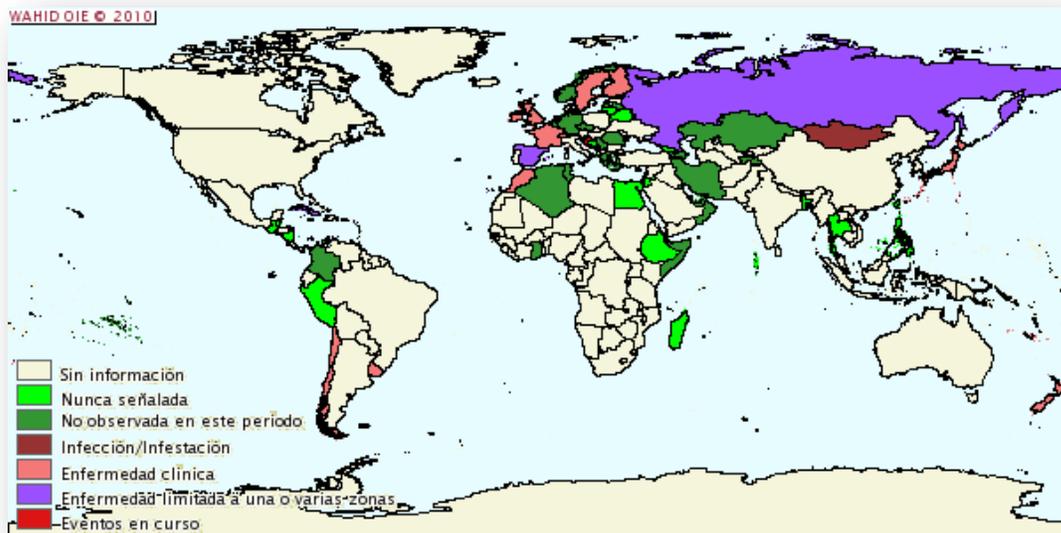
Mapa 6- Distribución de la enfermedad provocada por HVE durante 2007. Reproducido de Referencia 241.



Mapa 7- Distribución de la enfermedad provocada por HVE durante 2008. Reproducido de Referencia 241.



Mapa 8 - Distribución de la enfermedad provocada por HVE durante 2009. Reproducido de Referencia 241.



4. SANIDAD EN HIPÓDROMOS

4.1 Situación actual de las Instituciones deportivas y eventos competitivos

Ha habido un número creciente durante los últimos años de enfermedades infecto contagiosas en el mundo, que afectan especialmente a las reuniones de carreras de alto perfil y eventos competitivos. Estos brotes han causado sufrimiento y muerte en los caballos, la ansiedad y la incertidumbre entre los propietarios de caballos y público en general, y enormes pérdidas económicas en la industria equina y comunidades que dependen de ella.

Los brotes recientes de enfermedades infectocontagiosas, han sido asociados a agentes virales y bacterianos. Los brotes de enfermedades provocadas por causas virales son Influenza Equina, Herpesvirus Equino-1 y 4, Arteritis Viral Equina, Estomatitis Vesicular y Anemia Infecciosa Equina. Los brotes de enfermedades provocadas por causas bacterianas incluyen *Streptococcus equi var equi*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Un resumen elaborado por el Dr. Paul Morley de la Universidad Estatal de Colorado muestra las diversas agentes de enfermedades infecciosas de los últimos años. El mayor número de casos corresponde al Virus del Nilo Occidental, seguido por Herpesvirus Equino, con el mayor número de episodios de HVE-1 durante el 2006.

Tabla 12 Compilación de la serie de publicaciones de casos en thehorse.com por tipo de enfermedad infecto contagiosa y año, en el período 1996 - 2006. Cada suceso no necesariamente refleja un brote. Reproducido de Referencia 240.

Año	HVE		WNV		Salmonella		Influenza		S. equi	
	Conteo	%	Conteo	%	Conteo	%	Conteo	%	Conteo	%
2006	90	46	41	9	0	0	4	11	6	13
2005	41	21	35	8	3	12	11	29	15	33
2004	12	6	55	13	15	60	6	16	6	13
2003	36	19	82	19	0	0	8	21	4	9
2002	6	3	98	22	2	8	2	5	2	4
2001	3	2	96	22	1	4	4	11	8	17
2000	0	0	19	4	1	4	0	0	0	0

Los orígenes de la medicina veterinaria moderna se basan en la necesidad de control de enfermedades infecciosas en los animales. Son estos mismos desafíos a los que se enfrentan los veterinarios equinos de hoy, ya que se espera que desempeñen un papel fundamental en la prevención, investigación y mitigación de los brotes de enfermedades infecto contagioso. Estos retos son complejos, muchas veces desalentadores, y van acompañados de grandes expectativas y un intenso escrutinio de los propietarios y el público. Para desempeñar esa función con eficacia, la preparación y planificación son fundamentales, junto con una buena comprensión de los recursos y estrategias. Aun así equipados, también el éxito en esas misiones, depende de la confianza y el apoyo financiero de los propietarios, administradores de haras e hipódromos y organizadores de eventos.

El impacto financiero de los brotes incluye los ingresos perdidos a causa de la interrupción de eventos y como resultado del movimiento de caballos, el costo asociado con el trabajo de diagnóstico y seguimiento de enfermos y de caballos en contacto (expuestos), el costo del tratamiento, el costo asociado con la mitigación, incluidas las estrategias de prevención (vacunación y los protocolos de bioseguridad y monitoreo), la pérdida del trabajo con los caballos enfermos y expuestos durante el brote, y la pérdida asociada a los caballos que pueden morir a causa de la enfermedad. Hay muy pocas estimaciones detalladas existentes del costo financiero de

tales brotes, pero los que existen indican que el impacto puede ser sustancial. Durante un brote de HVE-1 a principios de 2007 en Wellington, FL, un artículo publicado en la página web del periódico Sun Sentinel calcula que las pérdidas diarias para la economía local en Wellington han superado los \$ 750.000 por día. Sin duda, sería preferible prevenir un brote de la enfermedad, más que tratar de contenerlo. Sin embargo, no es fácil poner un valor a un brote de enfermedad al que se le impidió suscitarse. Por lo tanto, puede ser difícil conseguir apoyo suficiente para poner programas de prevención.

En reconocimiento y respuesta a la creciente importancia del control de enfermedades infecciosas en la práctica veterinaria equina, la AAEP (American Association of Equine Practitioners) ha elaborado directrices para el control de enfermedades infecciosas en los eventos equinos. Estas directrices proporcionan un plan de acción cuando el veterinario se enfrenta a un brote de enfermedad infecciosa equina y proporciona detalles sobre los aspectos de diagnóstico clínico y de laboratorio de determinadas enfermedades equinas infecto contagiosas. Las directrices también se ocupan de la planificación previa al episodio para hacer frente a una aparición de enfermedad infecciosa. Además de estas directrices, el Consejo Ejecutivo de la AAEP estableció un comité permanente para las enfermedades infecciosas desde el año 2006, basado en el reconocimiento de que la AAEP desempeña un papel clave en ayudar a la industria equina en el control de dichas enfermedades.

4.2 Conceptos actuales de vacunación y control de enfermedades infecciosas en instituciones deportivas

Los Programas de control de enfermedades infecciosas son componentes de gran importancia de las prácticas de gestión dirigidas a maximizar la salud, la productividad y el rendimiento de los caballos.

La enfermedad infecciosa que afecta un equino individual o que se manifiesta como brote en una población equina, se produce cuando se experimenta un desafío con el agente infeccioso, en una dosis suficiente para superar la resistencia adquirida a través de la exposición natural anterior a la enfermedad o mediante la vacunación. Por esta razón, los programas de control de las enfermedades infecciosas deben tener los siguientes tres objetivos: a) Reducir la exposición a agentes infecciosos en el medio ambiente de los caballos, b) Reducir al mínimo los factores que disminuyen la resistencia, c) Mejorar la resistencia a través del uso de las vacunas (la vacunación

por sí sola no puede prevenir la enfermedad, las prácticas de gestión deben reducir retos con agentes patógenos infecciosos).

La incidencia de enfermedades infecciosas en las poblaciones de caballos tiende a aumentar en número, así como la densidad de caballos sensibles en una misma instalación. Esto sucede por diversas causas, tales como movimientos de los caballos fuera de las instalaciones, medio externo favorable y falta de diseño e implementación de prácticas de gestión adecuadas. Otros factores que influyen en el riesgo de contraer la infección y el desarrollo de la enfermedad son la edad, tipo, raza, género, uso de los animales, factores ambientales, geográficos, climáticos y el historial de exposición y vacunación contra el agente de infección.

Las condiciones en los establecimientos de cría y en las instalaciones de espectáculos deportivos en áreas de entrenamiento y carreras en hipódromos son ideales para la introducción y transmisión de enfermedades infecciosas, especialmente aquellas que afectan el tracto respiratorio. En los haras e hipódromos, la introducción y la mezcla de caballos de diferentes edades y orígenes y la alta proporción de potrillos, caballos susceptibles y yeguas preñadas susceptibles, crean una situación que plantea problemas especiales y muestra algunos aspectos importantes para las prácticas de control de enfermedades.

El riesgo de contraer la infección se puede reducir mediante el mantenimiento de distintos grupos por edad y función. Las yeguas y potros residentes deben ser separados de potrillos nuevos, de caballos en entrenamiento y de yeguas de visita. Las yeguas y caballos visitantes de la finca debe tener resultado negativo Anemia Infecciosa Equina (AIE), ya sea por ELISA o por Test de Coggins AGID, y deben estar debidamente vacunados y desparasitados antes de su llegada. Los mismos deben ser recibidos y mantenidos en establos y corrales separados de la población equina residente.

4.3 Pruebas de detección para impedir la entrada o el movimiento de la infección en instituciones deportivas

El tema principal de esta cuestión, es que es casi seguro que se tiene que hacer concesiones si se quiere una única prueba de detección. Ahora, si se tiene la suerte de contar con una prueba que tenga 100% de sensibilidad y especificidad, el compromiso no será necesario. Dadas las limitaciones, es casi seguro, sin embargo, que se deba elegir una prueba que sea muy sensible, pero no tan específica como se desea, o viceversa. ¿Cómo elegir? Bueno, si no se puede soportar la perspectiva de perder un caso de la enfermedad, se puede estar dispuesto a aceptar un número significativo de falsos positivos que siempre puede excluir con más pruebas más adelante. La aplicación de estos argumentos a los caballos para enfermedades infecciosas en la entrada a un espectáculo, podría establecer prioridades diferentes, porque los diagnósticos falsos positivos pueden causar todo tipo de dolores de cabeza. Por lo tanto, puede elegir una prueba que sea altamente específica (pocos falsos positivos) y aceptar una sensibilidad reducida, entonces, se tiene una prueba altamente específica, cuando se diagnostica una enfermedad, pero se perderá algunos casos, un buen ejemplo sería el kit ELISA utilizado para el diagnóstico de Influenza Equina. Como prueba de screening, tiene cierto valor, pero si se usa solo no va a evitar que aparezca la enfermedad. Por esta razón, las autoridades veterinarias en Dubai utilizan la prueba para todos los caballos al entrar, pero también se somete al caballo a un período de cuarentena prolongado. En la mayoría de las situaciones y con las enfermedades infecciosas más preocupantes, se puede llegar a una conclusión similar acerca de las pruebas de detección disponibles. Muchas pruebas son demasiado lentas o tienen limitaciones en términos de su sensibilidad y especificidad. Esto significa que el uso de estas pruebas como el único método de controlar el movimiento de la infección es insuficiente. La conclusión es que las pruebas de detección no tienen mucho valor cuando se usan solos, y sería preferible utilizar en combinación con un período de cuarentena para controlar la entrada de muchas enfermedades infecciosas. Lo mismo se aplica en el uso de estas pruebas para la liberación de animales de una granja de cuarentena o, después de un brote de HVE-1 neurológico, por ejemplo. Una prueba de PCR aquí puede parecer útil, pero puede dar una falsa sensación de seguridad y no debe utilizarse como único criterio para el movimiento de ese caballo.

4.4 Vacunación para la prevención

La vacunación es generalmente una buena medida, aunque su protección es casi siempre <100%.

Abundan artículos y protocolos de vacunación, y las directrices recientemente actualizadas por AAEP proporcionan información detallada sobre las estrategias de vacunación. Las vacunas no pueden evitar la propagación de enfermedades infecciosas por completo en un brote, sin embargo, pueden y deben ayudar a reducir la severidad de la enfermedad.

Un momento ideal de vacunación maximizará la inmunidad en el momento de riesgo máximo. Por lo tanto, las vacunaciones de refuerzo 2 a 3 semanas antes de viajes a los establos de venta o muestra son una estrategia atractiva. Con respecto al uso de las vacunas en la cara de un brote epidémico, se recomienda hacer uso de los programas de vacunación. Si los caballos están correctamente vacunados, una vacunación de refuerzo puede generar una respuesta de memoria de gran alcance en un par de días. Esto es tan cierto para las vacunas inactivadas, como lo es para las vacunas vivas modificadas. Si no se encuentra el historial de vacunación o nunca se ha aplicado un plan de inmunización antes de la vacunación de cara al brote, las opciones son mucho más limitadas.

Un tema escabroso relativo a la enfermedad neurológica provocada por HVE-1, es la preocupación de que la aparición de la enfermedad pueda ser más probable por la inmunidad del huésped o la vacunación. Esta sigue siendo una teoría, pero hay razones para considerarlo seriamente. Las opiniones varían sobre esta cuestión, algunos dirán que vacunas de refuerzo de HVE-1 para los caballos en riesgo de exposición en los brotes de HVE-1 neurológicos pueden prevenir la infección y la propagación del virus a través de la población equina. Otros expresan preocupación por el riesgo, posiblemente, cada vez mayor de desarrollo de la forma neurológica de la enfermedad mediante la vacunación frente a la epidemia. Actualmente no hay pruebas que sugieren que aumentar la inmunidad de HVE-1 por la vacunación frente a un brote, lleva a un mayor riesgo de desarrollo de la forma neurológica de la enfermedad, y de hecho, muchos autores recomiendan este método de control del brote. Este sigue siendo un área donde se necesita más información.

5. FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE AUTORIDADES DE CARRERAS (IFHA)

5.1 Propósito

En 1961, las autoridades de carreras de caballos de los Estados Unidos de América, Francia, Gran Bretaña e Irlanda, decidieron coordinar su acción con el fin de proteger la integridad de las carreras de caballos y mantener su objetivo fundamental, que es la organización de concursos para seleccionar los mejores caballos por el bien de mejorar la calidad de la reproducción.

5.2 Integración

En 1967, crearon la Conferencia Internacional, celebrada en París cada año, la cual nuclea las principales autoridades de carreras en el mundo.

Para dar una forma oficial a estos esfuerzos, se fundó en 1993 la Federación Internacional de Autoridades de Carreras de caballos que integra alrededor de sesenta miembros, entre los cuales se incluye Hípica Rioplatense Uruguay, S.A. Ver Tabla 1 para visualizar el listado completo de los países representados.

Tabla 13- Listado de países con Autoridades de Carreras cuyos representantes son miembros integrantes.

AFRICA OCCIDENTAL ²	REPUBLICA CHECA ¹	ISRAEL ¹	PERU ¹
ALEMANIA ¹	DINAMARCA ¹	ITALIA ¹	POLONIA ¹
ARGELIA ¹	ESLOVAQUIA ¹	JAPON ¹	PORTUGAL ¹
ARGENTINA ¹	ESLOVENIA ¹	KASAKHSTAN ²	REPUBLICA DOMINICANA ³
AUSTRALIA ¹	ESPAÑA ¹	KENYA ²	SINGAPUR ¹
AUSTRIA ¹	FILIPINAS ³	KOREA ¹	SUDAFRICA ¹
AZERBAIJAN ²	FINLANDIA ³	LEBANON ¹	SUECIA ¹
BAHRAIN ¹	FRANCIA ¹	LITHUANIA ²	SUIZA ¹
BARBADOS ³	GRAN BRETAÑA ¹	MACAO ¹	TURQUIA ¹
BELGICA ¹	GRECIA ¹	MADAGASCAR ²	TRINIDAD & TOBAGO ¹
BRASIL ¹	HONG KONG ¹	MALASIA ¹	EMIRATOS ARABES UNIDOS ¹
CANADA ¹	HUNGRIA ¹	MEXICO ¹	ESTADOS UNIDOS DE
CHILE ¹	INDIA ¹	MOROCCO ¹	AMERICA ¹
CHINA ³	IRAN ²	NUEVA ZEALANDA ¹	URUGUAY ¹
CHIPRE ¹	IRLANDA ¹	NORUEGA ¹	VENEZUELA ¹
CROACIA ¹	ISLAS MAURICIO ¹	PAISES BAJOS ¹	

¹ - miembros de la Federación Internacional

² - miembros observadores en las conferencias internacionales de la Federación Internacional

³ - miembros firmantes de algunos artículos del Acuerdo Internacional sobre Cría Carreras y Apuestas, sin formar parte de la Federación Internacional.

5.3 Objetivos

Sus objetivos principales son: a) Coordinar y armonizar las normas de los países miembros en relación con la cría, las carreras y las apuestas, b) Garantizar la calidad y equidad de la competición en el interés de la cría y del público, c) Proporcionar a la organización en los hipódromos de la protección del bienestar de los caballos, jinetes y los asistentes, d) Realizar una actualización de la organización de carreras de caballos en cuenta la evolución técnica, social y económica.

La Federación organiza cada año la Conferencia Internacional donde se actualiza el Convenio Internacional sobre cría, carreras y apuestas aprobado por la Conferencia en 1974, y donde se publica las principales estadísticas de cada país miembro (242).

5.4 Convenio Internacional sobre cría, carreras y apuestas

5.4.1 Objetivos

El Convenio Internacional hace un inventario de las prácticas adecuadas y las cláusulas generales comunes a la mayoría de las autoridades de carreras de caballos. Esto representa un compendio exhaustivo de los principios ideales por objeto ayudar a las autoridades de carreras de caballos para definir sus propias necesidades. El Convenio reúne una serie de artículos, anexos y las directrices que establecen las mejores prácticas recomendadas en áreas significativas de las carreras, la administración de libros genealógicos y las apuestas comunes a todas las jurisdicciones. El Convenio está diseñado para ayudar a las autoridades mediante la promoción de las carreras de caballos los siguientes objetivos: para aumentar la confianza pública en la integridad del deporte de las carreras y la industria de la cría, proteger la seguridad y el bienestar de los caballos y jinetes, coordinar y armonizar los enfoques en todo el mundo de las carreras y la cría, promover el crecimiento de la dimensión internacional para maximizar las oportunidades para la promoción de las carreras y su bienestar económico mediante la protección de los derechos de propiedad intelectual de carreras de la piratería por los operadores de apuestas autorizados.

Todos los miembros de la Federación se comprometen a fomentar los objetivos y se comprometen a hacer todo lo posible, siempre que sea razonablemente posible. Los miembros que han adoptado cada artículo, en su totalidad o en parte, pondrá a disposición de sus normas nacionales en la aplicación de sus intenciones.

