Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Asociación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus herpes equino-1/4 y problemas reproductivos en yeguas de tres criaderos de caballo peruano de paso del distrito de Cieneguilla - Lima, Perú

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Javier Eduardo CANDELARIO MARÍN

ASESOR

Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Candelario J. Asociación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus herpes equino-1/4 y problemas reproductivos en yeguas de tres criaderos de caballo peruano de paso del distrito de Cieneguilla - Lima, Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.

1293

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

9(e) 167. 64.

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día viernes **20 de Octubre de 2017**, a las **11:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº 0198-EPMV/FMV-2017**, integrado por los siguientes profesores:

HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO	Presidente del Jurado
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Asesor de la Tesis
VÍCTOR LEYVA VALLEJOS	Miembro del Jurado
JUAN LÉVANO SARAVIA	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **CANDELARIO MARÍN, JAVIER EDUARDO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIRUS HERPES EQUINO-1/4 Y PROBLEMAS REPRODUCTIVOS EN YEGUAS DE TRES CRIADEROS DE CABALLO PERUANO DE PASO DEL DISTRITO DE CIENEGUILLA – LIMA, PERU"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Hermelinda Rivera Gerónimo: MV Mg. Prof. Principal, D.E

Alberto Manchego Sayán: Mg. MV Prof. Principal, D.E.

Víctor Leyva Vallejos: MV Dr. Prof. Principal D.E.

Juan Lévano Saravia: MV Prof. Asociado, T.P.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral Nº 0198-EPMV/FMV-2017

PRESIDENTE

HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

MIEMBROS

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN
Asesor de la Tesis

VICTOR LEYVA VALLEJOS

JUAN LEVANO SARAVIA

San Borja, 20 de octubre de 2017

Vº Bº

MV Mg. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Directora (E)
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS…… i

RESUMEN…….... ii

ABSTRACT…….. iii

LISTA DE FIGURAS, FOTOGRAFÍAS Y CUADROS…….. iv

I. INTRODUCCIÓN…….... 1

II. **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……** 4

2.1 ANTECEDENTES…….. 4

2.2 LOS VIRUS…….. 6

2.2.1 Taxonomía…… 6

2.2.2 Características……..….. 6

2.2.3 Estructura……..... 6

2.3 LOS HOSPEDEROS…….. 9

2.4 PATOGÉNESIS…….. 9

2.5 RESPUESTA INMUNE……... 13

2.6 DIAGNÓSTICO…….. 14

2.6.1 Aislamiento Viral……... 14

2.6.2 Detección de antígeno viral…….. 15

2.6.2.1 Inmunofluorescencia directa…… 15

2.6.2.2 Tinción con inmunoperoxidasa…….. 15

2.6.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)…… 16

2.6.2.4 Histopatología…… 16

2.6.3 Detección de Anticuerpos…….. 17

2.6.3.1 Ensayo inmunoabsorbente ligada a enzima (ELISA)……... 17

2.6.3.2 Neutralización Viral en Cultivos Celulares…… 18

2.7 EPIDEMIOLOGÍA……... 18

2.8 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD……. 21

III. MATERIALES Y MÉTODOS…….. 22

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS…… 22

3.2 MATERIALES…….. 23

3.2.1 Equipos de Laboratorio……... 23

3.2.2 Reactivos y Materiales de Diagnóstico……... 24

3.2.2.1 Reactivos……... 24

3.2.2.2 Materiales de Diagnóstico……... 24

3.3 MÉTODOS…… 24

3.3.1 Detección de Anticuerpos…… 24

3.3.1.1 Prueba de Neutralización Viral (NV) en cultivos celulares…….. 24

3.3.2 Análisis de Datos…… 26

IV. RESULTADOS…….. 27

V. DISCUSIÓN……. 34

VI. CONCLUSIONES…….. 39

VII. RECOMENDACIONES……... 40

VIII. LITERATURA CITADA…….. 41

IX. APÉNDICE……. 54

A Dios

A mis padres: María y Javier

A mi asesor de tesis: Dr. Alberto Manchego, por apoyarme incondicionalmente en la culminación de este trabajo.

