

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

Seroprevalence and factors that affect the level of seroneutralizing antibodies against EHV-1 in horses in Uruguay

Castro ER^{1*}, Gil AD², Arbiza J³

1- Departamento Virología, División de Laboratorios Veterinarios "M.C.Rubino" (DILAVE-MGAP) Ruta 8 Km. 17.500. Montevideo-Uruguay. Posgrado Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

2- Departamento de Bioestadísticas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

3- Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

*Autor para correspondencia: ercastro72@gmail.com racastro@mgap.gub.uy

Veterinaria (Montevideo) Volumen 52
Nº 203 (2016) 4-9

Recibido: 8/1/2016

Aceptado: 3/4/2016

Resumen

La Rinoneumonitis Equina (RE) es un término que describe un conjunto de enfermedades en caballos que pueden incluir cuadros clínicos respiratorios, aborto, neumonitis neonatal de los potros, o mieloencefalopatía, y está causada por los virus EHV-1 y EHV-4. La distribución de estos agentes se considera mundialmente enzoótica provocando importantes pérdidas económicas especialmente en países con buen desarrollo de la industria hípico-deportiva. En el Uruguay se considera enzoótica desde hace muchos años. El objetivo de este trabajo es estimar la seroprevalencia de EHV-1 en equinos de deporte en el Uruguay y determinar si está asociada con factores como la edad, raza, sexo, y los antecedentes de vacunación. Se colectaron 1517 sueros equinos en el período diciembre 2013 a marzo 2014, reseñando la raza, edad, sexo y registro de vacunación, la totalidad de las muestras fueron procesadas por la prueba de seroneutralización viral, y los resultados fueron estudiados mediante modelo de regresión logística. Se comprueba que el virus EHV-1 se encuentra ampliamente distribuido en la población de equinos de deporte en nuestro país, con una prevalencia estimada del 29% (IC 95% = 27%-31%). Se observa que la presencia de anticuerpos para EHV-1 está asociada a factores como la raza y la vacunación contra RE ($p < 0,05$).

Palabras clave:

Seroprevalencia anticuerpos EHV-1 equinos de deporte Uruguay

Summary

Equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection causes disease in horses and extensive economic losses associated with outbreaks of respiratory disease, abortion, neonatal foal death, and myeloencephalopathy, with worldwide distribution and probably are endemic in Uruguay. The objective of this research is to consider the seroprevalence of EHV-1 in horses in Uruguay and to determine if it is associated with factors like the age, breed, sex, and the vaccination antecedents. A total of 1517 serum samples were selected from December 2013 to March 2014. The data registered were the breed, age, sex and vaccination history. All samples were processed by the seroneutralization test and the results obtained were statistically analyzed by a logistic regression model. It is verified that the EHV-1 is widely distributed in the horse population in Uruguay, whose estimated prevalence is of 29% (IC 95%= 27%-31%). The presence of positive serology for EHV-1 was associated to factors like the breed and the vaccination against EHV-1 ($p < 0.05$).

Keywords:

Seroprevalence antibodies EHV-1 sport equines Uruguay.

Introducción

La población equina en el Uruguay está comprendida por aproximadamente 400.000 animales con 30.000 tenedores. Según Gil y col. (2009) casi el 95% de la población equina (sin incluir los equinos pura sangre de carrera), pertenecen a las razas Criolla (75%), Cuarto de Milla (12%) y Árabes (7%). En los últimos años se percibe mayor dinamismo de algunas actividades asociadas al caballo, siendo la Hípica

la que nuclea la mayor cantidad de animales en actividad (39%), seguida por el del Enduro (22%), el Raid (11%) y el Polo (5%). Por esta razón la raza Pura Sangre de Carrera (SPC) actualmente representa el segundo lugar de las razas equinas en el Uruguay (Ferrari, 2012).