5.4.2 Recomendaciones de la Versión 2009 del Convenio Internacional sobre cría, carreras y apuestas.

La última versión del Convenio, publicada el 7 de abril de 2009 y ratificada por los miembros de Federación Internacional de Autoridades de Carreras, establece en los artículos 23 y 24, las recomendaciones pertinentes a la sanidad animal, y de la cual se extrae:

Artículo 23 - "...Vacunas: Se establece como medida la vacunación de los caballos para reducir el riesgo de introducción de enfermedades infecciosas, así como para proteger las poblaciones nativas de equinos. Las autoridades de carreras de caballos y de Stud Books deben ser conscientes de sus necesidades de vacunación ante la Autoridad Nacional de Veterinaria. Las autoridades deberían tomar en consideración la exigencia de vacunación contra aquellas enfermedades, que no están cubiertas por su legislación nacional. Por tal motivo, debe estar disponible toda la información relevante sobre las vacunas y protocolos de vacunación...

" Todas las vacunas deben ser administradas por un veterinario registrado. Un registro, aprobado por escrito por el veterinario administradora, detallando la fecha de vacunación, el tipo de vacuna y el número de lote debe ser, y debería aparecer en el pasaporte en caso de que exista. Este registro debe acompañar el caballo y se pondrá a disposición de las autoridades competentes cuando sea necesario "

Artículo 24. - " Información de salud: Las autoridades de carreras de caballos y de Stud Book deben garantizar que la nueva información sobre el estado de salud de la cría y de caballos de carreras en sus respectivos países a su Autoridad Nacional Veterinaria y a través del Centro Internacional para colación * (CPI) a todos los signatarios del presente Acuerdo...Se ha acordado que el CPI enviará a la Secretaría de la Federación Internacional de Autoridades de carreras de caballos, su informe trimestral, así como informes provisionales, para su distribución a todos sus miembros...Las autoridades de carreras de caballos y de Stud Book deben actuar de enlace permanente con sus autoridades veterinarias nacionales sobre las medidas para prevenir la propagación o la entrada de la enfermedad..."

6. HÍPICA RIOPLATENSE URUGUAY S.A.- HIPÓDROMO NACIONAL DE MAROÑAS

6.1 Descripción de la Institución

El Hipódromo Nacional de Maroñas es un establecimiento de pupilaje permanente y de tránsito de equinos, que debidamente autorizados, se destina primordialmente y con carácter permanente o de temporada, a la celebración de carreras de caballos al aire libre y al cruce de apuestas hípicas, de acuerdo con la normativa sectorial. Asimismo, en sus instalaciones pueden estabularse caballos de la raza Pura Sangre de Carrera o de otras razas que expresamente autorice Hípica Rioplatense Uruguay S.A. (HRUSA), con destino a su entrenamiento o a su participación en las actividades organizadas o autorizadas por la empresa.

6.2 Reglamento de Carreras

6.2.1 Alcance

El 1º de abril del 2003, establecido por el Decreto 124/ 003, se crea el Reglamento de Carreras que regula la Actividad Hípica en el Hipódromo Nacional de Maroñas (244). El Reglamento rige respecto de todas las actividades hípicas que se desarrollan en el Hipódromo Nacional de Maroñas y se aplica a: Concesionario, propietarios, personas autorizadas por éstos para inscribir y hacer correr caballos por cuenta propia, compositores, veterinarios, capataces, peones, jockeys, jockeys aprendices, domadores y herradores de caballos anotados en carreras, cabañeros y en general, toda persona física o jurídica que tenga o tome injerencia en asuntos relacionados con la actividad hípica que se desarrolla en el Hipódromo de Maroñas.- Asimismo, todas las personas físicas o jurídicas antes citadas, quedan sujetas a las resoluciones del Concesionario, del Comisariato, de la Comisión Hípica, de la Comisión Asesora o de la Dirección General de Casinos, en su caso y en el ámbito de sus respectivas competencias, sin perjuicio de las facultades de la Comisión Hípica como órgano.

6.2.2 Artículos referentes a la sanidad

6.2.2.1 Alcance físico y sujetos de responsabilidad

Como lo estipula el Reglamento, HRUSA., como entidad administradora del Hipódromo Nacional de Maroñas, permite estabular en sus boxes a los caballos que se encuentren debidamente identificados, bien mediante su registro de identificación, si se trata de caballos en tránsito, o su inscripción en Stud Book Uruguayo y/o Registros Genealógicos Oficiales, reconocidos por el Poder Ejecutivo, cuando se trate de caballos con residencia temporal o permanente para competencias, y cuyos propietarios acrediten su inscripción en el Stud Book Uruguayo y el cumplimiento de los requisitos indicados en la legislación vigente, comprometiéndose por escrito a su íntegro cumplimiento.

HRUSA permite el desarrollo de actividades de entrenamiento de caballos en sus instalaciones a los entrenadores que acrediten cumplir los requisitos indicados en el Reglamento de Carreras.

Según se especifica, HRUSA permite la entrada, estabulación y, en su caso, el entrenamiento temporal en sus instalaciones de caballos de tránsito para participar en las actividades organizadas o autorizadas por HRUSA, o para una estancia temporal, con o sin entrenamiento. HRUSA faculta a los propietarios de caballos que expresamente autorice para la estabulación de aquéllos en sus boxes.

La estabulación de caballos en los boxes se regirá por lo dispuesto en Reglamento y en sus circulares de desarrollo o modificación. Sus respectivos propietarios habrán de comprometerse por escrito al cumplimiento íntegro de su contenido.

El entrenador es el único responsable de las obligaciones de todo orden surgidas con HRUSA y con terceras personas como consecuencia del desarrollo de sus actividades de entrenamiento en el Hipódromo

6.2.2.2 Acerca de las condiciones de higiene

A los efectos del desarrollo de actividades de entrenamiento, HRUSA asignará a cada entrenador la totalidad o parte de una cuadra del Hipódromo.

Los entrenadores o responsables de la preparación de los caballos estarán obligados a mantener en perfecto estado de limpieza los interiores y exteriores que se les asignen para su uso. Asimismo, en

caso de que tengan que desocupar un box, por cualquier motivo, lo entregarán en perfecto estado higiénico.

6.2.2.3 Acerca de la documentación y esquema sanitario

Según se establece en el Reglamento, todo caballo inscripto para correr deberá tener la documentación y esquema sanitario que la Comisión Hípica determine, a sugerencia del Servicio Veterinario del Concesionario. Estas disposiciones también rigen para los equinos que ingresen al Tattersall para ser subastados.

Será requisito indispensable para la inscripción, un certificado expedido por veterinario oficial en el que se acredite que el caballo no padece enfermedad

Infecto contagiosa o parasitaria y, en su caso, que el lugar de origen del animal (sea otro término municipal o un país extranjero) se halle indemne a aquellos efectos.

Por último, todos los caballos inscriptos serán inspeccionados por el Servicio de Veterinarios Oficial del Hipódromo.

De acuerdo al Reglamento, todo equino para inscribir debe presente el Esquema Sanitario vigente. Las certificaciones sanitarias deben ser confeccionadas por un Médico Veterinario habilitado con N° de Registro y acompañado por un timbre profesional y con el nombre correcto del/los equinos.

El Esquema Sanitario comprende:

Certificación de vacunas de Influenza Equina y Rhinopneumonitis Equina (HVE1 y HVE-4). La vigencia de cada dosis de vacunación será de cuatro meses y deben proceder de Laboratorios y series habilitados en el Uruguay y estar vigentes al momento de la inoculación.

Certificado de Test de Coggins del M.G.A.P con análisis NEGATIVO para Anemia Infecciosa Equina, cuya vigencia será de un año.

Los equinos importados deberán presentar en el Servicio Veterinario una copia del Certificado Sanitario Oficial de Importación a los efectos de convalidar su sanidad. No es exigencia sanitaria para la importación la vacunación contra Rhinopneumonitis (HVE1 y HVE-4), por lo cual estos equinos deben ser vacunados contra esta enfermedad en Uruguay.

6.2.3 Acerca del no cumplimiento de la normativa

Cabe destacar, que el entrenador, mientras desarrolle sus actividades en el Hipódromo, es el único responsable del estado en que se encuentran los caballos sujetos a su entrenamiento, debiendo velar por el cumplimiento de los deberes que en materia de sanidad, higiene, alimentación y demás de la propia índole establezca la normativa aplicable, con la diligencia propia de un buen cuidador. En caso de incumplimiento de esta obligación, HRUSA se reserva el derecho a adoptar las medidas que estime pertinentes en beneficio de la sanidad y buen funcionamiento del Hipódromo.

7. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este trabajo fue brindar evidencias que aporten a la determinación de los agentes causales de los brotes de cuadros clínicos compatibles con enfermedad del tracto respiratorio observados en equinos Pura Sangre de Carrera en las instalaciones del Hipódromo Nacional de Maroñas en Junio del 2006.

Para realizar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar el nivel de protección generado por los programas de vacunación para la prevención de enfermedades infecciosas llevados adelante por las autoridades.
- 2- Determinar el nivel de inmunidad protectora contra los virus causantes de las enfermedades Influenza Equina y Rhinopneumonitis Equina al momento del brote de enfermedad respiratoria.
- 3- Aportar evidencias de la posible circulación de cepas de VIE y/o HVE durante el brote.
- 4- Contribuir al estudio y monitoreo de enfermedades respiratorias estacionales en instalaciones hípicas.

8. METODOLOGÍA

El presente trabajo fue elaborado con muestras colectadas en el año 2006, durante un brote de clínica compatible con cuadros de enfermedad respiratoria, que comprendieron episodios de tos, moco y/o fiebre, sucedidos en las instalaciones y alrededores del Hipódromo Nacional de Maroñas.

El objetivo fue evaluar el nivel de inmunidad de los equinos contra los virus HVE – 4 y VIE durante el brote, para poder formular hipótesis que nos guíen a la determinación del virus causal de tales cuadros y los motivos por los cuales los planes estrictos de vacunación con las vacunas actuales no previenen la fuerte sintomatología observada.

El estudio se llevó a cabo en dos etapas, las cuales comprenden la selección y toma de muestras y el análisis clínico. El muestreo se realizó en las Villas Hípicas de las instalaciones del Hipódromo Nacional de Maroñas y Studs aledaños.

El análisis de laboratorio se llevó a cabo en el Departamento de Virología de Laboratorios Santa Elena S.A.

8.1 Muestreo

8.1.1 Composición de la muestra

Los animales seleccionados para el muestreo serológico son caballos de raza Pura Sangre de Carrera, en período de entrenamiento.

En su mayoría, residentes en los predios pertenecientes a las Villas Hípicas del Hipódromo Nacional de Maroñas, bajo la concesión a la empresa Hípica Rioplatense S.A., el otro pequeño grupo, residen en Studs ubicados a una y dos cuadras del lugar anteriormente mencionado.

Cabe destacar que estos equinos no pertenecen a la empresa Hípica Rioplatense, sino que los entrenadores correspondientes a los Haras dueños de estos animales alquilan las Villas Hípicas, para su entrenamiento diario.

Las Villas son áreas de 400 m² aproximadamente, dentro de un predio común. De modo que los caballos seleccionados se encuentran en el mismo hábitat ecológico. Estas Villas encierran grupos de animales en estrecho interrelacionamiento dentro y entre las diferentes Villas.

El entrenador respectivo es el único responsable por los equinos a su tutela, él y su grupo de trabajo se encargan del entrenamiento, alimentación, sanidades y cronograma de las mismas,

higiene, limpieza, etc. Por lo general, existen veterinarios contratados por los cuidadores para encargarse de los temas referentes a su profesión.

La selección de los animales intentó ser representativa de toda la población residente, con especial énfasis en el estudio de cada subgrupo que habita un mismo nicho.

Fueron elegidos aquellos animales que se ajustaban al mismo régimen de inmunización requerido por las autoridades del Hipódromo Nacional de Maroñas, que cursasen una clínica respiratoria a no más de una semana de su inicio y cuya última vacunación contra estos virus fuese anterior a 30 días al momento de la toma de muestra. Además de los caballos con síntomas, se incluyeron aquellos equinos que comparten espacio y actividades con los anteriores.

Para explicar los criterios de selección, es importante recordar los objetivos del trabajo. Para la evaluación del esquema vacunal recomendado por las autoridades y llevado a cabo por los entrenadores, es importante que los equinos se ajusten al mismo. Por otro lado, se tomó en cuenta la fecha de la última vacunación, a efectos de evitar resultados de títulos de Ac. que puedan deberse a una reciente inmunización profiláctica, más que a una infección viral, por lo que los entrenadores de los caballos seleccionados declararon no haberlos vacunados, con por lo menos, un mes de antelación a la primer toma de muestra. La situación sanitaria de aquellos equinos que comparten confinamiento con los animales enfermos seleccionados brinda información relevante acerca de la epidemiología de los virus.

En la primera toma, los animales seleccionados, que cumplían con los criterios especificados, sumaban 62, pero a causa de movimientos de los animales entre el Hipódromo de Maroñas y los diferentes Haras, movimiento y mudanzas de entrenadores, retiro de caballos, etc. las muestras para la fecha de la segunda toma, correspondieron a 50 equinos.

Los entrenadores de los caballos del presente trabajo fueron seleccionados, en función de su excelente disposición para con la investigación que se extiende y con las que en el futuro se realicen, su preocupación por la salud de los animales y su trayectoria y experiencia en brotes de enfermedades respiratorias.

8.1.2 Cronograma de toma de muestra

Las colectas fueron establecidas con el objetivo de obtener muestras de suero que pudiesen evidenciar el nivel de inmunidad protectora contra los virus causantes de las enfermedades Influenza Equina y Rhinopneumonitis Equina al momento del brote de clínica respiratoria y poder detectar, la posible circulación de alguno de estos virus en los equinos.

Se esperó al comienzo del brote y se tomaron las muestras a aquellos que estuviesen con no más de dos a tres días de comenzado el brote y que haya pasado más de un mes desde la última fecha de vacunación declarada. Estas limitantes, hicieron que se redujera notablemente, la población a muestrear.

La segunda toma de muestras fue 20-25 días después de la primera toma.

De acuerdo al estudio de los certificados de sanidades presentadas al Servicio Veterinario del Departamento de Carreras del Hipódromo de Maroñas, se contaba con la fecha exacta declarada de la última dosis de vacunación contra VIE y HVE – 4, lo cual comprobó la veracidad de lo información declarada.

8.1.3 Datos complementarios a la muestra

Debido a la importancia de la correcta identificación de cada animal se elaboraron reseñas donde se identifica cada equino (Fig. 12), bajo la supervisión del Compositor y/o Veterinario responsable. Si bien el Servicio Veterinario del Hipódromo cuenta con la reseña identificadora de los equinos inscriptos para competición, se testaron equinos de pasaje transitorio, que no cuentan con información certificada por el Servicio Veterinario.

Para la correcta concreción de los criterios de selección de los equinos a analizar, se elaboró una cartilla donde se especifican los datos relativos a la identidad del equino, situación sanitaria y curso de la enfermedad, de vital importancia para la identificación, y selección de los animales del estudio y posterior análisis de muestras.

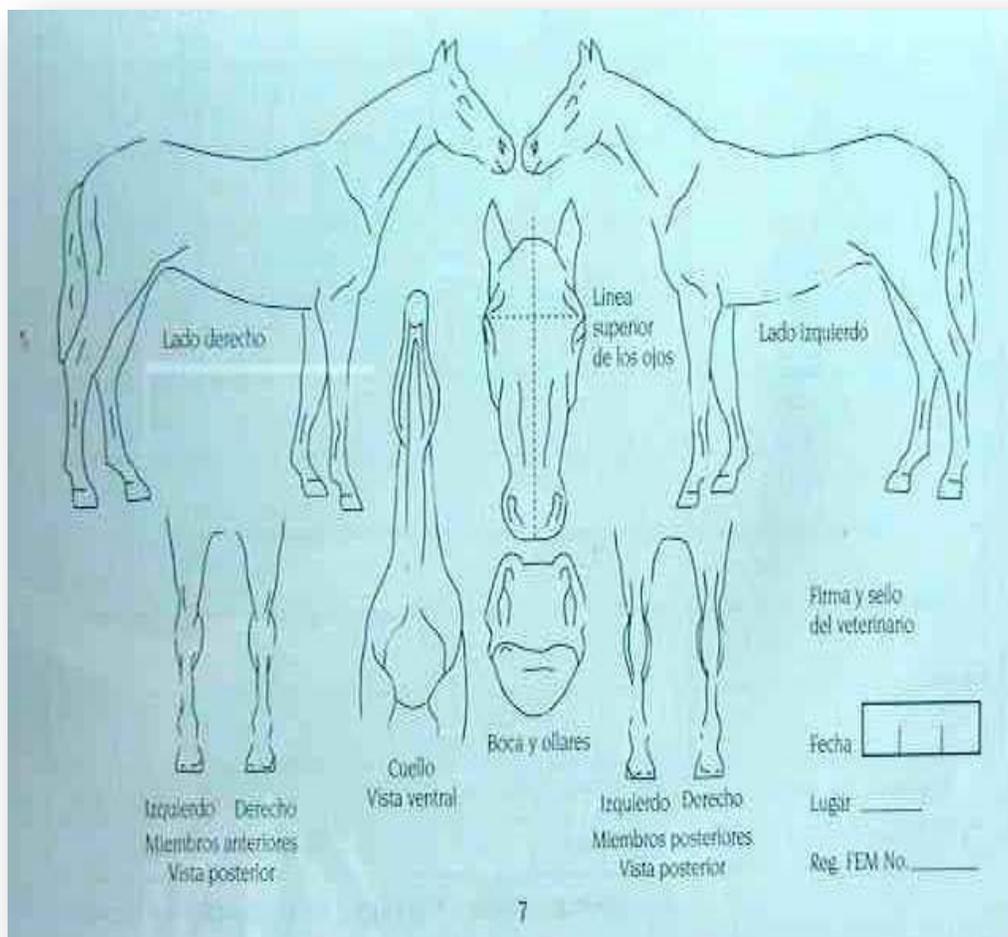


Figura 12- Reseña identificadora de pelaje como complemento a la cartilla de identificación general.

8.1.4 Colecta del material

Dado que el objetivo de este trabajo es cuantificar y analizar las variaciones en el nivel de anticuerpos durante el brote, el material clínico colectado fue la sangre. Las extracciones fueron efectuadas por punción de vena yugular con tubos de vacío, utilizando estrictas medidas higiénicas. A cada animal se le extrajo un volumen aproximado de 10 ml de sangre y se remitió a Laboratorios Santa Elena S.A. para su procesamiento. El tiempo transcurrido entre la toma de muestra y el arribo al laboratorio de análisis fue de dos horas, tiempo durante el cual las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. En el laboratorio, se realizó procedimiento de extracción de suero hasta la total remoción del coágulo. Los sueros extraídos se conservaron a -20° C.

Tabla 14- Cuadro con información relativa a la identidad del equino, situación sanitaria y curso de la enfermedad. Dicha cartilla caracteriza a cada uno de los equinos testeados.

Nº Equino			
Compositor			
Veterinario			
Stud			
Villa			
Nombre			
Edad			
Pelaje			
Marcas	Cabeza	M. A. Izquierdo	M. A. Derecho
Clínica	Tos	Observaciones	Medicación
	Moco	Alimentación	Observaciones
	Fiebre	Animo	Caballo cercano con síntomas
Vacunación VIE	Nombre Cepas	Marca	Fecha última dosis/ próxima
Vacunación HVE	Nombre Cepas	Marca	Fecha última dosis/ próxima
Toma muestra A	Fecha	Observaciones	
Toma muestra B	Fecha	Observaciones	

8.2 Titulación de Anticuerpos

Los protocolos de Titulación de Anticuerpos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de las autoridades sanitarias internacionales, Manual WHO on animal Influenza Diagnosis and Surveillance para VIE y Manual de la OIE sobre animales terrestres para HVE – 4 y, (245, 246, 247).