A la Dra. Hermelinda Rivera, por su ayuda y orientación en el Laboratorio de Virología

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la asociación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el Virus Herpes Equino tipo 1 (VHE-1) / Virus Herpes Equino tipo 4 y problemas reproductivos en yeguas de tres criaderos de Caballo Peruano de Paso del distrito de Cieneguilla. Se colectaron muestras de suero (n=60) de todas las yeguas mayores a 3 años de edad, para la detección de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4 mediante la prueba de neutralización viral. Se realizó el análisis de registro de los tres criaderos para identificar a las yeguas con presencia y ausencia de problemas reproductivos en sus últimos dos años (2013-2015). El 76.67% (46/60) de las muestras tuvieron anticuerpos contra VHE-1/VHE-4. Los resultados muestran que el 57% (34/60) de las yeguas presentaron problemas reproductivos. El porcentaje de seropositividad en el criadero A fue del 100% (11/11), en el criadero B fue de 66.67% (16/24) y en el criadero C fue de 76% (19/25). Los títulos de anticuerpos neutralizantes tuvieron un rango entre 1:2 a ≥1:256, siendo los títulos de 1:2 a 1:8 presentes en el 28.3% de las muestras, de 1:16 a 1:64 en 43.5% y 1:128 a ≥1:256 en 28.3% de las muestras. La prueba Chi-cuadrado no mostró resultados significativos ($p>0.05$) para determinar la asociación entre la presencia de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4 y los problemas reproductivos en yeguas.

Palabras clave: Anticuerpos, Virus Herpes Equino tipo 1, equinos, neutralización viral.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the association between the presence of neutralizing antibodies against Equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) / Equine Herpesvirus type 4 (EHV-4) and reproductive problems in mares from three breeding sites of peruvian step horse in the Cieneguilla district. Serum samples (n=60) were collected from all mares over 3 years of age for the detection of neutralizing antibodies against EHV-1/EHV-4 by the viral neutralization test. The registration analysis of the three farms was performed to identify the mares with presence and absence of reproductive problems in their last two years (2013-2015). 76.67% (46/60) of the samples had antibodies against EHV-1/EHV-4. The results show that 57% (34/60) of the mares presented reproductive problems. The percentage of seropositivity in hatchery A was 100% (11/11), in hatchery B it was 66.67% (16/24) and in hatchery C it was 76% (19/25). Neutralizing antibody titers ranged from 1: 2 to ≥1: 256, with titers from 1: 2 to 1: 8 present in 28.3% of the samples, from 1:16 to 1:64 in 43.5% and 1: 128 to ≥1: 256 in 28.3% of the samples. The Chi-square test did not show significant results (p> 0.05) to determine the association between the presence of neutralizing antibodies against HEV-1 / HEV-4 and reproductive problems in mares.

Key words: Antibodies, Equine Herpesvirus type 1, equines, viral neutralization.

LISTA DE FIGURAS, FOTOGRAFÍAS Y CUADROS

Figura 1. Modelo estructural del virus herpes…… 7

Figura 2. Estructura del genoma del VHE-1 y VHE-4……... 7

Figura 3. Enfermedad respiratoria equina causada por VHE-1 o VHE-4…… 10

Figura 4. Técnica de coloración por inmunoperoxidasa para antígeno de VHE-1 en leucocitos mononucleares dentro del ganglio linfático submandibular de un caballo Infectado…….. 11

Figura 5. Diagrama esquemático de la patogénesis del VHE-1……. 12

Foto 1. Aborto de yegua con 7 meses de gestación por VHE-1…… 20

Foto 2. Descarga nasal mucopurulenta de un potrillo de 1 año de edad infectado con VHE-4…… 20

Cuadro 1. Número total de yeguas de los tres criaderos en estudio, con su respectivo historial reproductivo (n=60). Lima, 2016…… 23

Cuadro 2. Frecuencia de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4 en yeguas según criaderos, detectados por la Prueba de Neutralización Viral (n=60). Lima, 2016. …… 27

Cuadro 3. Número de yeguas que presentan anticuerpos positivos y negativos en tres criaderos con y sin problemas reproductivos (n=60). Lima, 2016 …… 28

Cuadro 4. Número de yeguas con títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/ VHE-4, según su registro reproductivo (n=60). Lima, 2016 …….. 29

Cuadro 4.1 Número de yeguas con títulos de anticuerpos bajos y altos contra VHE-1/ VHE-4, según su registro reproductivo (n=60). Lima, 2016 …… 30

Cuadro 5. Porcentaje de animales con títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4, según rango de edades (n=60). Lima, 2016 ……..…… 31

Cuadro 6. Número de yeguas con/sin problemas de abortos, según su determinación de anticuerpos (n=60). Lima, 2016 …… 32

Cuadro 7. Número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias, según su determinación de anticuerpos (n=60). Lima, 2016 …… 33

I. INTRODUCCIÓN

La Rinoneumonitis Equina (RNE) o aborto viral equino viene a ser una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los equinos, siendo el caballo y la mula las especies más susceptibles a la infección natural con el virus herpes equino tipo 1 (VHE-1), agente causal de esta enfermedad (Allen, 1986).