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

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

Materiales y métodos

Sueros

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

Prueba de seroneutralización (SN)

El procedimiento de la prueba se realizó siguiendo el protocolo establecido por el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2015). La cepa de virus EHV-1 HH 1y y la línea celular RK-13 usadas en la prueba, fueron cedidas por el Dr. Ken Inui (Proyecto JICA-DILAVE). Los sueros controles positivos y negativos proceden del Instituto de Virología del INTA (Castelar-Argentina). Esta prueba serológica se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (grado de cultivo de tejidos) utilizando una dosis constante de virus y diluciones dobles de sueros equinos de ensayo. Los stocks de virus de título conocido se diluyeron para obtener 100 DICT⁵⁰ (dosis infectiva media en cultivo de tejidos) por pocillo. Se siembran células en suspensión de la línea celular RK-13 a una concentración de 5×10^5 células /ml.

En cada ensayo se incluyeron sueros controles positivos y negativos, control decrecimiento celular, titulación de dosis infecciosas y prueba de citotoxicidad del suero. Los títulos neutralizantes de virus se calcularon determinando el inverso de la dilución más alta de suero que protege al 100% de la monocapa celular de la destrucción por el virus. Los sueros son considerados positivos cuando su título neutralizante es $\geq 1:4$.

Análisis estadístico

Inicialmente se realizó un análisis univariado para observar el comportamiento de las prevalencias por raza, sexo, edad y vacunación, utilizando para las evaluaciones la prueba Chi² de Pearson. Las variables que fueron seleccionadas por tener un valor de $p < 0,20$ se utilizaron para construir un modelo de regresión logística que fue desarrollado “backward”. Este modelo tiene como variable respuesta, la presencia o no de serología positiva para EHV-1 y como variables independientes las seleccionadas en el análisis univariado. Se mantuvieron en el modelo aquellas variables que estaban asociadas con un valor $p < 0,05$. La totalidad de los “test” estadísticos se procesaron utilizando el software Stata (Versión 9.2 Stata-Corp, College Station, Texas, USA).

Resultados

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

El grupo etario más numeroso se halló en el rango de 6 a 10 años de edad con un 32% del total de equinos estudiados (ver cuadro 2).

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

La población de equinos que fue vacunada en un plazo mayor a los cuatro meses, se consideró como población no vacunada, ya que la inmunidad conferida por la vacunación perdura durante unos pocos meses (OIE, 2015). La prevalencia estimada por la relación entre los sueros equinos positivos y el total sueros de equinos estudiados fue del 29% oscilando entre el 27% y 31%. (IC95%), siendo la raza Arabe, junto con el grupo de otras razas (Anglo-arabe, Odenburg y KWPN) los grupos con mayor proporción de positivos a EHV-1. Del análisis de regresión univariable (cuadro 4) se puede inferir que por lo menos hay una raza que presenta diferencias significativas de seroprevalencia, mientras que el análisis de regresión logística permite interpretar que las variables SPC y cuarto de milla son las razas que presentan mayor probabilidad de presentar serología positiva para EHV-1.

A su vez, el estrato de equinos vacunados presenta mayor probabilidad de presentar seropositivos (ver cuadro 3). El análisis univariable, no detectó diferencias significativas en los valores de seroprevalencia entre los grupos de macho, hembra y macho castrado (ver cuadro 5), por lo tanto la variable sexo no se tuvo en cuenta en la modelación del análisis de regresión logística.

Cuadro 1: Sero-prevalencia según la raza

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

Pearson chi2 =32.0582

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

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

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

Pearson chi2 = 10,0277

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

Cuadro 3: Seroprevalencia según la vacunación

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

Pearson chi2 = 15.6210

Cuadro 4: Regresión Logística Positivo/Raza Vacuna

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

Cuadro 5: Seroprevalencia según el sexo

Serología	Hembra	Macho	Macho castrado	Total
Positivos	161	176	99	436
Sero-prevalencia (%)	29,93	30,34	26,19	29,14
Total	538	580	378	1496*

Pearson $\chi^2 = 2.1610$

* No se incluyen 21 equinos debido a que desconoce su sexo

El grupo de reaccionantes aumenta con la edad, para luego caer a partir de los 10 años, sin embargo a pesar de que el análisis de regresión univariable arrojó diferencias significativas entre las prevalencias de los diferentes grupos de edades, esta variable no se mantuvo en el modelo de regresión logística debido a que corregida por los otros factores no presentó asociación con la seroprevalencia.