8.2.1 Técnicas de Estudio

8.2.1.1 Detección de Anticuerpos contra VIE por la Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación

8.2.1.1.1 Materiales

1 - Antisuero de referencia para el subtipo de HA

2 - Buffers y reactivos para Test IHA

Glóbulos rojos (GR) de cobayos en Solución Alsever

Agua destilada o deionizada

Buffer fosfato salino (0.01M), Ph 7.2 (PBS)

Suero fisiológico, 0.85 % NaCl

3 – Cultivos celulares y soluciones para Cultivo Celular y Cultivo Viral

a – Cultivo en monocapa de Línea Celular MDCK (Madine Darby Canine Kidney Cells) de bajo pasaje (< 25 – 30 pasajes) a baja densidad (70 – 95 % confluencia): ATCC, American Type Culture Collection, CCL 34

b- Medio de Cultivo (MC) Completo D – MEM suplementado con L – Glutamina.

500 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM): Gibco, Cat. # 11965 – 092.

5.5 ml Antibióticos 100X. (10,000 U/ml Penicilina, 10,000 µg/ml Sulfato de Estreptomicina): Gibco, Cat. # 15140 – 023

13,5 ml buffer HEPES 1 M: Gibco, Cat. # 15630 – 023

Albúmina sérica bovina (BSA), fracción V 7,5 %: Gibco BRL, Cat. #15260 – 011

Tripsina/EDTA: Gibco, Cat. # 25300 – 054

c – Medio de Propagación Viral (MPV): D – MEM, suplementado con Solución de 2 µg/ml de TPCK- Tripsina.

Tripsina TPCK: Sigma, Cat. # 8642

d – Tripsina/EDTA: Gibco, Cat. # 25300 – 054

.

4 - Suministros

Tubos de Centrifuga (cónicos graduados 50 ml y 15 ml) estériles y sin esterilizar

Pipetas 1000 µl y 200 µl estériles y sin esterilizar

Pipetas multicanal 200 µl estériles y sin esterilizar

Sistema autoclavable de descarte de materiales

Microplacas para Hemaglutinación de 96 pocillos (forma U para uso con GR de cobayo): Nunclon,
Cat. #

Microplacas de Cultivo Celular de 96 pocillos, fondo plano: Nunclon, Cat. # 167008

5 – Equipamiento

Cabina de flujo laminar de Seguridad clase II

Baños de agua. 37° C y 56° C

Incubadora de 5 % CO₂ a 37° C

Microscopio invertido para la observación de los Cultivos Celulares.

Freezer – 70° C para preservación de antígenos y Freezer -20° C para preservación de suero.

Nitrógeno líquido para preservación de células

Centrifuga refrigerada

8.2.1.1.2 Procedimiento

Preparación de reactivos y soluciones para Test IHA

A - Buffer fosfato salino (0.01M), pH 7.2 (PBS).

1 - Preparar stock 25 veces concentrado (25 X) de buffer fosfato conteniendo en 100 ml: 2.74 g de fosfato dibásico sodio (Na_2HPO_4) y 0.79 g de fosfato monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$).

2 - Para preparar PBS, mezclar y disolver en agua destilada deionizada, por ej. en 4 ml de 25 X buffer fosfato y 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl).

3 - Chequear pH 7.2 ± 0.1 , ajustar con NaOH 1N o HCl 1N.

4 - Autoclavar o filtrar para esterilizar.

5 - Guardar PBS, pH 7.2 abierto a 4 °C por no más de 3 semanas.

B - Alsever

1- Pesar, disolver en agua destilada, por ej. en 1l: 20.5 g de dextrosa, 8.0 g de citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 4.2 g cloruro de sodio (NaCl), 0.55 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).

2 - Chequear pH 6.1 ± 0.1 , ajustar con NaOH 1N o HCl 1N. Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μm - diámetro de poro.

C - Suero fisiológico NaCl 0.85 %

1 - Preparar stock 20X disolviendo 170 g de NaCl en agua deionizada por en 1000 ml.

2 - Esterilizar por autoclave a 121° C.

3 - Para preparar suero fisiológico NaCl 0.85 %, agregar 50 ml de solución stock a 950 ml de agua deionizada.

4 - Esterilizar por autoclave a 121° C.

5 - Guardar suero fisiológico abierto a 4° C por no más de 3 semanas.

Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones para Cultivo Celular y Viral

A - Medio de Cultivo Completo (MC) de D – MEM suplementado con L – Glutamina, para Línea Celular MDCK.

1 - A 500 ml de D – MEM agregar:

Antibióticos 100x: 5,0 ml (concentración final de 100 U/ml Penicilina, 100 µg/ml Sulfato de Estreptomicina).

Albúmina sérica bovina: 12,5 ml (concentración final de 0,2 %).

2 --Para Medio de Cultivo (solamente):

Suero Fetal Bovino: 10 ml cada 90 ml de D – MEM (concentración final de 10% SFB).

3 - Para Medio de Propagación Viral (solamente):

Agregar 0,5 ml de Solución stock de 2 mg/ml de Tripsina TPCK por ml de D – MEM (concentración final de 2 µg/ml).

B – Solución Stock de Tripsina TPCK

1 - Disolver 20 mg de Tripsina TPCK en 10 ml.

2 - Filtrar por membrana 0,2 µm.

3 - Conservar en alícuotas a –20° C.

Generación de stock de virus: Cultivo Viral de alto título en línea celular MDCK

A - Preparación de Cultivos Celulares de la línea MDCK

El procedimiento de preparación de la suspensión celular de MDCK se describe para monocapas confluentes F – 75 cm².

1 – Chequear las monocapas celulares de las botellas F – 75 cm² y descartar el MC.

2 – Lavar las monocapas con 5 ml de Tripsina/ EDTA pre termostatizada a 37° C. y remover.

3 – Agregar 5 ml de Tripsina/ EDTA para cubrir las monocapas.

4 – Reposar las botellas e incubar a 37° C en atmósfera de 5 % CO₂ hasta que las monocapas se desprendan (10 – 15 minutos).

5 – Agregar 5 – 10 ml de MC a cada botella, disgregar y cosechar en tubos de centrifuga estériles.

6 – Lavar las células con PBS (12000 RPM durante 5 minutos).

7 – Resuspender las células en MC y contarlas en cámara de hematocrito.

8 – Agregar MC a la suspensión celular para ajustarla a una concentración de 0.2×10^6 cel./ ml.

9 – Agregar 10 ml de esta suspensión celular a un número adecuado de botellas F – 25 cm² para cultivo viral. La suspensión celular restante puede ser usada para cultivo celular en botellas F – 75 cm².

10 – Incubar botellas a 37° C.

B - Inoculación y cosecha de Cultivos Virales

Preparación de las botellas

1 – Chequear la monocapa celular con microscopio a magnificación 40X.

2 – Descartar el MC y lavar 3 veces con 6 ml de MPV (conteniendo 2 µg/ml de Tripsina TPCK).

Inoculación de las botellas

1 – Remover el D – MEM de las botellas con pipeta estéril

2 – Inocular 200 µl de cada espécimen en cada botella usando pipeta estéril.

3 – Adsorber el inoculo 30 minutos a 37° C.

4 – Agregar 6 ml de MPV a cada botella.

5 – Observar por Efecto Citopático (ECP) diariamente.

C - Cosecha de Cultivos Virales

1 – Cosechar el cultivo viral si se observa ECP. Colectar el sobrenadante y agregar solución estabilizadora (BSA 0,5%). Cosechar al 6 – 7 días, aún si no se evidencia ECP.

2 – Realizar Test de HA y conservar a – 70° C.

3 - Centrifugar los tubos a 3000 RPM durante 5 minutos para remover el excedente de células.

Alicuotar de a 1 – 2 ml y preservar a – 70° C.

Estandarización de GR para Test IHA

A – Preparación de GR

- 1- La concentración final de GR de cobayo debe ser de 0.75 %, para una correcta visualización y completo asentamiento.
- 2- Filtrar aprox. 5 ml de sangre a través de una gasa en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml.
- 3- Centrifugar a 1200 RPM por 10 min.
- 4- Aspirar sobrenadante de Glóbulos blancos.
- 5- Agregar 50 ml PBS (pH 7.2). Mezclar.
- 6- Centrifugar a 1200 RPM por 5 min. Aspirar sobrenadante.
- 7- Repetir lavado de PBS dos veces.
- 8- Resuspender GR a un volumen final de 12 ml usando un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.
- 9- Centrifugar a 1200 RPM por 10 min.
- 10- Estimar concentración de células y diluir hasta concentración apropiada.
- 11- Determinar concentración con Unidad de hematocrito y ajustar acorde.

B - Determinación y ajuste de concentración de GR por unidad de hematocrito.

- 1- Preparar suspensión de GR aproximada.
- 2- Preparar dilución 1:100 de suspensión agregando 0.5 ml de suspensión de GR a 49.5 ml de PBS pH 7.2.
- 3- Transferir 10 μ l en una de las cámaras de la unidad y dejar a las células esparcirse.
- 4- Contar los GR en cada uno de los 4 cuadrados pequeños de la cámara.
- 5- Calcular el volumen final de la suspensión GR. Volumen final para 0.75 % = (# células contadas / 240) (volumen inicial de suspensión de GR).

Procedimiento para Test IHA

A- Tratamiento de Antisuero de Referencia para Inactivación de Inhibidores Inespecíficos.

- 1- Reconstruir antisuero de referencia con agua destilada estéril al volumen indicado en la etiqueta. Guardar entre -20° C y -70° C.
- 2- Reconstituir y guardar RDE (Enzima destructora de receptor).
 - a- Reconstituir RDE con 25 ml suero fisiológico, NaCl 0.85 %.
 - b- Alicuotar y guardar entre -20° C y -70° C.
- 3- Agregar 3 vol de RDE a un vol de suero (0.9 ml RDE + 0.3 ml suero).
Volumen suficiente para testear 50-55 aislamientos

- 4- Incubar toda la noche en baño de agua 37°C.
 - 5- Calentar en baño de agua 56° C por 30 min para inactivar remanente de RDE.
 - 6- Dejar el antisuero a temperatura ambiente. Agregar 6 vol. (1-8 ml) suero fisiológico, NaCl 0.85 %.
- La dilución final del antisuero es 1:10.

B- Identificación de Aglutininas Inespecíficas en el Suero Tratado.

- 1- Tomar una placa M96 y agregar 25 µl PBS (pH 7.2) a los pocillos B hasta H (B1- H6) en cada una de las seis columnas numeradas.
- 2- Agregar 50 µl PBS (pH 7.2) al primer pocillo (A6) de la columna numerada 6 para control de GR.
- 3- Agregar 50 µl de cada antisuero tratado al primer pocillo (A1- A5) de la fila A.
- 4- Preparar diluciones seriadas del antisuero transfiriendo 25 µl desde el primer pocillo de cada columna numerada 1- 6 al pocillo siguiente de la columna. Descartar los finales 25 µl luego de la fila H.
- 5- Agregar 25 µl PBS, pH 7.2 a todos los pocillos de cada una de las seis columnas.
- 6- Agregar 50 µl de GR estandarizados.
- 7- Mezclar usando un agitador mecánico o en forma manual.
- 8- Incubar la placa a temperatura ambiente (22° C - 25° C) durante el tiempo adecuado, chequeando el control de células hasta el completo asentamiento de los GR. Para GR de cobayo lo usual es 60 min.

9 - Interpretación

Si los GR se asientan completamente, se acepta el uso del antisuero para el test IHA. La presencia de aglutininas no específicas se evidenciará por la hemaglutinación de GR en el antisuero diluido. En éste caso, el antisuero se debe adsorber con GR de acuerdo con la sección III.

C- Adsorción de Antisuero para remover Aglutininas Inespecíficas

- 1 - A un volumen de GR agregar 20 vol de suero tratado con RDE.
- 2 - Mezclar e incubar a 4° C por 1hr., mezclar en intervalos para resuspender las células.
- 3 - Centrifugar a 1200 RPM por 10 min.
- 4 - Remover el suero adsorbido sin tocar las células.
- 5 - Repetir los controles de suero como se describe a continuación.
- 6 - Repetir la adsorción con GR hasta que los controles de suero sean negativos.

D - HA Titulación de Antígenos Control

- 1 - Tomar una microplaca forma U de 96 pocillos.
- 2 - Agregar 50 µl de PBS (Ph 7.2) desde el pocillo #2 hasta el #12 (A12- H12) de cada fila.
- 3 - Agregar 100 µl de cada antígeno control al primer pocillo (A1- F1) de cada fila excepto la G y H.
- 4 - Preparar un control de GR en la fila H agregando 100 µl de PBS.
- 5 - Realizar diluciones seriadas transfiriendo 50 µl desde el primer pocillo de cada fila al siguiente. Descartar los finales 50 µl.
- 6 - Agregar 50 µl de la suspensión de GR a cada pocillo de la placa.
- 7 - Mezclar usando vibrador mecánico o manual.
- 8 - Incubar la microplaca a temperatura ambiente (22° C – 25° C). Chequear hasta el completo asentamiento de los GR.
- 9 - Anotar los resultados.
- 10 - Interpretación

Existe hemaglutinación cuando los GR se mantienen en suspensión luego de que el control de GR se haya asentado completamente. Éstos pocillos se anotan como “+”. Si los GR se asientan o hemaglutinan parcialmente se anotan como “+/-”. En la ausencia de hemaglutinación los GR de cobayo forman un halo en el fondo del pocillo y se anota como “-”.

La mayor dilución viral que causa completa hemaglutinación se considera como el título HA. El título HA es el recíproco de la dilución viral en el último pocillo con completa hemaglutinación.

E - Preparación de Antígeno Estandarizado para el Test IHA

Una unidad hemaglutinante es una medida operacional dependiente del método utilizado para la titulación HA. La unidad HA se define como la cantidad de virus necesaria para aglutinar un volumen igual de suspensión de GR estandarizados.

- 1 - Determinar el volumen de antígeno estandarizado necesario para el test IHA. Por ej. 1 ml de antígeno para testear 5 sueros, cada uno de los cuales se diluye en 8 pocillos, con 25 µl de antígenos agregados a cada pocillo (5 sueros x 8 pocillos x 25 µl = 1 ml de antígeno estandarizado). Preparar 1 ml adicional para ajuste de titulación.
- 2 - El estándar para el test IHA es 4 unidades HA agregados a las diluciones de antisuero. Como en el test se agregan 25 µl, se necesita una dilución viral que contenga 4 unidades HA / 25 µl. Calcular la dilución de antígeno en PBS dividiendo el título HA entre 8, de modo de tener 8 unidades HA / 50 µl.
- 3 - Realizar una segunda titulación HA usando el antígeno ya estandarizado para corroborar el título deseado. Guardar el antígeno diluido a 4° C y usarlo el mismo día.
- 4 - Anotar resultados.

5 - Interpretación

El título deseado de 4 unidades HA / 25 µl debe hemaglutinar los primeros cuatro pocillos de la titulación. Si éste no fuera el resultado se debe ajustar agregando antígeno o diluyendo con PBS.

Test IHA para diagnóstico serológico.

1 - Tomar la microplaca adecuada.

2 - Agregar 25 µl de PBS desde el pocillo B hasta el H (B1- H12) de cada columna.

3 - Agregar 50 µl de cada suero tratado (1:10) al primer pocillo (A1- A12) de cada columna.

4 - Preparar diluciones seriadas de cada suero tratado, transfiriendo 25 µl desde el primer pocillo de cada columna numerada 1- 12 al siguiente. Descartar los 25 µl finales luego de la fila H.

5 - Agregar 25 µl de antígeno estandarizado a todos los pocillo (A1- H12) en el set de suero tratado.

6 - Agregar 25 µl de PBS en lugar de antígeno para control de suero en el set de suero tratado (A1- H12).

7 - Mezclar con agitador mecánico o manual durante 10 seg.

8 - Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente (22° C- 25° C) por 15 min.

9 - Agregar 50 µl de GR estandarizados. Mezclar como en paso 7.

10 - Cubrir la microplaca y dejar a los GR asentarse a temperatura ambiente (22° C- 25° C) durante el tiempo adecuado.

11 - Anotar resultados.

Se compara el título HA para cada muestra de suero ensayada de la fase aguda y de la fase convaleciente de cada animal para detectar aumentos de 4 veces o superiores.

8.2.1.2 Detección de Anticuerpos contra HVE – 4 por la Técnica de Seroneutralización in Vitro

8.2.1.2.1 Materiales

A – Cultivos celulares y soluciones para Cultivo Celular y Cultivo Viral

1 – Cultivo en monocapa de Línea Celular VERO (kidney epithelial cells of the African Green Monkey) de bajo pasaje (< 25 – 30 pasajes) a baja densidad (70 – 95% confluencia).

2- Medio de Cultivo D – MEM para Línea Celular Vero.

500 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM): Gibco, Cat. # 11965 – 092.

5,5 ml Antibióticos 100X. (10,000 U/ml Penicilina, 10,000 µg/ml Sulfato de Estreptomicina): Gibco, Cat. # 15140 – 023.

13,5 ml buffer HEPES 1 M: Gibco, Cat. # 15630 – 023.

3 – D - MEM para Cultivo Celular (MC). Al D – MEM descrito en A.1, agregar Suero Fetal Bovino (SFB) hasta una concentración final de 10%. SFB Hyclone, Cat. # A – 1115 – L.

4 – Tripsina/EDTA: Gibco, Cat. # 25300 – 054.

5 – Medio de Propagación Viral (MPV): D – MEM descrito en 1.

B – Suministros

Tubos de Centrifuga (cónicos graduados 50 ml y 15 ml) estériles

Pipetas 1000 µl y 200 µl estériles

Pipetas multicanal 200 µl estériles

Sistema autoclavable de descarte de materiales

Placas de Cultivo Celular de 96 pocillos, fondo plano: Nunclon Surface, Cat. # 167008

3 - Equipamiento

Cabina de flujo laminar de Seguridad clase II

Baños de agua. 37°C y 56°C

Incubadora de 5% CO₂ a 37°C

Microscopio invertido para la observación de los Cultivos Celulares.

Freezer – 70° C para preservación de antígenos y Freezer -20°C para preservación de suero

Nitrógeno líquido para preservación de células

Centrífuga refrigerada

8.2.1.2.2 Procedimiento

A - Control de Calidad

1 – Control de sueros

Realizar múltiples alícuotas a todos los sueros control y preservar a -20°C. El suero no debe ser descongelado y vuelto a congelar repetidas veces.

Incluir controles de suero positivo y negativo para el virus utilizado en el ensayo.

Control negativo:

Incluir un suero negativo para determinar si el virus no es inactivado por componentes propios del

siero. De ser posible, utilizar suero no inmunizado de la misma especie animal que es testada. Utilizar en la misma concentración que el antisuero seleccionado.

Control positivo:

De ser posible, utilizar suero inmunizado de la misma especie animal que es testada.

2 – Antígenos virales y controles celulares

Prever el chequeo de titulación de antígenos y controles celulares positivos y negativos en cada ensayo.

1 – Controles celulares positivos y negativos celulares:

Establecer una columna de pocillos como control positivo de células, que recibirán 100µl de la mezcla virus – Medio y una columna como control negativo de células con 100µl de Medio, en paralelo con el ensayo.

2 – Chequeo de titulación de antígenos

En cada ensayo, incluir una re titulación de la dilución del virus por duplicado. El virus se diluye en forma seriada en $\frac{1}{2}$ log₁₀ (como se describe posteriormente).

Procedimiento para Seroneutralización in Vitro

A - Titulación viral

Generación de stock de virus: Cultivo Viral de alto título en línea celular VERO.

1 – Preparar 3 botellas F-75 cm² de cultivo de células VERO (como se describe previamente).

2 - Chequear la monocapa con microscopio a magnificación 40X. Decantar el MC en descartador y lavar tres veces con 6 ml de MPV.

3 – Inoculación de botellas de Cultivos Celulares

1 – Diluir las muestras de virus (usualmente 1: 10 a 1: 1000) en D – MEM.

2 – Remover MC de las botellas con pipeta estéril.

3 – Inocular 2 ml de cada dilución en cada botella usando pipeta estéril.

4 – Adsorber el inoculo 60 minutos a 37°C.

5 – Agregar 15 ml de D – MEM a cada botella.

6 – Observar por Efecto Citopático (ECP) diariamente.

4 – Cosecha de botellas de Cultivos Virales

1 – Cosechar el Cultivo Viral cuando el 50 – 100% de la monocapa evidencie ECP. Colectar el sobrenadante en tubos de centrifuga.

2 – Centrifugar los tubos a 3000 RPM durante 5 minutos para remover el excedente de células. Alicuotar de a 1 – 2 ml y preservar a – 70° C.

5 – Preparación de las microplacas de titulación con la línea celular VERO

1 – Chequear las monocapas celulares de las botellas F – 75 cm² y descartar el MC.

2 – Lavar las monocapas con 5 ml de Tripsina/ EDTA y remover.

3 – Agregar 5 ml de Tripsina/ EDTA para cubrir las monocapas.

4 – Reposar las botellas e incubar a 37 C en atmósfera de 5% CO₂ hasta que las monocapas se desprendan (10 – 15 minutos).

5 – Agregar 5 – 10 ml de MC a cada botella, disgregar y cosechar en tubos de centrifuga.

6 – Lavar las células con PBS (12000 RPM durante 5 minutos).

7 – Resuspender las células en MC y contarlas en cámara de hematocrito.

9 – Agregar 100µl de la suspensión celular a cada pocillo de las microplacas (cada microplaca se completa con 10 ml de la suspensión, aprox.).

10 – Incubar las microplacas 24 horas a 37° C en atmósfera de 5% CO₂. Usar las microplacas cuando alcancen confluencia. Para óptimos resultados, las células deben estar en fase exponencial de crecimiento.

6 – Titulación viral

1 – Descongelar una ampolla de suspensión viral.

2 – Diluir la suspensión 1/10 en D – MEM (stock de trabajo de solución viral).

3 – Realizar por duplicado diluciones seriadas en base log₁₀ en D – MEM en eppendorfs estériles (hasta la dilución 10-10 de modo de tener 10 diluciones para testear).

7 - Preparar para inoculación las microplacas de titulación de 96 pocillos que contienen las monocapas de células Vero.

1 – Remover el MC de las microplacas.

2 – Agregar (completar cada pocillo) con 300 µl de D- MEM. Remover y repetir el procedimiento para lavar las monocapas del SFB.

3 – Transferir 100 µl de cada dilución viral al correspondiente pocillo en cada una de las cuatro microplacas de titulación (8 pocillos por cada una de las diez diluciones).

- 4 – Dejar adsorber 2 horas a 37° C en atmósfera de 5 % CO₂.
- 5 – Remover el inóculo usando pipeta multicanal, lavar la microplaca agregando y removiendo 300µl de D – MEM.
- 6 – Agregar 200µl de D – MEM a cada pocillo e incubar 3 – 4 días a 37° C en atmósfera de 5 % CO₂. Observar bajo microscopio invertido por ECP y anotar resultados.
- 7 – Calcular TCID₅₀ por el método Reed – Muench. (Ver tabla 3).

Seroneutralización in vitro

Disponer de microplacas suficientes para realizar el ensayo por duplicado.

Cada ensayo debe contar con columnas para control celular, re titulación viral, y testeo de muestras de sueros de control y muestras problema para medición de anticuerpos. De igual modo, debe contar con filas para control de citotoxicidad.

A – Preparación del suero a testar

1 – Preparación de las muestras de suero a testear

- 1 – Las muestras de suero darían ser testadas por duplicado.
- 2 – Inactivar las muestras de suero a 56° C por 30 minutos.
- 3 – Agregar 50µl de D – MEM a cada pocillo de las microplacas. Agregar un adicional de 5 0µl a la columna 1 para control celular, a las columnas de re titulación viral y a la fila A para control de citotoxicidad.
- 4 – Agregar 50µl de cada muestra de suero inactivado por duplicado a la fila A para control de citotoxicidad.
- 5 - Agregar 100µl de cada muestra de suero inactivado por duplicado a la fila B para seroneutralización.
- 6– Realizar diluciones 1/2 seriadas a partir de la fila B, transfiriendo 50µl de cada fila a la siguiente. Descartar los últimos 50µl correspondientes a la fila H. Adviértase que las diluciones finales del suero, después de la adición del virus, van de 1/4 a 1/256.

B – Adición del virus

- 1 – Diluir la solución viral hasta una concentración de 100 TCID₅₀ cada 50µl en D – MEM

(solución viral de trabajo).

2 – Realizar por duplicado diluciones seriadas de la solución viral de trabajo en base log₁₀ en D – MEM en eppendorfs estériles (hasta la dilución 10⁻² de modo de tener 2 diluciones para testear.

3 – Agregar 50µl de cada dilución realizada en los pocillos correspondientes a las columnas de re titulación viral por duplicado.

4 - Agregar 50µl de la dilución viral de trabajo a todos los pocillos que contienen las diluciones de suero, excepto la fila A, correspondiente al control de citotoxicidad.

5 – Agitar suavemente las microplacas e incubar por 2 horas a 37° C en atmósfera de 5 % CO₂.

C – Adición de suspensión de la línea celular VERO a las microplacas de seroneutralización.

1 - Realizar pasos D 1 – D 9.

D – Incubar 3 – 4 días a 37° C en atmósfera de 5 % CO₂. Observar bajo microscopio invertido por ECP a diario.

E – Análisis de resultados.

Leer las microplacas cuando la re titulación viral evidencie 50 % o más ECP en por lo menos la mitad de los pocillos inoculados con 100 TCID₅₀ de dosis viral. Anotar resultados.

La mayor dilución de cada muestra de suero que inhibe completamente la monocapa del ECP, en por lo menos dos pocillos del duplicado, se toma como el Títulos de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE – 4

1 – Anotar los resultados de pocillos positivos (1) y negativos (2) a la presencia de ECP en cada dilución.

2 – Calcular el número acumulativo de pocillos positivos (3) y negativos (4).

(3) – Se obtiene sumando los números de (1) anteriores a cada dilución, empezando por el principio.

(4) – Se obtiene sumando los números de (2), posteriores a cada dilución, empezando por el final.

3 – Calcular el porcentaje de pocillos positivos (5).

4 – Calcular la distancia proporcional entre la dilución que evidencia cantidad de positivos > 50% (6) y la dilución que evidencia cantidad de positivos < 50% (6).

Proporcional = % de valores positivos por encima de 50 % - 50 x % Distancia de corrección de valores positivos por encima de 50% - % de valores valores positivos por debajo de 50 %.

5 – Calcular TCID₅₀ sumando el factor de distancia proporcional a la dilución que muestre > 50 % de positivos. Expresar el valor tomando en cuenta la cantidad inoculada en el pocillo de cada dilución de virus (si se usaron 50 µl, TCID₅₀/ 0.05 ml).

6 – Alternativamente, las microplacas se pueden analizar en cuanto a ECP después de fijar y teñir del modo siguiente:

Después de quitar el sobrenadante del cultivo, se sumergen las microplacas durante 15 minutos en una solución que contiene 2 mg/ ml de Cristal Violeta, 10% de Formalina, 45 % de Metanol y 45 % de agua. Luego, lavar las placas vigorosamente bajo chorro de agua fría.

Los pocillos que contienen monocapas infectadas se tiñen de azul, mientras que las monocapas destruidas por el virus no se tiñen. Comprobar que los pocillos del control de células, control de citotoxicidad, control positivo de suero, se tiñen de azul y los pocillos de control de virus y control negativo de suero no se tiñen.

7 –Se calcula el Títulos de Anticuerpos Neutralizantes para cada muestra de suero ensayada, y se comparan los títulos de suero de la fase aguda y de la fase convaleciente de cada animal para detectar aumentos de cuatro veces o superiores.

F - Estadística Descriptiva y Analítica

Los datos obtenidos en el experimento, fueron compilados y organizados en una planilla electrónica, utilizando un programa Excel.

9. RESULTADOS

9.1 Consideraciones previas al análisis de resultados

El número de animales incluidos en el estudio disminuyó durante el transcurso del trabajo, resultando en una muestra final de $n = 50$, menor que la inicial, $n = 62$. Por ser propiedad de particulares, estar en continuo régimen de entrenamiento, competir en carreras realizadas en diversos hipódromos del Uruguay, adecuarse a regímenes de descanso anuales en sus Haras correspondientes y por otras razones ajenas al estudio, los animales son transportados a otros departamentos de nuestro país, y por lo tanto, se vio disminuida la muestra en el presente estudio. Dado la importancia del nivel de anticuerpos de los virus de estudio al inicio de la sintomatología respiratoria para la evaluación del esquema vacunal y la protección generada al comienzo del brote, se consideraron la totalidad de los equinos para el análisis de los resultados. Si bien, una sola toma de muestra no permite un diagnóstico individual, puede brindar un diagnóstico presuntivo durante el brote (245, 246, 247). Por lo tanto, si se tiene un número importante de muestras de suero individual en la fase aguda de la enfermedad y coinciden los datos demográficos y sanitarios de la fase convaleciente, los test pueden ser procesados simultáneamente (245, 246, 247), por lo que varios animales se testaron en conjunto.

9.2 Influenza Equina

Para el diagnóstico serológico del VIE, dentro de las técnicas recomendadas por las autoridades sanitarias internacionales, se utilizó la Técnica de IHA, por formar parte de los procedimientos de rutina del laboratorio. Para ser considerado inmune, un animal debe presentar, mediante la Técnica de IHA, Títulos de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) igual o superior a 64 UHA/ 50 μ l (245). Las diluciones seriadas utilizadas en el presente trabajo, fueron de 1: 2 a partir de la dilución inicial de la muestra de suero de 1/ 10. Por tal motivo, se estipuló que animales con Título HA igual o superior a 80 UHA/ 50 μ l son considerados inmunes e iguales o inferiores a 40 UHA/ 50 μ l son considerados susceptibles.

Muestras con aumento de títulos entre la fase aguda y convaleciente de la enfermedad iguales o superiores a cuatro diluciones, se consideran como diagnosticados positivos a la infección/ inmunización reciente con el tipo/subtipo de VIE enfrentado in vitro.

El Test de IHA se realizó por duplicado utilizando el antígeno patrón A/Newmarket/1/93, representando el linaje Americano. Se seleccionó este linaje, por ser el que mayor semejanza antigénica posee con la cepa incluida en las vacunas comerciales factibles de circular según las recomendaciones internacionales.

Las vacunas comerciales utilizadas para inmunizar a los animales del presente estudio presentan en su formulación la cepa A/Newmarket/1/93, y la A/eq/Kentucky/97, la cual pertenece al linaje Americano y la A/Newmarket/2/93, la cual pertenece al linaje Europeo.

Los valores de Título HA obtenidos se presentan en las Tablas 15, 16, 17, 18 y Gráficos 1, 2.

En la primer toma de muestra 93,5 % de los animales muestreados presentaron Títulos HA iguales o superiores a 80 UHA/ 50 µl, es decir, presentaron niveles de anticuerpos considerados suficientes para proteger a los animales de una infección natural. En la segunda toma de muestra, los animales inmunes correspondieron al 98 % del total muestreado.

De los animales inmunes en la primer extracción de sangre, el 83,87 % presentaron títulos de HA iguales o superiores a 160 UHA/ 50 µl, en la segunda extracción, los que tuvieron estos valores correspondieron al 96% de los equinos. Dentro de los anteriores grupos de equinos cuyos títulos son ampliamente superiores a los mínimos considerados protectores, se destaca en la primer toma de muestra el 66.6 % obtuvieron títulos mayores o iguales a 320 UHA/ 50 µl y en la segunda extracción, correspondió al 78 %.

En la primer toma de muestra, cuatro animales, que corresponden al 6,45 % de los equinos, presentaron Títulos HA iguales o inferiores a 40 UHA/ 50 µl, considerándose susceptibles frente a la infección natural, mientras que para la segunda toma de muestra, este porcentaje disminuyó al 2%, correspondiendo a un sólo animal.

La Media Geométrica de los títulos obtenidos en la primer muestra fue 382,68 UHA/ 50 µl y en la segunda extracción, 485 UHA/ 50 µl.

De los cuatro animales susceptibles presentes en la primer toma de muestra, cuando se les extrajo la segunda toma, uno continuó con título de HA incambiado, mientras que otro equino presentó títulos considerados protectores, y a los dos animales restantes, no se les pudo extraer sangre, por no continuar en las instalaciones del Hipódromo.

De los animales considerados inmunes en la primera toma de muestra, ninguno disminuyó su título de anticuerpos hasta un valor considerado susceptible, el 100 % continuó estando protegido en la segunda etapa.

Acercas de las variaciones de títulos entre el primer y segunda toma de muestras, el 42 % de los equinos se mantuvo incambiado, el 24 % aumentó una dilución, el 16 % disminuyó una dilución, el 10 % aumentó dos diluciones, y el 8 % se dividió en grupos con diferentes variaciones.

Gráfico 1 Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) en la primer toma de muestra.

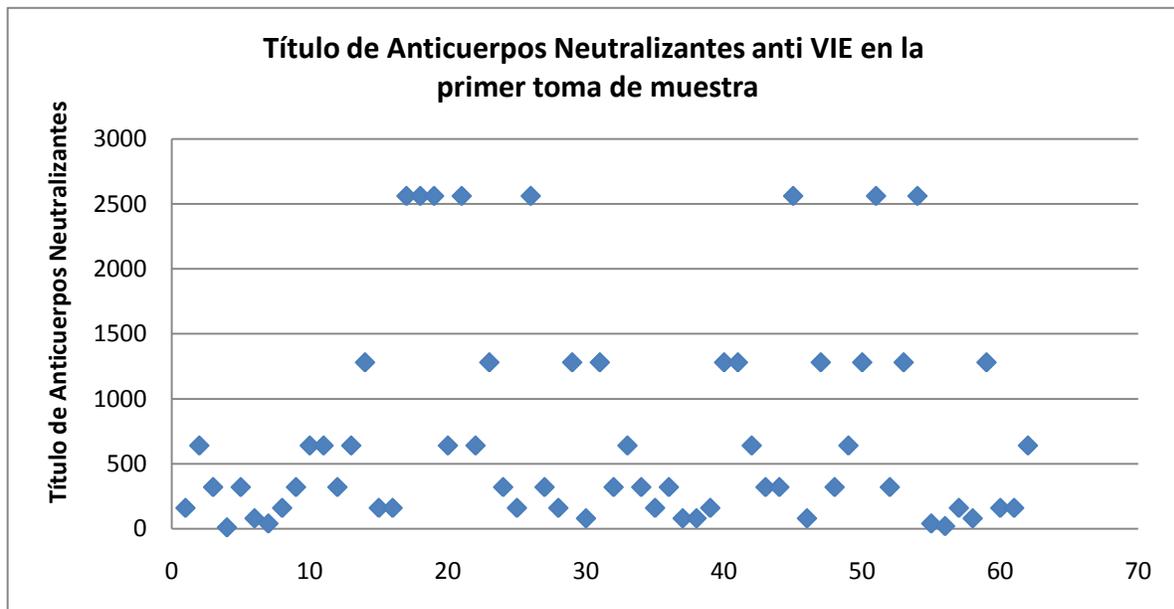


Gráfico 2- Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) en la segunda toma de muestra.

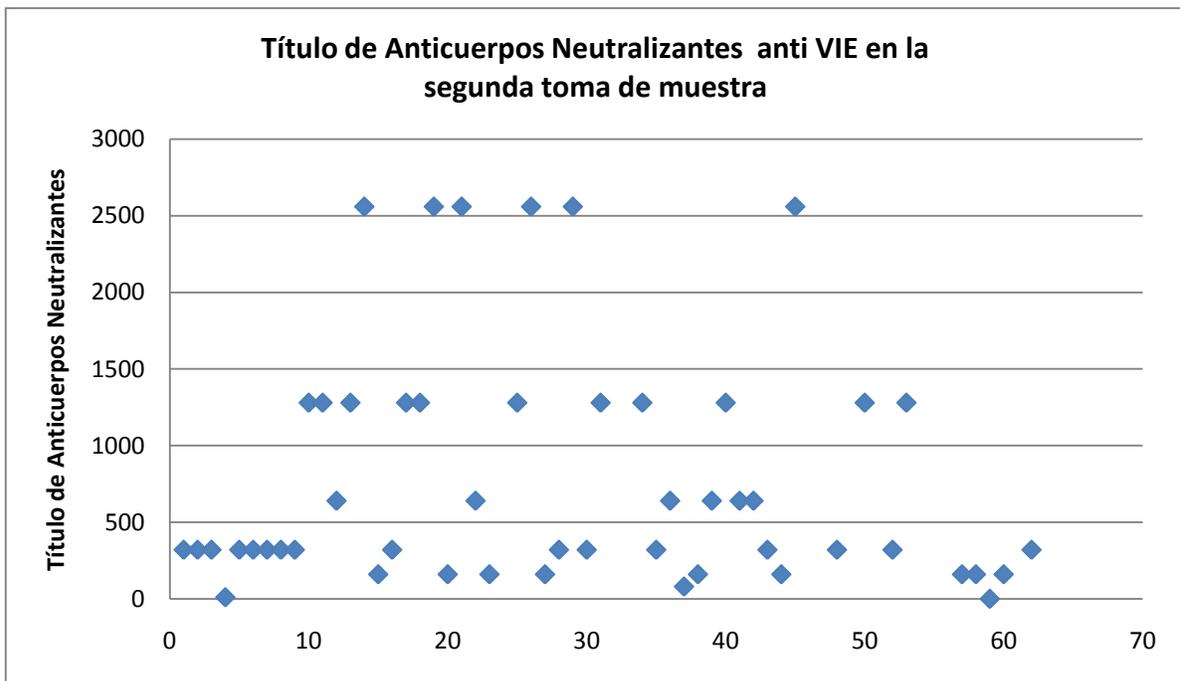


Tabla 15- Porcentaje de animales con cada Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) en las tomas de muestra realizadas sobre el total de animales involucrados en el estudio.