Discusión

La raza Pura Sangre de Carrera actualmente encabeza el grupo más importante de las razas equinas que participan en actividades de deporte en el Uruguay, lo cual coincide con lo descrito por otros autores (Ferreira, 2012). En muchos países la seroprevalencia de EHV-1 y EHV-4 es muy alta (Maanen, 2002). Sin embargo la interpretación puede ser confusa ya que test serológicos como la seroneutralización y la fijación de complemento, no pueden diferenciar anticuerpos de los dos virus debido a la reactividad antigénica cruzada entre ellos (Hartley y col, 2005). En un estudio de protección cruzada realizado en ponies, Edingtony Bridges (1990), detectaron una respuesta cruzada para EHV-4, luego de una infección primaria con EHV-1 pero cuando eran infectados con EHV-4 no se obtenía una respuesta de inmunidad cruzada para EHV-1. En otro estudio, se comprobó seroconversión cruzada en caballos infectados con EHV-1 y EHV-4 (Hartley y col, 2005). A los efectos de evitar los problemas de interpretación de los resultados, ocasionados por las reacciones serológicas cruzadas, se han desarrollado pruebas de ELISA tipo específicas, basadas en el uso de anticuerpos monoclonales anti glicoproteína G (Crabb y Studdert, 1993) y péptidos sintéticos producidos a partir de la glicoproteína E de EHV-1 y glicoproteína G de EHV-4 (Lang y col, 2013).

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

Por ejemplo, Crabb y Studdert, 1993, usando una prueba de ELISA tipo específica, realizaron un muestreo aleatorio en SPC en Australia en el período 1967-1976 y el año 1993, encontrando una prevalencia de 9-28% para EHV-1 y 100% para EHV-4. Posteriormente, los mismos autores hallaron que luego de la primer confirmación de aborto por EHV-1 en

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

Por otra parte, en un estudio seroepidemiológico realizado en Turquía en caballos, se encontró 14,5% de seropositividad para EHV-1, mientras que el 81,7% fueron positivos a EHV-4 (Ataseven y col, 2009). En otro estudio serológico realizado en el Estado de San Pablo -Brasil en el 2004, se obtuvo una prevalencia del 26% para EHV-1 (Cunha y col, 2009) mientras que otro estudio realizado en el Estado de Minas Gerais en el 2010 se obtuvo una prevalencia menor (18,7%), probablemente debido a que las muestras colectadas fueron tomadas de animales asintomáticos (Lara y col, 2010). En el Estado de Pará, Heinemann y col. (2002), reportaron una prevalencia similar (17,71%).

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

Se observó una prevalencia menor en los estratos menores de 5 años que en la categoría de 5-10 años de edad, lo cual coincide con lo descrito en otros países, donde la prevalencia es mayor en los adultos que en potrillos (Gilkerson y col, 1999). Sin embargo cuando analizamos por la raza y vacunación en el análisis de regresión logística, no se observó el efecto de la edad sobre la seroprevalencia. Tal vez, la razón se deba a que no se pudo substratificar la categoría de equinos menores de 3 años, para poder evidenciar diferencias significativas entre los estratos menores (por ejemplo 1, 2, y 3 años de edad). Según los resultados del análisis de regresión logística, la con-

dición de la raza árabe, junto con la Anglo-Arabe, Oldenburg y KWPN, obtuvo mayor probabilidad de presentar seropositivos que las otras razas, y el efecto es mayor en las poblaciones vacunadas, comprobándose que el factor vacunación también afecta la seroprevalencia.

Esta diferencia entre las razas, podría estar debida a las condiciones de manejo, ya que el sistema de explotación de estas razas es más intensivo y quizás haya mayores tasas de contacto, exposición a diferentes factores ambientales, y planes de vacunación más rigurosos con niveles de inmunidad más altos por efecto “booster”. Por otro lado la diferencia genética entre las razas podrían ser una explicación plausible a las diferencias encontradas (Dunowska, 2014).