Porcentual Muestras Individuales				
Título HA	Primer toma muestra		Segunda toma muestra	
	Cantidad	Porcentual	Cantidad	Porcentual
10	1	1,61%	1	2,00%
20	1	1,61%	0	0
40	2	3,22%	0	0
80	6	9,67%	1	2,00%
160	11	17,74%	9	18,00%
320	13	20,96%	16	32,00%
640	10	16,12%	6	12,00%
1280	10	16,12%	11	22,00%
2560	8	12,90%	6	12,00%

Tabla 16- Porcentaje de animales con cada Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) superiores a partir de la mínima dilución que involucró al mayor porcentaje de equinos en las tomas de muestra realizadas sobre el total de animales involucrados en el estudio.

Porcentual Muestras Individuales				
Título HA	Primer toma muestra		Segunda toma muestra	
	Cantidad	Porcentual	Cantidad	Porcentual
≥160	52	83,87%	48	96,00%
≥320	41	66,12%	39	78,00%
≥640	28	45,16%	23	46,00%
≥1280	18	29,03%	17	34,00%
≥2560	8	12,90%	6	12,00%

Tabla 17- Porcentaje de animales con Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) considerados susceptibles e inmunes en las tomas de muestra realizadas sobre el total de animales involucrados en el estudio.

Porcentual Muestras Individuales				
Estado	Primer toma muestra		Segunda toma muestra	
	Cantidad	Porcentual	Cantidad	Porcentual
Susceptible	4	6,45%	1	2,00%
Inmunes	58	93,54%	49	98,00%

Tabla 18- Diferencia de Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) entre las tomas de muestra realizadas en total de animales involucrados en el estudio que tuvieron dos tomas de muestras.

Diferencia Título HA ¹	0	+1	+2	+3	-1	-2	-3
Cantidad	21	12	5	2	8	1	1
Porcentual	42,00%	24,00%	10,00%	4,00%	16,00%	2,00%	2,00%

¹ – (+/-) Aumento/ disminución del número de diluciones del Título HA.

9.3 Rhinopneumonitis Equina

Para el diagnóstico serológico de la Enfermedad Rhinopneumonitis Equina se evaluó la presencia de Anticuerpos Neutralizantes anti Herpes Equino tipo 4 (HVE – 4). Dentro de las técnicas recomendadas por las autoridades sanitarias internacionales, se utilizó la Técnica de Seroneutralización in vitro (SN), por formar parte de los procedimientos de rutina del laboratorio. Para ser considerado inmune, un animal debe presentar, mediante la Técnica SN, Títulos de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 igual o superior a 8 (247). Las diluciones seriadas utilizadas en el presente trabajo, fueron de 1: 2 a partir de la muestra de suero pura. De esta manera, se estipuló que animales con Título igual o superior a 8 son considerados inmunes e iguales o inferiores a 4 son considerados susceptibles.

Muestras con aumento de títulos entre la fase aguda y convaleciente de la enfermedad iguales o

superiores a cuatro diluciones, se consideran como diagnosticados positivos a la infección/inmunización reciente con el tipo/subtipo de HVE enfrentado in vitro (247).

El Test SN se realizó por duplicado utilizando como antígeno patrón de HVE - 4, la cepa Kentucky (Equine Research Center, USA).

Los valores de Título SN obtenidos se presentan en las Tablas 19, 20, 21, 22 y Gráficos 3, 4.

En la primer toma de muestra 98.38 % de los animales muestreados presentaron Títulos SN iguales o superiores a 8, es decir, presentaron niveles de anticuerpos considerados suficientes para proteger a los animales de una infección natural, En la segunda toma de muestra, los animales inmunes correspondieron al 96 % del total muestreado.

De los animales inmunes en la primer extracción de sangre, el total presentó títulos de SN iguales o superiores a 64, en la segunda extracción, los que tuvieron estos valores correspondieron al 94%. Dentro de los anteriores grupos de equinos cuyos títulos son ampliamente superiores a los mínimos considerados protectivos, se destaca que en la primera toma de muestra el 91,93 % obtuvieron títulos mayores o iguales a 128 y en la segunda extracción lo hizo el 86 % de los animales. De igual forma, aquellos con títulos SN mayores o iguales a 256, correspondieron al 40,3% en la primer toma y a 58 % en la segunda.

En la primer toma de muestra, tan sólo un animal, que corresponde al 1,6 % de los equinos, presentó Títulos SN iguales o inferiores a 4, considerándose susceptible frente a la infección natural, mientras que para la segunda toma de muestra, este porcentaje aumentó al 2 %, correspondiendo a dos animales.

La Media Geométrica de los títulos obtenidos en la primer muestra fue 201,2 y en la segunda extracción, 401,2.

Acerca de las variaciones de títulos entre la primer y segunda toma de muestras, el 34 % de los equinos se mantuvo incambiado, el 28 % aumentó una dilución, el 12 % disminuyó una dilución, el 12 % aumentó tres diluciones, el 10 % aumentó dos y el 4 % restante, se dividió en pequeños grupos con diferentes variaciones.

Gráfico 3 - Título de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 (Título SN) en la primer toma de muestra

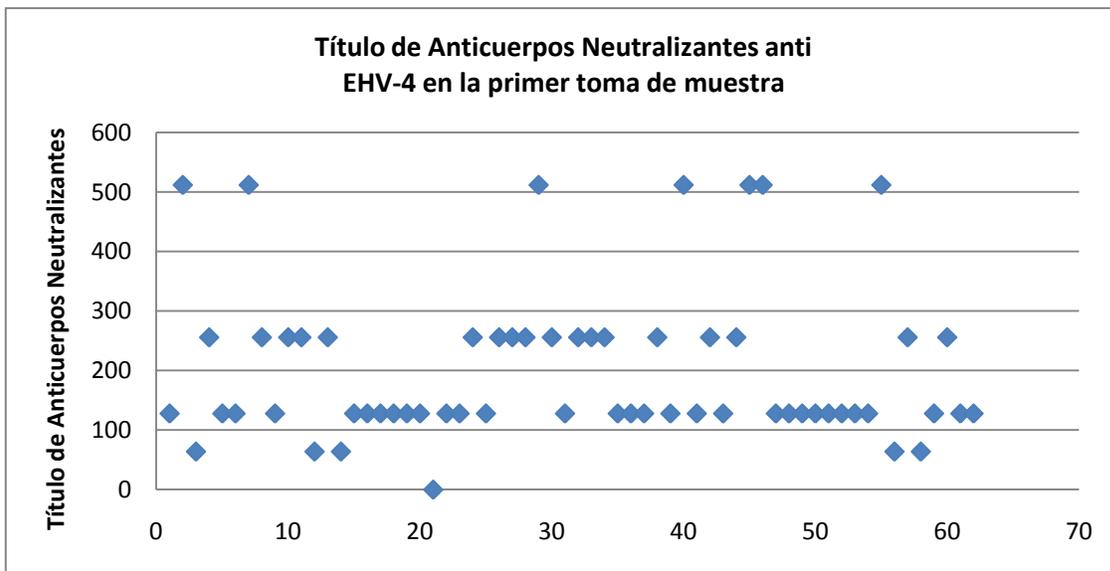


Gráfico 4 Título de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 (Título SN) en la segunda toma de muestra

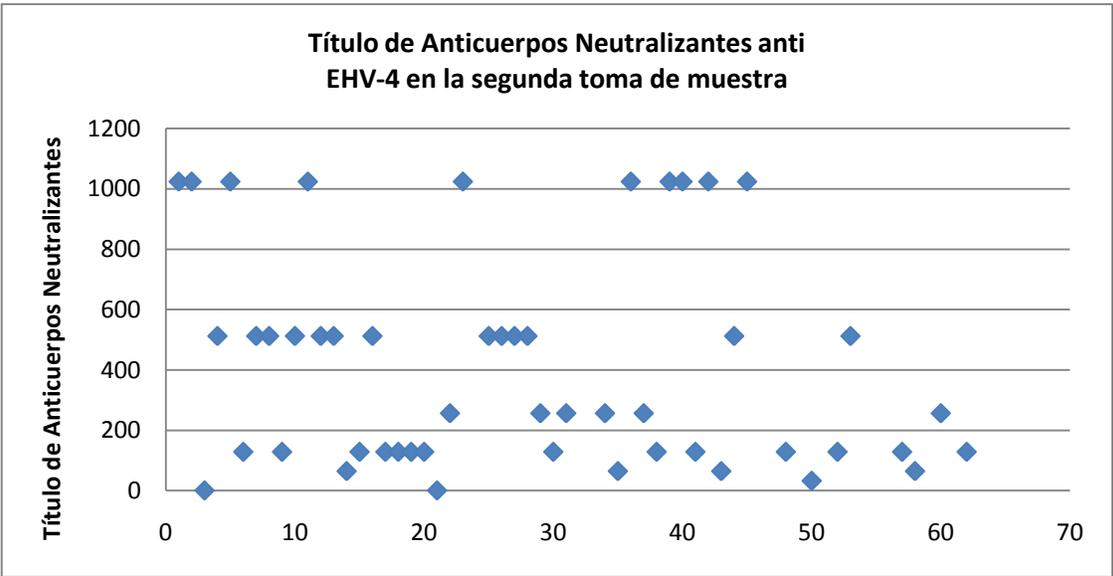


Tabla 19 - Porcentaje de animales con cada Título de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 (Título SN) en las tomas de muestra realizadas sobre el total de animales involucrados en el estudio.

Porcentual Muestras Individuales				
Título SN	Primer toma muestra		Segunda toma muestra	
	Cantidad	Porcentual	Cantidad	Porcentual
0	1	1,61%	1	4,00%
32	0	0	1	2,00%
64	5	8,06%	4	8,00%
128	31	50%	14	28,00%
256	18	29,03%	6	12,00%
512	7	11,29%	13	26,00%
1024	0	0	10	20,00%

Tabla 20 Porcentaje de animales con cada Título de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 (Título SN) superiores a partir de la mínima dilución que involucró al mayor porcentaje de equinos en las tomas de muestra realizadas sobre el total de animales involucrados en el estudio.

Porcentual Muestras Individuales				
Título SN	Primer toma muestra		Segunda toma muestra	
	Cantidad	Porcentual	Cantidad	Porcentual
≥64	61	98,38%	47	94,00%
≥128	57	91,93%	43	86,00%
≥256	25	40,32%	29	58,00%
≥512	7	11,29%	23	46,00%
≥1024	0	0	10	20,00%

Tabla 21- Porcentaje de animales con Título de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 (Título SN) considerados susceptibles e inmunes en las tomas de muestra realizadas sobre el total de animales involucrados en el estudio.

Porcentual Muestras Individuales				
Estado	Primer toma muestra		Segunda toma muestra	
	Cantidad	Porcentual	Cantidad	Porcentual
Susceptible	1	1,61%	2	4,00%
Inmunes	61	98,38%	48	96,00%

Tabla 22- Diferencia de Título de Anticuerpos Neutralizantes anti HVE - 4 (Título SN) entre las tomas de muestra realizadas en total de animales involucrados en el estudio que tuvieron dos tomas de muestras.

Diferencia Título SN ¹	0	+1	+2	+3	-1	-2	-6
Cantidad	17	14	5	6	6	1	1
Porcentual	34,00%	28,00%	10,00%	12,00%	12,00%	2,00%	2,00%

¹ – (+/-) Aumento/ disminución del número de diluciones del Título HA.

9.4 Comparación entre virus estudiados

En referencia a las variaciones de títulos de Anticuerpos Neutralizantes entre ambos virus estudiados, se destacan aquellas que correspondieron a los mayores porcentajes de animales. El 14% de los equinos mantuvo su nivel de AN incambiado en ambas tomas de muestra para ambos virus, otro 14% se mantuvo incambiado para VIE y aumentó una dilución para HVE-4, un 8 % de los animales disminuyó una dilución para VIE y no tuvo variaciones para HVE-4 y otro 8 % aumentó una dilución para ambos virus. El total de la comparativa entre variaciones se evidencia en la tabla 23.

Tabla 23- Diferencia de Título de Anticuerpos Neutralizantes anti VIE (Título HA) y anti HVE - 4 (Título SN) entre las tomas de muestra realizadas en total de animales involucrados en el estudio que tuvieron dos tomas de muestras.

Diferencia Título de Anticuerpos Neutralizantes ¹																						
VIE	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	3	-2	-3
HVE-4	3	1	0	2	-1	1	0	-1	3	1	-6	0	2	-1	-2	3	0	-1	0	2	0	3
Total	3	4	1	2	2	3	4	1	1	7	1	7	2	2	1	1	3	1	1	1	1	1
(%)	6	8	2	4	4	6	8	2	2	14	2	14	4	4	2	2	6	2	2	2	2	2

¹ – (+/-) Aumento/ disminución del número de diluciones del Título de AN

10. DISCUSION

10.1 Importancia del presente estudio

Durante los últimos años, ha habido un número creciente de enfermedades infecto contagiosas en el mundo, que afectan especialmente a las reuniones de carreras de alto perfil y eventos competitivos en instituciones deportivas.

Gran parte de los brotes de las enfermedades infectocontagiosas más relevantes y de mayor morbilidad se suceden al comienzo del invierno y corresponden a las provocadas por los virus HVE – 4 e Influenza Equina.

Frente a esta situación, se hace imperiosa la necesidad de adoptar medidas de control para la prevención, investigación y mitigación de los brotes de estas enfermedades. Para desempeñar esas funciones con eficacia, es fundamental la adjudicación de recursos para la preparación y planificación de estrategias de diagnóstico y control dirigidas a maximizar la salud, la productividad y el rendimiento de los caballos.

La vacunación es generalmente una buena medida, aunque su protección es casi siempre <100%. Las vacunas no pueden evitar la propagación de enfermedades infecciosas por completo en un brote, sin embargo, pueden y deben ayudar a reducir la severidad de la enfermedad. Para el estudio de la efectividad de los programas de vacunación como prevención de enfermedades infecciosas recomendados por las autoridades, es importante poder evaluar el nivel de protección que generan mediante el uso de técnicas de cuantificación de Anticuerpos circulantes, puesto que si no se encuentra el historial de vacunación o nunca se ha aplicado un plan de inmunización antes de la vacunación de cara al brote, las opciones son muy limitadas.

El Hipódromo Nacional de Maroñas es un establecimiento de pupilaje permanente y de tránsito de equinos, Las condiciones en estas instalaciones de espectáculos deportivos en áreas de entrenamiento y carreras son ideales para la introducción y transmisión de HVE – 4 e Influenza Equina. La introducción y la mezcla de caballos de diferentes edades y orígenes y la alta proporción de potrillos, caballos susceptibles y yeguas preñadas susceptibles, crean una situación que plantea la necesidad de contar con pruebas de detección para determinar el nivel de inmunidad protectora contra estos virus e impedir la entrada o el movimiento de la infección en estas instituciones deportivas.

Más aun, cuando nos enfrentamos a un brote de enfermedad respiratoria de similar curso y características clínicas, es imperiosa la necesidad de utilizar estas mismas pruebas de diagnóstico

para identificar el agente y delinear las estrategias de manejo específicas de cada virus para contribuir al estudio y monitoreo de las enfermedades respiratorias estacionales en instalaciones hípicas.

La eficacia del control de las enfermedades virales infectocontagiosas, y más aun de Influenza Equina, depende de varios factores, entre los que se destacan la vacunación y el control sanitario en el movimiento de los equinos.

El control sanitario se basa, entre otros aspectos, en la minuciosa inspección clínica de cada animal, teniendo en cuenta que estas enfermedades pueden cursarse en forma subclínica, dificultando su detección (41). En diversos países, se han registrado brotes de Influenza en animales vacunados regularmente; existen dos explicaciones para que esto suceda. La primera razón sería un esquema de vacunación inadecuado, incapaz de garantizar protección entre dosis. La segunda explicación sería un acumulo de mutaciones, muchas de las cuales serían puntuales, en el genoma del virus circulante, en especial en el gen que codifica la Hemaglutinina, y por lo tanto esta cepa circulante presenta características antigénicas y genómicas distintas a las del virus de la vacunal (135).

Un régimen vacunal inadecuado se soluciona estableciendo un régimen más riguroso, con menores tiempos entre dosis.

Uno de los objetivos del trabajo, fue evaluar la eficacia del actual régimen de vacunación de administración de dosis cada cuatro meses, establecido por las autoridades hípicas nacionales y documentado para todos los animales del presente estudio.

Cuando el problema es causado por acumulación de mutaciones puntuales del virus, se presentan características antigénicas y genómicas nuevas que determinan la aparición de un nuevo linaje, cocirculante con la cepa original (42), problema que ha subsistido desde 1963 en el subtipo H3N8, comprometiendo la eficacia de las vacunas utilizadas (35).

Al ocurrir esto, la vacuna no confiere inmunidad contra la muestra circulante, y el animal que posee altos títulos de anticuerpos, ante la exposición a la nueva cepa, se infectará. En ese caso, es necesario hacer una nueva formulación de las vacunas, para que estas posean muestras representativas de las cepas circulantes (132).

En el futuro, se destaca la importancia de realizar estudios que caractericen las cepas circulantes, para colaborar con la red de laboratorios de referencia en el estudio y evaluación de la situación actual de Influenza Equina en el Uruguay.

10.2 Evaluación del nivel de protección contra VIE y HVE – 4 generado por los programas de vacunación

El Reglamento de Carreras que regula la Actividad Hípica en el Hipódromo Nacional de Maroñas, basado en las recomendaciones internacionales establece que todo caballo inscripto para correr deberá tener la documentación y esquema sanitario vigente. El Esquema Sanitario comprende, entre otros estudios, la certificación de vacunas de Influenza Equina y Rhinopneumonitis Equina (HVE1 y HVE-4). La vigencia de cada dosis de vacunación se establece en cuatro meses. Así mismo, al no ser exigencia sanitaria para la importación la vacunación contra Rhinopneumonitis (HVE1 y HVE-4), estos equinos deben ser vacunados contra esta enfermedad en Uruguay.

Dentro de las técnicas recomendadas por las autoridades sanitarias internacionales para evaluar el nivel de Anticuerpos Neutralizantes contra HVE – 4 (247), se utilizó la Técnica de Seroneutralización in vitro (SN), por formar parte de los procedimientos de rutina del laboratorio. La glicoproteína Hemaglutinina (HA) es un factor determinante en la patogenicidad del virus Influenza, y la correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti HA, evaluados por la Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), reflejan el nivel de protección de los animales frente al subtipo H3N8 (245, 246).

El Test de IHA se realizó por duplicado utilizando el antígeno patrón A/Newmarket/1/93, representando el linaje Americano. Se seleccionó este linaje, por ser el que mayor semejanza antigénica posee con la cepa incluida en las vacunas comerciales factibles de circular según las recomendaciones internacionales (245, 246).

Las vacunas comerciales utilizadas para inmunizar a los animales del presente estudio presentan en su formulación la cepa A/Newmarket/1/93, y la A/eq/Kentucky/97, las cuales pertenecen al linaje Americano y la A/Newmarket/2/93, que pertenece al linaje Europeo.

Determinar el nivel de inmunidad protectora contra los virus causantes de las enfermedades Influenza Equina y Rhinopneumonitis Equina al momento del brote de enfermedad respiratoria.

Para realizar un análisis de la inmunidad protectora contra VIE, se observan los valores de Títulos HA presentados en las Tablas 15 y en los Gráficos 1 y 2.

En la primera toma de muestra 93,5 % de los animales muestreados presentaron niveles de anticuerpos considerados suficientes para protegerlos frente a una infección natural, del mismo modo, en la segunda toma de muestra, los animales inmunes correspondieron al 98 % del total muestreado.

Con respecto a la inmunidad contra HVE – 4, presentados en la Tabla 19 y Gráficos 3,4, se

observa que en la primer toma de muestra 98.38 % de los animales presentaron niveles de anticuerpos considerados suficientes para proteger a los animales de una infección natural y en la segunda toma de muestra, los animales inmunes fueron el 96 % del total.

Lo anterior evidencia que un esquema vacunal que establece vigencias de cada dosis de vacunación en cuatro meses, es suficiente para asegurar niveles de anticuerpos contra ambos virus, para la mayoría de los equinos muestreados. Lo que es más, el esquema vacunal prevé títulos ampliamente superiores a los mínimos establecidos por las autoridades internacionales, pues si se observa la Tabla 16 para VIE y la Tabla 20 para HVE-4, de los animales inmunes en la primer extracción de sangre para VIE, el 83,87 % presentaron títulos de HA iguales o superiores al doble de lo requerido, y en la segunda extracción, lo fue el 96 % de los equinos.

Entre tanto para HVE – 4, el total de los animales presentó títulos de SN iguales o superiores al cuádruple de lo necesario para ser considerado inmune dentro de la primera extracción de sangre, y en la segunda extracción, estos correspondieron al 94 %.

Los valores de títulos de Anticuerpos obtenidos confirman los resultados positivos de aplicar el actual programa de vacunación, basado entre otros, en los requisitos actuales de la Federación Ecuéstre Internacional (FEI), bajo las recomendaciones de la OIE (246, 247).

Según los expertos de la OIE los calendarios de vacunación para las vacunas con virus inactivado requieren dos dosis con 4 a 6 semanas de diferencia seguido de dosis de refuerzo anual. Actualmente, los requisitos impuestos por la Federación Ecuéstre Internacional (FEI) para competencias, indican necesario dos dosis de 4 a 6 semanas de separación y seis meses más tarde, una tercera dosis, seguido de refuerzos bianuales, con administración de dosis extra en situaciones de riesgo, como pueden ser las temporadas de exposición y venta y previo a los brotes otoñales de enfermedades respiratorias.

10.3 Evidencias de la posible circulación de cepas de VIE y/o HVE – 4

Para el estudio de este objetivo se adquirieron muestras de suero pareado, y así obtener un diagnóstico serológico confiable de infección por VIE y/o HVE – 4. La muestra de suero en fase aguda se obtuvo dentro de los 2 - 3 días del comienzo de la enfermedad, y la muestra convalescente aproximadamente 3 semanas después. De acuerdo a las autoridades sanitarias, un resultado con incremento en cuatro diluciones o mayor en el título de anticuerpos específicos contra el virus entre las muestras de suero del estado agudo y convalescente, se consideró positivo

a la infección/ inmunización reciente con el tipo/subtipo de VIE y/o HVE - 4 enfrentado in vitro. Debido a que los Anticuerpos Neutralizantes inducidos por la vacunación puede confundir la interpretación de resultados serológicos, se tuvo en cuenta la historia de la vacunación del animal para asegurar que la seroconversión refleje la infección en lugar de una reciente vacunación con VIE y/o HVE - 4. De acuerdo al estudio de los certificados de sanidades presentadas al Servicio Veterinario del Departamento de Carreras del Hipódromo de Maroñas, se contaba con la fecha exacta declarada de la última dosis de vacunación contra VIE y/o HVE - 4, lo cual comprobó la veracidad de la información declarada por los responsables de los equinos.

Para analizar una posible infección evidenciada en el aumento de Título de Anticuerpos para ambos virus, se analizan los resultados presentados en las tablas 18, 22 y 23.

No se vio aumento de cuatro diluciones en los Títulos de Anticuerpos de VIE o HVE - 4 en ninguno de los equinos estudiados.

Para VIE, destacamos que el 42 % de los equinos que se mantuvo incambiado, eran inmunes a la infección natural, aun desde la primera toma de muestra, ya que el 83,87 % tenían títulos ampliamente superiores a los mínimos requeridos. Entre los animales que sufrieron variaciones en sus títulos, no se destacan aumentos significativos, pues el 24 % aumentó una dilución, el 16 % disminuyó una dilución y el porcentaje restante, se dividió en pequeños grupos con diferentes variaciones. De esta manera, se descarta la inmunización reciente con el VIE, por lo que se avala la veracidad de la falta de vacunación dentro del mes anterior al estudio presentadas en las certificaciones sanitarias y se descarta también la infección reciente con el VIE. Indirectamente, no se puede demostrar con este estudio, la circulación de alguna cepa de VIE en las instalaciones hípicas estudiadas.

Lo mismo sucede con HVE - 4, en que el total de los animales presentó títulos de SN iguales o superiores al cuádruple de lo necesario para ser considerados inmunes a la infección natural, sin presentar variaciones significativas entre la primer y segunda toma de muestra, ya que el 34 % de los equinos se mantuvo incambiado, el 28 % aumentó una dilución, el 12% disminuyó una dilución, el 12% aumentó tres diluciones, el resto se dividió en pequeños grupos con diferentes variaciones.

Al igual que con VIE, no se puede demostrar con este estudio, la circulación de alguna cepa de HVE - 4 que conlleve a la infección reciente con el VIE y se avala la falta de vacunación con este virus en mes anterior al estudio, como se observa en las certificaciones sanitarias.

Cabe destacar que de acuerdo a lo observado en las certificaciones sanitarias, las vacunaciones de todos los equino se realizaron con formulaciones combinadas de VIE y HVE - 4, por lo que se estudió la similitud de variaciones en ambos virus, como forma de demostración de la falta de

vacunación reciente. En el análisis de la tabla 23, la cual hace referencia a las variaciones de títulos de AN entre ambos virus estudiados, no hubo significativa similitud de aumento de títulos en los grupos de mayor porcentaje de animales, sino que esta variación fue prácticamente aleatoria. Es decir, el 14% de los equinos mantuvo su nivel de AN incambiado para ambos virus, otro 14 % se mantuvo incambiado para VIE y aumentó una dilución para HVE-4, y el resto se dividió en grupos menos populosos con aumento o disminución de una o dos diluciones para uno u otro virus, mientras el otro permanece incambiado.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos específicos planteados, no se evidenciaron resultados que aporten a la determinación de los agentes causales de los brotes de cuadros clínicos compatibles con enfermedad del tracto respiratorio observados en equinos Pura Sangre de Carrera en las instalaciones del Hipódromo Nacional de Maroñas en Junio del 2006.

1- Se evaluó en forma satisfactoria el nivel de protección generado por los programas de vacunación para la prevención de enfermedades infecciosas llevados adelante por las autoridades nacionales. El actual esquema de vacunación prevé títulos de los virus estudiados ampliamente superiores a los mínimos establecidos por las autoridades internacionales, Por lo tanto los animales muestreados presentaron niveles de anticuerpos considerados suficientes para protegerlos frente a una infección natural.

2- Se determinó un alto nivel de inmunidad protectora contra los virus causantes de las enfermedades Influenza Equina y Rhinopneumonitis Equina al momento del brote de enfermedad respiratoria.

3-No se aportaron evidencias de la posible circulación de cepas de VIE y/o HVE durante el brote.

4- Se cree haber contribuido al estudio y monitoreo de enfermedades respiratorias estacionales en instalaciones hípicas.

La eficacia del control de las enfermedades virales infectocontagiosas, y más aun de Influenza Equina, depende de varios factores, entre los que se destacan la vacunación y el control sanitario en el movimiento de los equinos.

El uso de técnicas de cuantificación de Anticuerpos circulantes para determinar el nivel de inmunidad protectora contra estos virus permite impedir la entrada o el movimiento de la infección en las instituciones deportivas.

Al enfrentarnos frente a un brote de enfermedad respiratoria de similar curso y características clínicas, es útil utilizar estas mismas pruebas de diagnóstico para identificar el agente y delinear las estrategias de manejo específicas de cada virus y contribuir al estudio y monitoreo de las enfermedades respiratorias estacionales en instituciones deportivas.

12. REFERENCIAS

12.1 Influenza Equina

- 1 – Studdert M.J. Orthomyxoviridae. In: Studdert M.J. (ed.): Virus Infections of Equines, 1996: 281 – 284.
- 2 – Skehel J.J. and Schild G.C. The polypeptide composition of Influenza A viruses. *Virology*, 1971; 44: 396 – 408.
- 3 – Saito T. Kausoks Y. and Webster R.G. Phylogenetic analysis of the N8 neuraminidase gene of Influenza A viruses. *Virology*, 1993; 193: 868 – 876.
- 4 – Gorman O.T., Bean W.J., Kawaoka Y. et al.: Evolution of the nucleoprotein gene of Influenza A virus. *J. Virol*, 1990; 64: 1487 – 1497.
- 5 – Guo Y. Wang M., Zheng S. et al.: Characterization of a new avian like Influenza A virus from horses in China. *Virology*, 1992; 188: 245 255.
- 6 – Plateau I.I., Crucière C., Gayot G.: Derive antigénique d'une souche de virus Influenza equi isolée en France au cours de l'hiver 1978 – 1979, 1983; , *Ann Rech Vet* 14: 71 – 77.
- 7 – Gibson C.A., Daniels R.S., McCauley J.W. et al.: Hemagglutinin gene sequencing studies of equine Influenza A viruses, Powell D.G. (ed): *Equine Infectious Diseases V*. Lewington, University Press of Kentucky, 1988: 51 – 59.
- 8 – Gibson C.A., Daniels R.S., Oxford J.S., et al.: Sequence analysis of the equine H7 Influenza virus hemagglutinin gene, *Virus res.*, 1992; 22: 93 – 106.
- 9 – Mumford J.: Progress in the control of equine influenza, Plowright W., Rosedale P.D., Wade J.F. (ed), *Proc. 6th Int. Conference on Equine infectious diseases*, Cambridge, 1992: 207–218
- 10 – Schollens R.G., Steele J.I.I.: US epizootic of equine Influenza, 1963; *Public Health Rep.*, 1964; 79: 393 – 402.
- 11 – Wadell G.H., Tegland M.B., Sigel M.M.: A new Influenza virus associated with equine respiratory disease, *J Am Vet Med Assoc.*, 1963; 590: 143 – 227.
- 12 – Baker D.: Rationale for the use of Influenza vaccines and the importance of antigenic drift, *Equine Vet J.*, 1986; 18: 93 – 96.
- 13 – Webster R.G., Hinshaw V.S., Bean W.J. et al.: Influenza transmission between species. *Phil Trans R. Soc. Lond. (Biot.)* 1980; 288: 439 – 447.
- 14 – Burrows R. Denyer M., Goodridge D. et al.: Field and laboratory studies of equine Influenza viruses isolated in 1979: *Vet Rec.*, 1981; 109. 353 – 356.

- 15 – Burrows R., Goodridge D., Denyer M., et al.: Equine Influenza infections in Great Britain, 1979, *Vet Rec.*, 1982; 110: 494 – 497.
- 16 – Hinshaw V.S., Naeve C.W., Webster R.G. et al.: Analysis of antigenic variation in equine 2 Influenza A viruses, *Bull World Health Org.*, 1983; 61: 143 – 158.
- 17 – Kawaoka Y., Bean J.W., Webster R.G.: Evolution of the Hemagglutinin of equine H3 Influenza viruses, *Virology*, 1989; 169: 283 – 292.
- 18 – Kudo H. Ohde H., Yamanaka T.: Hemagglutination inhibiting antibodies ti equine Influenza viruses in Japanese horses and antigenic variation of the viruses, *Kimsato Arch Exp. Med.*, 1986; 59: 49 – 55.
- 19 – Plateau E., Jacquet A., Chayroux M.: A study of the serological response of horses to Influenza vaccination: Comparison of protocols and types of vaccines. In Powell D.G. (ed): *Equine infectious diseases V.* Lexington, University Press of Kentucky, 1988: 94 – 99.
- 20 – Livesay G.I., Yadav M.P., O'Neill T. et al.:The outbreak of equine Influenza (H3N8) in Britain in 1989, In Plouright W., Rossdale P.D., Wade J.F. (ed): *Equine infectious Diseases V.I.* Newmarket, R. and W. Publications, 1991: 321.
- 21 – Guo Y., Wang M. Zineng S. et al.: Actiologic study on an Influenza like epidemic in horses in China, *Acta Virol.*, 1990; 64: 190 – 195.
- 22 – Plateau E. Crucière C. Virat J. et al.: Grippe équine; Isolement, caractérisation et étude sérologique dans divers foyers au cours de l'épizootie 1978 – 1979, *Bull Acad Vet France*, 1979; 52: 189 – 194.
- 23 – Powell D.G.: Viral respiratory disease of the horse, *Vet Clin. North Am. Equine Pract.*, 1991; 7: 27 – 52.
- 24 – Coggins L., Viral respiratory disease, *Vet Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 1979; 1: 59 – 72.
- 25 – Van Maanem C., Bruin G., de Boer – Luitze E., et al: Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine Influenza, *Vet Q*, 1992; 14: 13 – 17.
- 26 – Madie J., Martinovie S., Naglic T., Hajsig D. and Cvetnic S. Serological evidence for the presence of A/equine/1 Influenza virus in unvaccinated horses in Croatia. *Veterinary Record*, 1996; 138: 68.
- 27 – Mumford J.A., The diagnosis and control of equine Influenza, *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, 1990; 36: 377 – 385.
- 28 – Burrows R., Goodridge D., Denyer M. and Hutchings G.: Equine linfluenza infections in Great Britain, 1979. *Veterinary Records*, 1979; 110: 494 – 497.
- 29 - Burrows R., Denyer M.; Antigenic properties of some influenza viruses. *Archives of Virology*, 1982; 73: 15 – 24.

- 30 – Klingeborn R., Roekborn G. and Dinter Z.: Significant drift with the influenza equi/2 subtype in Sweden. *Veterinary Record*, 1980; 106: 363 – 364.
- 31 – Plateau E. Crucière C. Virat J. et al.: Grippe équine; Isolement, caractérisation et étude sérologique dans divers foyers au cours de l'épizootie 1978 – 1979, *Bull Acad Vet France*, 1979; 52: 189 – 194.
- 32 – Van Oirschot J.T., Masurel N., Hulfels A.D.N.H.J. and Anker W.J.J.: Equine influenza in the Netherlands during the winter of 1978 – 1979; Antigenic drift of the A/equi/2 virus. *Veterinary Quarterly*, 1982; 3: 80 – 84.
- 33 – Guthne A.J., Stevens K.B., and Bosman P.P.: The circumstances surrounded the outbreak and spread of equine influenza in South Africa. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 1999; 18: 179 – 185.
- 34 – Hannant D. and Mumford J.A.: Equine influenza; Studdert M.J. (ed.): *Virus infections of equines*, 1996: 335 – 293.
- 35 – Binns M.M., Mumford J.A., Yadav M.P., Gupta A.K., Uppal P.K. and Wood J. : Characterization of recent equine influenza virus H3N8 isolates. *Proceedings, 6th International Conference of Equine Infectious Diseases*. Newmarket, 1991: 303.
- 36 – Kawaoka Y., Bean J.W., Webster R.G.: Evolution of the Hemagglutinin of equine H3 Influenza viruses, *Virology*, 1989; 169: 283 – 292.
- 37 – Livesay G.I., Yadav M.P., O'Neill T. et al.:The outbreak of equine Influenza (H3N8) in Britain in 1989, In Plouright W., Rossdale P.D., Wade J.F. (ed): *Equine infectious Diseases V.I*. Newmarket, R. and W. Publications, 1991: 321.
- 38 - Mumford J.A., Wood J., Conference report on WHO/OIE meeting: Consultation on newly emerging strains of equine influenza, *Vaccine*, 1993; 11: 1172–1175.
- 39 – Webster R. and Guo Y.J. New influenza virus in horses. *Nature*, 1991: 351 – 527.
- 40 – Guo Y.J., Wang M., Zheng G.S., Li W.K., Kawaoka Y. and Webster R.G.: Seroepidemiological and molecular evidence for the presence of two H3N8 equine influenza viruses in China in 1993 – 1994, *Journal of General Virology*, 1995; 76: 2009 – 2014.
- 41 – Daly J.M., Lai A.C.K., Binns M.M., Chambers T.M., Barrandeguy M. and Mumford J.A.: Antigenic and genetic evolution of equine influenza H3N8 viruses. *Journal of General Virology*, 1996: 77: 661 – 671.
- 42 - Mumford J.A., Wood J., Chambers T.M.: Consultation of OIE and WHO experts on progress in surveillance of equine influenza and application to vaccine strain selection. Report of a meeting held at the Animal Health Trust, Newmarket, U.K., September 1995; 18 – 19.
- 43 – Lai A.C., Chambers T.M., Holland R.E. Jr., Morley P.S., Haines D.M., Townsend H.G. and

Barrandeguy M.: Diverged evolution of recent equi/2/influenza H3N8 viruses in the Western Hemisphere. *Archives of Virology* 2001; 146: 1063 – 1074.

44 – Van Maanen C.: Equine herpesvirus 1 and 4 and equine influenza virus infections: diagnosis, epidemiology and vaccinology. Phd Thesis Utrecht University, The Netherlands, 2001.

45 – Bobi C.P., Nicoloson C., Taylor J., Mumford J.A., Wood J.M. and Robertson J.S.: Direct sequencing of the HA gene of cronical equine H3N8 influenza virus and comparison with laboratory derived virus. *Archives of Virology*, 1998; 143: 891 – 901.

46 – Nelly M.: Characterization of equine influenza virus isolates from the 1989 and 1992 influenza outbreaks in Ireland by nucleotide sequence determination of the hemmagglutinin molecule. M. Sc. Thesis, National University of Ireland, 1996.

47 – Gerber H., Bryans J.T., (eds.): Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. *Equine infectious diseases I.J.* New York, Karger, 1969: 63 – 80.

48 – Appleton J.A. Gagliardo LF. Fine specificity of the equine antibody response to the influenza virus. *Proceedings 6th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Newmarket, 1991: 259 – 262.

49 – Coggins L., Viral respiratory disease, *Vet Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 1979; 1: 59 – 72.

50 - Mumford J.A., The diagnosis and control of equine Influenza, *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, 1990; 36: 377 – 385.

51 - Mumford J.A.: Respiratory viral disease. *Current Therapy in Equine Medicine 3*, Philadelphia, W.B. Saunders, 1992: 316 – 324.

52 - Mumford J.A., Hannant D., Jessel D.M.: Experimental infection of ponies with equine influenza H3N8 viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Vet Journal*, 1990; 22: 93 – 98.

53 - Mumford J.A., Wood J.M., Scott A.M. et al.: Studies with inactivated equine influenza vaccine 2. Protection against experimental infection with equine influenza virus A/equi/Newmarket/79 (H3N8). *Hyg Camb.*, 1983; 90: 385 – 395.

54 - Mumford J.A., Hannant D., Jessel D.M.: Experimental infection of ponies with equine influenza H3N8 viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Vet Journal*, 1990; 22: 93 – 98.

55 - Mumford J.A. Progress in the control of equine influenza. *Proceedings 6th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Newmarket, 1991: 207 – 219.