Conclusiones

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

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

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Dra. Maria Barrandeguy y a la Lic. Aldana Vissani por el envío de los reactivos de referencia y por su apoyo en el desarrollo del trabajo. También agradecen a la Dra. Helena Guarino y al Dr. Néstor D'Anatros por facilitar la recolección de muestras del Banco de Sueros. También expresan su agradecimiento a los veterinarios en el ejercicio liberal especialistas en equinos y a las secretarías de DILAVE, Adriana Barrios y Elisa Ferreira, por su colaboración en la búsqueda de datos de identificación de las muestras. También desean agradecer a la Lic. Ruth Santestevan por su colaboración en la revisión de las referencias bibliográficas. El trabajo fue financiado por el Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria de UdelaR y por el Proyecto JICA-DILAVE-MGAP.

Bibliografía

- Allen GP, Bryans JT. (1986). Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog Vet Microbiol Immunol* 2:78-144.
- Ataseven VS, Dagalp SB, Guzel M, Basaran Z, Tan M.T, Geraghty B. (2009). Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Res Vet Sci* 86:339-344.
- Crabb BS, MacPherson CM, Reubel GH, Browning GF, Studdert MJ, Drummer HE. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch Virol* 140:245-258.
- Crabb BS, Studdert MJ. (1993). Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J Virol* 7:6332-6338.
- Cunha EMS, Villalobos EMC, Nassar AFC, Lara, MCCSH, Peres NF, Palazzo JPC, Pino FA. (2009). Prevalência de anticorpos contra agentes virais herpesvírus equinos no sul do estado de São Paulo. *Arq Inst Biol* 76:165-171.
- Donald JJ. (1998). Epidemiology and diagnosis of equid herpesviruses 1 and 4 in horses in New Zealand. PhD thesis, Massey University, Palmerston North. 232p.
- Dunowska M. (2014). A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *NZ Vet J* 62:179-188.
- Easton C, Fuentealba NA, Paullier C, Alonzo P, Carluccio J, Galosi CM. (2009). Immunohistochemical and molecular detection of equine herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev Sci Tech* 28:1085-1090.
- Edington N, Bridges CG. (1990). One way protection between equid herpesvirus 1 and 4 in vivo. *Res Vet Sci* 48:235-239.
- Ferrari A. (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay. Informe final. Uruguay XXI, Montevideo. 150 pp.
- Galosi CM, Oliva GA, Etcheverrigaray ME. (1991). Herpes equino 1 y 4: agente etiológico y enfermedad. *Monogr Med Vet* 13:25-27.
- Gil A, Nari A, Hirigoyen D. (2009). Cadena Equina. En: Propuesta de líneas de investigación y acciones para el PLANISA. pp.160-172. IICA, Montevideo.
- Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN. (1999). Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet Microbiol* 68:27-34.
- Hartley CA, Wilks CR, Studdert MJ, Gilkerson JR. (2005). Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am J Vet Res* 66:921-928.
- Heinemann MB, Cortez A, Souza MDCC, Gotti T, Ferreira F, Homem VSF, Ferreira Neto JS, Soares RM, Sakamoto SM, Cunha EM, Richtzenhain LJ. (2002). Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da arterite viral dos equinos e do aborto viral equino no município de Uruará, PA, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 39:50-53.
- Lang A, de Vries M, Feineis S, Müller E, Osterrieder N, Damiani AM. (2013). Development of a peptide ELISA for discrimination between serological response to equine herpesvirus type 1 and 4. *J Virol Methods* 193(2):667-73.
- Lara MCCSH, Torelli CS, Cunha EMS, Villalobos EMC, Cunha MS, Bello ACP, Cunha AP, Reis JKP, Leite RC, Mori E. (2010). Inquéritosorológico da infecção por herpesvírus equino no Estado de Minas Gerais. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 47:352-356.
- Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJ, Horohov

-
- DW, Osterrieder K, Pusterla N, Townsend HG. (2009) Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med.* 23:450–461.
19. Maanen C van. (2002) Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet Quart.* 24:57-78.
 20. Maanen C van. (2001) Equine herpesvirus 1 and 4 and equine influenza virus infections: diagnosis, epidemiology and vaccinology. PhD thesis Utrecht University, Utrecht, the Netherland.
 21. OIE-World Organization for animal health. (2015) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponible en: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/AccessoAbril9,2016>.
 22. Patel JR, Heldens J. (2005) Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4): epidemiology, disease and immunoprophylaxis. A brief review. *Vet J.* 170:14–23.