56 - Mumford J.A.: Respiratory viral disease. *Current Therapy in Equine Medicine 3*, Philadelphia, W.B. Saunders, 1992: 316 – 324.

- 57 – Beech J.: Infectious caused by viruses. *Equine Respiratory Disorders*, Philadelphia, Lea and Peblerg, 1991: 153 – 180.
- 58 - Willoughby R., Ecker G., McKee S. et al.: The effects of equine rhinovirus, influenza virus and herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses., *Can. J. Vet Res.*, 1992; 56:115 - 121.
- 1.59 - Beveridge W.I.B., Mahaffey L.W., and Rose M.A.: Influenza in horses, *Vet. Rec.*, 1965; 77: 57 - 59.
- 60 - Gerber H.:The clinical differentiation of some equine viral diseases., *Proceedings of the 5th BEVA Congress*, 1966: 3 -16.
- 61 - Gerber H.: Equine influenza: Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza, *Proceedings of the 2nd Int. Conf. Eq. Inf. Dis.*, 1970: 63 - 80.
- 62 - Mumford J.A., Wood J.M., Folkers C. et al.: Protection against experimental infection with influenza virus A/equine /Miami/63 (H3N8) provided by inactivated whole virus vaccines containing homologous virus, *Epidem Inf.*, 1988; 100: 501 - 510.
- 63 - Mumford J.A., Hannant D., and Jessett D.M.: Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols., *Equine Vet J.*,1990; 22: 93 - 98.
- 64 - Miller W.C.: Equine influenza: further observations on the "coughing" outbreak. *Vet Rec.*, 1965; 77: 455 - 456.
- 65 - Jaeschke G., Lange W.: Beobachtungen bei equinen Influenza - Epidemien mit viraler Antigendrift in Berlin, 1988 – 1991; *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1993; 106: 119 - 123.
- 66 - Newton J , Mumford J.: Equine influenza in vaccinated horses, *Vet Rec* , 1995: 495 - 496.
- 67 – Peterhans D., Zaroni R. and Bertoni G.: How to succeed as a virus: strategies for dealing with the immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999; 72: 111 – 117.
- 68 – Slater J. and Hannant D.: Equine immunity in viruses. *Veterinary Clinics of North American Equine Practitioners*, 2000; 16: 1409 – 1414.
- 69 - Mumford J.A., Wood J.M., Scott A.M. et al.: Studies with inactivated equine influenza vaccine 2. Protection against experimental infection with equine influenza virus A/equi/Newmarket/79 (H3N8). *Hyg Camb.*, 1983; 90: 385 – 395.
- 70- Mumford J.A., Wood J.M., Folkers C., Schild G.C.: Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Miami/63 (H3N8) provided by inactivated whole virus vaccines containing homologous virus, *Epidemiol. Infect.*,1988; 100: 501 – 510.
- 71- Mumford J.A., Wilson H., Hannant D., Jessett D.M.: Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant, *Epidemiol. Infect.*, 1994; 112: 421 – 437.
- 72 – Toensend H.G.G., Murley P.S., Newton R., Wood J.L.N., Llaines D.M. And Mumford J.A.:

Measuring serum antibody as a measure of prediction infection and disease in horses during outbreaks of influenza. Proceedings 8th International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, 1998; 33 – 37.

73 - Newton J.R., Verheyen K., Wood J.L.N., Yates P.J., Mumford J.A.: Equine influenza in the United Kingdom in 1998, *Vet. Rec.*, 1999; 145: 449 – 452.

74 - Newton J.R., Townsend H.G., Wood J.L., Sinclair R., Hannant D. and Mumford J.A.: Immunity of equine influenza: Relationship of vaccine induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equi/2 viruses (H3N8). *Equine Veterinary Journal*; 2000; 32: 65 – 74.

75 - Wood J.M., Mumford J.A., Folkers C., Scott A.M. And Schild G.C.: Studies with inactivated equine influenza vaccine: serological responses of ponies to graded doses of vaccine. *Journal of Hygiene*, 1983; 90: 371 – 384.

76 – Nelson K.M., Schram A.R., McGregor M.W., Sheoran A.S., Olsen C.W., and Lunn C.P.: Local and systemic isotype specific antibody responses to equine influenza viruses infection versus conventional vaccination. *Vaccine*, 1998; 16: 1306 – 1313.

77- Rouse B.T., Ditchfield J.B.: The response of ponies to Myxovirus influenzae A/equi/2. The protective effect of serum and nasal antibody against experimental challenge, *Res. Vet. Sci.*, 1970; 11: 503 – 507.

78 – Mumford E.L., Traub Dargatz J.L., Salman M.D., Collins J.K., Gerzy D.M. And Carman J. Monitoring and detection of acute viral respiratory tract disease in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1998; 213: 385 – 390.

79 – Robi C.P., Henfrey R., Robertson J.S., Mumford J.A., Erasmus B.J. and Wood J.M.: Antigenic and molecular characterization of host cell- mediated variants of equine H3N8 influenza viruses. *Journal of General Virology*, 1994; 75: 669 – 673.

80 – Oxburgh L. and Hagstrom A.: A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. *Veterinary Microbiology*, 1999; 67: 161 – 174.

81 - Birch-Machin I., Rowan A., Pick J., Mumford J., Binns M.: Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of Anti-NS1 antibody in post infection equine sera. *Journal of Virol. Methods*, 1997; 65: 255 – 263.

82 - Ozaki H., Sugiura T., Sugita S., Imagawa H., Kida H.: Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet. Microbiol.*, 2001; 82: 111 – 119.

83 - Cook R.F., Sinclair R., Mumford J.A.: Detection of influenza nucleoprotein antigen in nasal

secretions from horses infected with A/ equine influenza (H3N8) viruses, *J. Virol. Methods*, 1988; 20: 1 – 12.

84 - Livesay G.J., O'Neill T., Hannant D., Yadav M.P., Mumford J.A.: The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989: diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet. Rec.*, 1993; 133: 515 – 519.

85 - Chambers T.M., Shortridge K.F., Li P.H., Powell D.G., Watkins K.L.: Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. *Vet. Rec.*, 1994; 135: 275 – 279.

86 - Yewdell J.W., Hackett C.J.: The specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses. Krug R. (ed.). *The influenza viruses*, Plenum Press, New York/ London, 1989: 361 – 429.

87 - Couch R.B., Kasel J.A.: Immunity to influenza in man. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1983; 37: 529 – 549.

88 - McMichael A.J., Gotch F.M., Cullen P., Askonas B.A., Webster R.G.: Cytotoxic T cell immunity to influenza. *N. Engl. J. Med.*, 1983; 309: 13 – 17.

89 - Hannant D., Mumford J.A.: Cell mediated immune responses in ponies following infection with equine influenza virus (H3N8): the influence of induction culture conditions on the properties of cytotoxic effector cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1989; 21: 327 – 337.

90 - Nelson K.M., Schram B.R., McGreggor M.W., Sheoran A.S., Olsen C.W., Lunn D.P.: Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine*, 1998; 16 : 1306 – 1313.

91 - Hannant D., Easeman R., Mumford J.A.: Equine mucosal immune system: intranasal vaccination with inactivated influenza virus protects from infection, Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (eds.), *Equine Infectious diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, 1998: 50 – 56.

92 - Mellencamp M., Schultze A., Development of an inactivated equine influenza vaccine to meet global requirements, in: *Proceedings Quality Control of Equine Influenza Vaccines*, Budapest, 2001: 79 – 81.

93 - Chambers T.M., Holland R.E., Tudor L.R., Townsend H.G., Cook A., Bogdan J., Lunn D.P., Hussey S., Whitaker-Dowling P., Youngner J.S., Sebring R.W., Penner S.J., Stiegler G.L.: A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge, *Equine Vet. J.* , 2001; 33: 630 –636.

94 - Townsend H.G., Penner S.J., Watts T.C., Cook A., Bogdan J., Haines D.M., Griffin S., Chambers T., Holland R.E., Whitaker-Dowling P., Younger J.S., Sebring R.W.: Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials, *Equine Vet.*, 2001; 33: 637 – 643.

95 - Minke J.M., Audonnet J.C., Jessett D.M., Fischer L., Guigal P.M., Coupier H., Pardo M.C., Taylor

- J., Tartaglia J., Mumford J.A.: Canarypox as vector for influenza and HVE-1 genes: challenges and rewards, in: 2nd International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Oxford, 2000: 36.
- 96 - Siegrist C.A., Saddallah F., Tougne C., Martinez X., Kovarik J., Lamber P.H.: Induction of neonatal TH1 and CTL responses by live viral vaccines: a role for replication patterns within antigen presenting cells, *Vaccine*; 1998; 16: 1473 – 1478.
- 97 - Kanesa-thasan N., Smucny J.J., Hoke C.H., Marks D.H., Konishi E., Kurane I., Tang D.B., Vaughn D.W., Mason P.W., Shope R.E.: Safety and immunogenicity of NYCAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus – poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans, *Vaccine*, 2001; 19: 483 – 491.
- 98 - Lunn D.P., Soboll G., Schramm B.R., Quass J., McGregor M.W., Drape R.J., Macklin M.D., McCabe D.E., Swain W.F., Olsen C.W.: Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene, *Vaccine*, 1999; 17: 2245 – 2258.
- 99 - Askonas B.A., McMichael A.J., Webster R.G.: The antibody response to influenza virus, Beare A.S. (ed.), *Basic and Applied Influenza Research*, C.R.C. Press, Boca Raton, Florida, 1982: 164 – 181.
- 100 - Bryans J.T.: The antibody response of horses to two inactivated oil adjuvanted equine influenza virus vaccines, *International symposium on influenza vaccines for men and horses*, Paris, France, 1973: 311 – 317.
- 101 - Kumanomido T., Akiyama Y.: Immunoeffect of serum and nasal antibody against experimental inoculation with influenza A/equi/2 virus, *Exp. Rep. Equine Health Lab.*, 1975; 12: 44 – 52.
- 102 - Rouse B.T., Ditchfield J.B.: The response of ponies to Myxovirus influenzae A/equi/2. The protective effect of serum and nasal antibody against experimental challenge, *Res. Vet. Sci*, 1970; 11: 503 – 507.
- 103 - Thomson G.R., Spooner P.R., Powell D.G.: The outbreak of equine influenza in England: January 1976, *Vet. Rec.*, 1977; 100: 465 – 468.
- 104 - Wood J.M., Schild G.C., Folkers C., Mumford J., Newman R.W.: The standardization of inactivated equine influenza vaccines by single radial immunodiffusion, *J. Biol. Stand.*, 1983; 11: 133 – 136.
- 105 - Mumford J.: Collaborative study for the establishment of three European Pharmacopoeia Biological Reference Preparations for equine influenza horse antiserum, *Pharmeuropa*, 2000: 7–21.
- 106 - Mumford J.A., Wood J.M., Folkers C., Schild G.C.: Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Miami/63 (H3N8) provided by inactivated whole virus vaccines containing homologous virus, *Epidemiol. Infect.*, 1988; 100: 501 – 510.
- 107 - Wood J.M., Mumford J., Folkers C., Scott A.M., Schild G.C., *Studies with inactivated equine*

influenza vaccine: I. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine, *J. Hyg. (Lond.)*, 1983; 90: 371 – 384.

108 - Cameron T.P., Alford R.H., Kasel J.A., Harvey E.W., Byrne R.J., Knight V.: Experimental equine influenza in Chincoteague ponies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967; 32: 510–515.

109 - Martens J.G.: Development and evaluation of antivirals for the treatment of equine virus induced respiratory infections, *Diss. Abstr. Int.*, 1986; 47: 69.

110 - Rouse B.T., Ditchfield W.J.B.: The response of ponies to Myxovirus influenzae A/equi/2 I. Serum and nasal antibody titres following exposure, *Can. J. Comp. Med.*, 1970; 34: 1 – 6.

111 - Mumford J.A., Wood J.: Conference report on WHO/OIE meeting: Consultation on newly emerging strains of equine influenza, *Vaccine*, 1993; 11: 1172 – 1175.

112 - Mumford J.: Progress in the control of equine influenza, Plowright W., Rosedale P.D., Wade J.F. (eds.), *Proc. 6th Int. Conference on Equine infectious diseases*, Cambridge, 1992: 207 – 218

113 - Mumford J.A., Wilson H., Hannant D., Jessett D.M.: Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant, *Epidemiol. Infect.*, 1994; 112: 421 – 437.

114 - Mumford J.A., Jessett D.M., Rollinson E.A., Hannant D., Draper M.E.: Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines, *Vet. Rec.*, 1994; 134: 158 – 162.

115 - Morley P.S., Townsend H.G.G., Bogdan J.R., Haines D.M.: Efficacy of a commercial vaccine for preventing disease caused by influenza virus infection in horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1999; 215: 61 – 64.

116 - European Pharmacopoeia, Monograph on equine influenza vaccines, 3rd ed., 1998.

117 - Glass K., Wood J.L.N., Mumford J.A., Jessett D., Grenfell B.T.: Modelling equine influenza 1: a stochastic model of within-yard epidemics, *Epidemiol. Infect.*, 2002; 128 : 491 – 502.

118 - Cullinane A., Weld J., Osborne M., Nelly M., McBride C., Walsh C.: Field studies on equine influenza vaccination regimes in Thoroughbred foals and yearlings, *Vet. J.*, 2001; 161: 174 – 185.

119 - Van Maanen C., Bruin G., de Boer-Luijtz E., Smolders G., de Boer G.F.: Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza, *Vet. Q.*, 1992; 14: 13 – 17.

120 - Van Oirschot J.T., Bruin G., de Boer-Luytze E., Smolders G.: Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination, *Zentralbl. Veterinarmed.*, 1991; B 38: 391 – 396.

121 - Newton J.R., Lakhani K.H., Wood J.L.N., Baker D.J.: Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine, *Prev. Vet. Med.*, 2000; 46: 129 – 141.

- 122 - Newton J.R., Verheyen K., Wood J.L.N., Yates P.J., Mumford J.A.: Equine influenza in the United Kingdom in 1998, *Vet. Rec.*, 1999; 145: 449 – 452.
- 123 - Cullinane A., Weld J., Osborne M., Nelly M., McBride C., Walsh C.: Field studies on equine influenza vaccination regimes in Thoroughbred foals and yearlings, *Vet. J.*, 2001; 161: 174 – 185.
- 124 - Park A.W., Wood J.L.N., Newton J.R., Daly J., Mumford J.A., Grenfell B.T.: Optimising vaccination strategies in equine influenza, *Vaccine*, 2003; 21: 2862 – 2870.
- 125 - Liu I.K.M., Pascoe D.R., Chang L.W.S., Zee Y.C., Duration of maternally derived antibodies against equine influenza in newborn foals, *Am. J. Vet. Res.*, 1985; 46: 2078 – 2080.
- 126 - Hinshaw V.S., Naeve C.W., Webster R.G., Douglas A., Skehel J.J., Bryans J.: Analysis of antigenic variation in equine/2/ influenza A viruses, *Bull. World Health Organ.*, 1983; 61: 153 – 158.
- 127 - Burrows R., Denyer M.: Antigenic properties of some equine influenza viruses, *Arch. Virol.*, 1982; 73: 15–24.
- 128 - Burrows R., Denyer M., Goodridge D., Hamilton F.: Field and laboratory studies of equine influenza viruses isolated in 1979, *Vet. Rec.*, 1981; 109: 353 – 356.
- 129 - Haaheim L.R., Schild G.C.: Antibodies to the strain-specific and cross-reactive determinants of the haemagglutinin of influenza H3N2 viruses. 2. Antiviral activities of the antibodies in biological systems, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1980; B 88: 335–340.
- 130 - Binns M.M., Daly J.M., Chirnside E.D., Mumford J.A., Wood J.M., Richards C.M., Daniels R.S.: Genetic and antigenic analysis of an equine influenza H3 isolate from the 1989 epidemic, *Arch. Virol.*, 1993; 130: 33 – 43.
- 131 - Daly J.M., Yates P.J., Browse G., Swann Z., Newton J.R., Jessett D., Davis-Poynter N., Mumford J.A.: Comparison of hamster and pony challenge models for evaluation of effect of antigenic drift on cross-protection afforded by equine influenza vaccines, *Equine Vet. J.*, 2003; 35: 458 – 462.
- 132 - Mumford J.A., Wood J.: Conference report on WHO/OIE meeting: Consultation on newly emerging strains of equine influenza, *Vaccine*; 1993; 11: 1172 – 1175.
- 133 - Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.G.: Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses, *Virology*, 1989; 169: 283 – 292.
- 134 - Daly J.M., Lai A.C.K., Binns M.M., Chambers T.M., Barrandeguy M., Mumford J.A.: Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses, *J. Gen. Virol.*, 1996; 77 (1996): 661 – 671.
- 135 - Yates P., Mumford J.A., Equine influenza vaccine efficacy, the significance of antigenic variation, *Vet. Microbiol.*, 74; 2000: 173 – 177.
- 136 - Newton J.R., Lakhani K.H., Wood J.L.N., Baker D.J.: Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine, *Prev. Vet. Med.*,

2000; 46: 129 – 141.

137 – OIE: Conclusions and recommendations from the consultation meeting of OIE and WHO experts on equine influenza, Newmarket, United Kingdom, September 18–19, 1995, 1996; OIE Bull. 108: 482 – 484.

138 – EMEA/CVMP/112/98: Notes for guidance: harmonisation of requirements for equine influenza vaccines-specific requirements for substitution or addition of a strain or strains, 1998.

139 - Powell D.G., Watkins K.L., Li P.H., Shortridge K.F.: Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992, Vet. Rec., 1995; 136: 531 – 536.

140 - Wernery R., Yates P.J., Wernery U., Mumford J.A.: An equine influenza outbreak in a polo club in Dubai, United Arab Emirates in 1995/ 96; Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.-R. (Eds.), Proc. 8th Int. Conference on Equine Infections Diseases, Dubai, 1998: 342 – 346.

141 - OIE Code, International Animal Health Code, 7th ed.: Office International des Épizooties, Paris, France, 1998.

12.2 Herpesvirus Equino

- 142 – Studdert. M. J.; Comparative aspects of equine herpesvirus. *Cornell Vet.*, 69; 94 – 122.
- 143 – Doll E.R., Bryans J.T.: Development of complement fixing and Virus Neutralizing Antibodies in viral Rhinopneumonitis of horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1962; 23; 95.
- 144 - Dutta S.K., Talbot N.C. et Myrup A.C. Detection of HVE – 1 antigen and the specific antibody enzyme – linked immunosorbent assay. *Am J. Vet. Res.*, 1983; 44: 1930 – 1934.
- 145 - Studdert M.J.; Simpson T.: Roizman B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, 1981; 214: 562 – 564.
- 146 - Learmonth G.S., Love D.N.: Wellington J.E., Gilkerson J.R., Whalley J.M.; The C-terminal regions of the envelope glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 and 4 are antigenically distinct. *Archives of Virology*, 200; 607 - 615.
- 147- Crabb B.S., Studdert M.J. : Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Advances in Virus Research*. 1995; 45: 153 –190.
- 148 - Rossdale P.D., Hopes R., Wingfield-Digby, N.J., et al.: Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec.*, 1985; 116: 66 – 69.
- 149 - Allen G.P., Bryans J.T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol. Immunol.*; 1986; 2: 78 – 144.
- 150 - Bryans J T , Allen G P : Herpesviral diseases of the horse. Wittmann G., (ed.), *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Boston: Kluwer, 1989; 176 – 229.
- 151 - Crabb B.S., Studdert M.J.: Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus Res.*, 1995; 45: 153 – 190.
- 152 - Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D., et al.: Equid herpesvirus-1 (HVE-1) and equid herpesvirus-4 (HVE-4) infections. Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin, (eds.) *Infectious diseases of livestock*. Capetown: Oxford University Press, 2002 (in press).
- 153 - Allen G.P., Yeargan M.R., Turtinen L.W., et al.: Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*, 1983; 44: 263 – 271.
- 154 - Nagy E., Idamakanti N., Carman S., et al.: Restriction endonuclease analysis of equine herpesvirus- 1 isolates recovered in Ontario, 1986–1992, from aborted, stillborn, and neonatal foals. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1997; 9: 143 – 148.
- 155 - Telford E.A., Watson M.S., McBride K., et al.: The DNA sequence of equine herpesvirus 1. *Virology*, 1992; 189:304–,316.

- 156 - Telford E.A., Watson M.S., Perry J., et al.: The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, 1998; 79: 1197 – 1203.
- 157 - Bagust T.J., Pascoe R.R., Harden T.J.: Studies on equine herpesvirus. 3. The incidence in Queensland of three different equine herpesvirus infections. *Aust. Vet. J.* 1972; 48: 47 – 53.
- 158 - Burrell M.H.: Endoscopic and virological observations on respiratory disease in a group of young Thoroughbred horses in training. *Equine Vet. J.*, 1985; 17: 99 – 103.
- 159 - Morley P.S.: Epidemiology of infectious upper respiratory tract disease in horses. PhD dissertation. University of Saskatchewan, 1995.
- 160 - Wood J.L.N., Chanter N., Sinclair R., et al.: The epidemiology of outbreaks of respiratory disease and poor performance in racing Thoroughbred horses. Plowright W, Nakajima H, (eds.). *Equine infectious diseases VII*. Newmarket: R & W Publications, 1995; 358 - 359.
- 161 - Burrell M.H., Wood J.L.N., Whitwell K.E., et al.: Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationship between disease and viruses, bacterial and environment. *Vet. Rec.*, 1996; 139: 308 – 313.
- 162 - Carmen S., Rosendal S., Huber L., et al.: Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1997; 9: 17 – 23.
- 163 - Wood J.L.N., Newton J.R., Chanter N., et al.: A longitudinal epidemiological study of respiratory disease in racehorses: disease definitions, prevalence and incidence. Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., et al , (eds.). *Equine infectious diseases VIII*. Newmarket: R & W Publications, 1999; 64 – 70.
- 164 - Gilkerson J., Jorm L.R., Love D.N., et al.: Epidemiological investigation of equid herpesvirus-4 (HVE-4) excretion assessed by nasal swabs taken from thoroughbred foals. *Vet. Microbiol.* 1994; 39:275.-.283.
- 165 - Edington N., Welch H.M., Griffiths L.: The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet. J.* 1994; 26:140.–142.
- 166 - Edington N., Chesters P., Azam H., et al.: Profiles of alphaherpesviruses in circulating leucocytes from Thoroughbred mares and foals using PCR and co-cultivation. Nakajima H., Plowright W., (eds.). *Equine infectious diseases VII*. Newmarket: R. & W. Publications, 1994; 251 – 254.
- 167 - Gilkerson J.R., Love D.N., Drummer H.E., et al. Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in Thoroughbred foals before and after weaning. *Aust. Vet. J.* 1998; 76: 677 – 682.
168. - Gilkerson J.R., Whalley J.M., Drummer H.E., et al.: Epidemiology of HVE-1 and HVE-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: Are mares the source of HVE-1 for unweaned foals. *Vet. Microbiol.*, 1999; 68: 27 – 34.

- 169 - Burrows R., Goodridge D.: Studies of persistent and latent equid herpesvirus-1 and herpesvirus-3 infections in the Pirbright pony herd. Wittmann G., Gaskell R.M., Rziha H.J., (eds.). *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*. The Hague: Martinus Nijhoff, 1984; 307 – 319.
- 170 - Slater J.D., Borchers K., Thackray A.M., et al.: The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.*, 1994; 75: 2007 – 2016.
- 171 - Chesters P.M., Allsop R., Purewal A., et al.: Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J. Virol.* 1997; 71:3437.–3443.
- 172 - Edington N., Bridges C.G., Huckle A.: Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (HVE-1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet J.* 1985; 17: 369 – 372..
- 173 - Browning G.F., Bulach D.M., Ficorilli N., et al.: Latency of equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus). *Vet. Rec.* 1988; 123: 518 – 519.
- 174 - Gibson J.S., Slater J.D., Awan A.R., et al.: Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch. Virol.* 1992; 123: 351 – 366.
- 175 - Allen G.P., Kydd J.K., Slater J.D., et al.: Advances in understanding of the epidemiology, pathogenesis and immunological control of equid herpesvirus-1 abortion. Wernery U., Wade J., Mumford J, et al, (eds.). *Equine infectious diseases VIII*. Newmarket: R & W Publications, 1999; 129 – 146.
- 176 - Kydd J.H., Smith K.C., Hannant D., et al.: Distribution of equid herpesvirus-1 (HVE-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet J* 1994; 26: 466 – 469.
- 177 - Prickett M.E.: The pathology of disease caused by equine herpesvirus 1. Bryans J.T., Gerber H., (eds.). *Equine infectious diseases II*. Basel: S. Karger 1970; 24 – 33.
- 178 - Kydd J.H., Smith K.C., Hannant D., et al.: Distribution of equid herpesvirus-1 in the respiratory tract-associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet. J.* 1994; 26: 470 – 473.
- 179 - Lunn D.P., Holmes M.A., Gibson J.S., et al.: Haematological changes and equine lymphocyte subpopulation kinetics during primary infection and attempted re-infection of specific pathogen free foals with HVE-1. *Equine Vet. J. Suppl.* 1991; 12: 35 – 40.
- 180 - McColloch J., Williamsom S.A., Powis S.J., et al.: The effect of HVE-1 infection upon circulating leucocyte populations in the natural equine host. *Vet Microbiol.* 1993; 37:147 – 161.
- 181 - Patel J.R., Edington N., Mumford J.A.: Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus 1 in foals. *Arch. Virol.* 1982; 74: 41.–51.

- 182 - Bryans J.T., Swerczek T.W., Darlington R.W., et al.: Neonatal foal disease associated with perinatal infection by equine herpesvirus-1. *J. Equine Med. Surg.*, 1977; 1: 20 – 26.
- 183 - Dixon R.J., Hartley W.J., Hutchins R.D., et al.: Perinatal foal mortality associated with a herpesvirus. *Aust. Vet. J.* 1978; 54:103.–105.
- 184 - Hartley W.J., Dixon R.J.: An outbreak of foal perinatal mortality due to equid herpesvirus type 1: pathological observations. *Equine Vet. J.*, 1979; 11: 215 – 218.
- 185 - McCartan C.G., Russell M.M., Wood J.L.N. et al.: 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.*, 1995; 136: 7 – 12.
- 186 - O'Keefe J.S., Alley M.R., Jones D., et al.: Neonatal mortality due to equid herpesvirus 4 (HVE-4) in a foal. *Aust. Vet. J.*, 1995; 72: 353 – 354.
- 187 - Donaldson M.T., Sweeney C.R.: Equine herpes myeloencephalopathy. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 1997; 19: 864 – 882.
- 188 - Wilson W.D.: Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*,1997; 13: 53 – 72.
- 189 - Meyer H., Thein P., Hubert P., et al.: Characterization of two equine herpesvirus (HVE) isolates associated with neurological disorders in horses. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B* ,1987; 34: 545 – 548.
- 190 - Verheyen K., Newton J.R., Wood J.L.N., et al.: Possible case of HVE-4 ataxia in warmblood mare. *Vet Rec.* 1998; 143: 456.
- 191 - Del Piero F., Wilkins P.A.: Pulmonary vasculotropic HVE-1 infection in equids. *Vet. Pathol.* 2001; 38: 474 – 475.
- 192 - Slater J.D., Gibson J.S., Barnett K.C. et al.: Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet. Rec.* 1992; 131: 237 – 239.
- 193 - Paradis M.R.: Equine herpesvirus (rhinopneumonitis). Smith B.A., (ed.). *Large Animal Internal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep, and Goats.* St. Louis: Mosby, 1996; 587 - 588.
- 194 - Cutler T.J., MacKay R.J.: Equine herpesvirus-1 myeloencephalitis. Robinson N.E., (ed.) *Current therapy in equine medicine.* Philadelphia: WB Saunders Co, 1997; 333 – 335.
- 195 - Olsen T.F.: Equine herpesvirus myeloencephalopathy in a 14-year-old quarter horse stallion. *Can. Vet. J.* 2001; 42: 217 – 220.
- 196 - Sellon D.C.: Investigating outbreaks of respiratory disease in older foals. *Proceedings of the Annu Meet Am Assoc Equine Pract* 2001; 47: 447 – 455.
- 197 - McConnico R.S., Clem M.F., DeBowes R.M.: Supportive medical care of recumbent horses. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 1991; 13:1287.–1294.

- 198 - Murray M.J., del Piero F., Jeffrey S.C., et al.: Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *J. Vet. Intern. Med.*, 1998; 12: 36 – 41.
- 199 - Wilson D.: Guidelines for vaccination of horses. The American Association of Equine Practitioners' Vaccination Guidelines Subcommittee of the AVMA Council on Biologic and Therapeutic Agents. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995; 207: 426 – 431.
- 200 - Wilson W.D.. Equine vaccination and infectious disease control. Equine herpesviruses (rhinopneumonitis). Smith B.A., (ed.). *Large Animal Internal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep, and Goats*. St. Louis: Mosby, 1996; 1638 – 1639.
- 201 - Wilson W.D., Rossdale P.D.: Effect of age on the serological response of Thoroughbred foals to vaccination with an inactivated HVE-1/HVE-4 vaccine. Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., et al. , (eds.). *Equine infectious diseases VIII*. Newmarket: R & W Publications, 1999; 428.
- 202 - Bryans J.T.: Application of management procedures and prophylactic immunization to the control of equine rhinopneumonitis. *Proceedings of the 26th Annu. Meet. Am. Assoc. Equine Pract.*, 1980; 259 – 272.
- 203 - Bryans J.T., Allen G.P.: Control of abortigenic herpesviral infections. *Curr. Ther. Theriogenol.* 1986; 2: 711 - 714.
- 204 - Allen G.P.: Epidemic disease caused by equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Vet Edu*; submitted 2001.
- 205 - Dwyer R.M.: Foal management, disinfection and hygiene. Powell D.G., Jackson S.G., (eds.). *The health of horses*. Essex: Longman Group, 1992; 234 – 261.
- 206 - Wagner W.N., Bogdan J., Haines D., et al.: Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 1992; 38: 1193 – 1196.
- 207 - Borchers K., Slater J.: A nested PCR for the detection and differentiation of HVE-1 and HVE-4. *J. Virol. Methods*, 1993; 45: 331 – 336.
- 208 - Lawrence G.L., Gilkerson J., Love D.N., et al.: Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods* 1994; 47: 59 – 72.
- 209 - Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., et al.: Identification of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 2001; 79: 563 – 569.
- 210 - Thomson G.R., Mumford J.A., Campbell J., et al.: Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, 1976; 8: 58 – 65.
- 211 - Fitzpatrick D.R., Studdert M.J.: Immunologic relationships between equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus). *Am. J. Vet. Res.*, 1984; 45:

1947–1952.

212 - Allen G.P., Yeragan M.R., Turtinen L.W., Bryans J.T.: A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1985; 46: 138 – 140.

213 - Palfi V., Christensen L.S., Analyses of restriction fragment (RFPs) and pathogenicity in baby mice of equine herpesvirus 1 and 4 (HVE-1 and HVE-4) strains circulating in Danish horses, *Vet. Microbiol.*, 1995; 47: 199 – 204.

214 - Van Maanen C., Equine herpes virus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.*, 2002; 24: 57 – 78.

215 - Doll E.R., Bryans J.T., Immunization of young horses against viral rhinopneumonitis. *Cornell Vet.*, 1963; 53: 24 – 41.

216 - Doll E.R., Bryans J.T., McCollum W.H.: A procedure for evaluating the antigenicity of killed virus vaccines for equine rhinopneumonitis. *Cornell Vet.*, 1959; 49: 212 – 220.

217 - Doll E.R., Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters. *J. Biochem.*, 1961; 139: 1324 – 1330.

218 - Mayr A., Pette J., Petzoldt K., Wagener K.: Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (stutenabort) der Pferde, *Zentralbl. Veterinaermed.*, 1968; B 15: 406 – 418.

219 - Neubauer A., Meindl A., Osterrieder N.: Mutations in the US2 and glycoprotein B, genes of the equine herpesvirus 1 vaccine strain Rach have no effects on its attenuation, *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.*, 1999; 112: 351 – 354.

220 - Jessett D.M., Schrag D., Mumford J.A.: Protection by an attenuated HVE-1 vaccine against challenge with a virulent HVE-1 AB4 isolate, in: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (eds.), *Equine Infectious Diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, 1998; 414 – 415.

221 - Bürki F., Nowotny N., Oulehla J., Schmechlik O., Möstl K., Pallan C., Rossmannith E.: Attempts to immunoprotect adult horses, specifically pregnant mares, with commercial vaccines against clinical disease induced by equine herpesvirus-1. *J. Vet. Med.*, 1991; 38: 432 – 440.

222 - Bürki F., Rossmannith W., Nowotny N., Pallan C., Möstl K., Lussy H., Viraemia and abortions are not prevented by two commercial Equine herpesvirus 1 vaccines after experimental challenge of horses. *Vet. Q.*, 1990; 12: 80 – 86.

223 - Burrows R., Goodridge D.: Equid herpesvirus 1 (HVE-1): some observations on the epizootiology of infection and on the innocuity testing of live virus vaccines. *Proc. 24th Annu. Conf. Am. Ass. Equine Practitioners*, St. Louis, 1978; 17 – 29.

224 - Liu I.K.M., Castleman W.: Equine posterior paresis associated with equine herpesvirus 1 vaccine in California: a preliminary report. *J. Equine Med. Surg.*, 1977; 1: 397 – 401.

- 225 - Patel J.R., Földi J., Bateman H., Williams J., Didlick S., Stark R., Equid herpesvirus (HVE-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory disease following HVE types 1 and 4 challenges. *Vet. Microbiol.*, 2003; 92: 1 – 17.
- 226 - Thomson G.R., Mumford J.A., Smith I.M.: Experimental immunization against respiratory disease due to equine herpesvirus 1 infection (rhinopneumonitis) using formalin inactivated virus with various adjuvants. *Vet. Microbiol.*, 1979; 4: 209 – 222.
- 227 - Heldens J.G., Hannant D., Cullinane A.A.: Prendergast M.J., Mumford J.A., Nelly M., Kydd J.H., Weststrate M.W., van der Hoven R.: Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated HVE1 and HVE4 whole virus vaccine (Duvaxyn HVE1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine*, 2001; 19: 97 – 114.
- 228 - Burrows R., Goodridge D., Denyer M.S.: Trials of an inactivated equid herpes virus vaccine: challenge with a subtype 1 virus. *Vet. Rec.*, 1984; 114: 369 – 374.
- 229 - Mumford J.A., Hannant D., Jessett D.M., O'Neill T.: Evaluation of protective efficacy of equid herpesvirus type 1 ISCOM vaccine for the abortigenic form of disease. *J. Reprod. Fertil.*, 1991; 44 Suppl.: 730 – 731.
- 230 - Heldens J.G., Kersten A.J., Weststrate M.W., van den Hoven R.: Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpes 1 and 4 combination vaccine. *Vet. Q.*, 2001; 23: 210 – 217.
- 231 - Minke J.M., Flore P.H., Vaarten J., Vandehoek J., Weststrate M., An inactivated HVE-1 and HVE-4 containing vaccine reduces clinical signs in horses infected experimentally with HVE-1 or HVE-4 six months after a single vaccination, in: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (eds.). *Equine Infectious diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, 1998; 564 – 565.
- 232 - Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D., Smith K.C.: Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (Eds.), *Equine Infectious diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, 1998; 129.
- 233 - Matsumura T., Kondo T., Sugita S., Damiani A.M., O'Callaghan D.J., Imagawa H.: An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE gene and gI genes is avirulent in young horses. *Virology*, 1998; 242: 68 – 79.
- 234 - Slater J.D., Gibson J.S., Field H.J.: Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 1 in mice and specific pathogen-free foals. *J. Gen. Virol.*, 1993; 74: 819 – 828.
- 235 - Tewari D., Gibson J.S., Slater J.D., O'Neill T., Hannant D., Allen G.P., Field H.J.: Modulation of the serological response of specific pathogen-free (HVE-free) foals to HVE-1 by previous infection to HVE-4 or a TK-deletion mutant of HVE-1. *Arch. Virol.*, 1993; 132: 101 – 120.

236 - Audonnet J.C., Mumford J.A., Jessett D.M., Pardo M.C., Taylor J., Tartaglia J., Minke J.M.: Safety and efficacy of a canarypox-HVE recombinant in horses, in: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (eds.). *Equine Infectious diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, 1998; 418 – 419.

237 - Soboll G., Whalley J.M., Koen M.T.: Allen G.P., Fraser D.G., Macklin M.D., Swain W.F., Lunn D.P. Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes, *J. Gen. Virol.*, 2003; 84: 2625 – 2634.

12.3 Autoridades internacionales y nacionales

238 - W. David Wilson, BVMS, MS y Nicola Pusterla, DVM, DACVIM: Current Concepts in Equine Vaccination and Infectious Disease Control. Proceedings of the 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners AAEP, Gold Coast, Australia, Published by the American Association of Equine Practitioners January 25 - 28, 2009.

239 - J. L., Traub-Dargatz. Managing Infectious Disease Outbreaks at Events and Farms; Challenges and the Resources for Success. 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP, 2007 - Orlando, FL, USA,_(ed.). American Association of Equine Practitioners, Orlando, FL. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 5-Dec-2007; 8101.1207.

240 - Dr. Paul Morley de Colorado State University College de Medicina Veterinaria y Ciencias Biomédicas.

241 - Base de datos del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHID) – Versión 1.4, Fecha de emisión November 2009.

242 - International Breeders 'Meeting, Centro Internacional para colación, Animal Health Trust.

243 - International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, Federation Internationale des Autorites Hippiques de courses au galop, 46 place Abel Gance, 92655 Boulogne Cedex, France

244 – Reglamento de Carreras, Comision Hípica, Hipodromo Nacional de Maroñas – Decreto N° 124/003, de 1° de abril de 2003 y su modificativo Decreto 111/004 del 24 de marzo de 2004.

12.4 Trabajo práctico

245 – WHO – Manual on animal Influenza Diagnosis and Surveillance, World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, WHO Global Influenza Programme; WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5.

246 – Manual de la OIE sobre animales terrestres; Capítulo 2.5.5 – Gripe Equina; 2004.

247 – Manual de la OIE sobre animales terrestres; Capítulo 2.5.7 – Rhinopneumonitis Equina; 2004.

FE DE ERRATAS