La RNE es de amplia difusión, producida por dos tipos de virus que pertenecen a la familia herpesviridae, el Virus Herpes Equino-1 (VHE-1) y Virus Herpes Equino-4 (VHE-4). Estos son virus de genoma DNA, con un tamaño entre 145-150 kb, cuyo genoma codifica para 76 genes, y pertenecen al subgrupo α-herpesvirus con una amplia distribución mundial (Harless y Pusterla, 2006).

Una característica importante de los virus herpes es la capacidad que tienen de permanecer en forma latente en los ganglios nerviosos especialmente en el trigémino, lo que favorece en un alto porcentaje que los animales permanezcan infectados de por vida. En este estadío puede ocurrir la subsecuente reactivación de la latencia, ocasionada por condiciones de estrés, desencadenando la eliminación del virus al medio ambiente lo cual ocasiona nuevos brotes de la enfermedad (Hamzah, 2008).

En los países en donde la enfermedad ha sido reportada, las pérdidas económicas son considerables y están representadas por la muerte de animales jóvenes a consecuencia de infecciones respiratorias y abortos en la gestación tardía, principalmente evidenciados en infecciones del VHE-1 (Allen *et al*., 1999; Reed y Toribio, 2004), aunque ocasionalmente se han descrito efectos en la gestación temprana con daño a nivel de la placenta y algunos abortos. En algunos casos los signos clínicos más evidentes son los abortos asociados con mieloencefalopatías (Smith *et al*., 2010 y Allen *et al*., 2008; Fritsche y Borchers, 2011). La patogenicidad del VHE-4 se ha asociado comúnmente a problemas respiratorios en animales jóvenes, y en menor proporción como causa de abortos (Ostlund 1990; 1993).

En Perú, la RNE fue reportada durante brotes de abortos en caballos de carrera (Rivera *et al*., 1975; Rivera *et al*., 1997) por aislamiento viral y serología en caballos de la costa (Ríos *et al*., 2002); y serología en todo el país (Galindo *et al*., 2014) indicando estos últimos autores que la enfermedad está presente en la población equina.

Independientemente de cuál sea el sistema de cría y reproducción el aborto representa un grave problema, considerando el valor económico e individual de los animales, así como el aumento de los costos adicionales asociados con la cría de yeguas, tratamientos médicos, costos de semen y del nacimiento de una nueva cría (Madill, 2002). Los problemas reproductivos en las yeguas son las patologías que limitan la producción en un criadero y por lo tanto es de mayor interés tener un certero diagnóstico de su causa, esto debido a que existen múltiples causas que las provocan. La gran mayoría son no infecciosos, pero dentro de los infecciosos, los agentes virales como el virus herpes equino (VHE) pueden causar epizootias de abortos y otros problemas reproductivos.

La mortalidad embrionaria (ME) hace referencia a las pérdidas embrionarias que ocurren desde el momento de la fertilización hasta el día 40 de la gestación (Madill, 2002) y se puede estimar con el número de pérdidas embrionarias con relación al número de yeguas preñadas. Según Kanitz *et al.* (2007), la incidencia de este evento es del 6.5% al 15%; según tales autores, una alta proporción (32%) de pérdidas gestacionales en la yegua puede ocurrir entre los días 12 y 39 después de la ovulación y disminuye a medida que avanza la gestación (Meyers *et al.,* 1991); esto se observa por ultrasonografía como un conceptus bien desarrollado y aparentemente normal rodeado por un endometrio edematoso que terminará en relajación del cérvix y la posterior expulsión del conceptus (Allen WR, 2000). El período fetal en el equino se inicia el día 40 de gestación, a partir de este período cualquier interrupción de la preñez se considera aborto (Brinsko *et al.,* 2011). Para otros autores el aborto equino se define como la pérdida de la preñez que ocurre antes de 300 días de gestación (Smith, 2008). El aborto puede ser precoz o tardío, pudiendo ser éste último confundido con un parto prematuro. En la yegua, se considera un aborto cuando hay expulsión de un feto no viable antes del día 290 de gestación (Hafez *et al.,* 2002). Siendo de mayor incidencia en esta especie que en otras (5 a 15%).

En la yegua gestante, el VHE-1 es la causa más frecuente de aborto infeccioso viral en el Perú. Una infección previa puede hacer que la yegua quede como portadora del virus, a pesar de presentar anticuerpos sanguíneos contra el virus, de manera que pueden producirse abortos sin que la yegua presente ningún signo clínico a causa de una activación viral por la disminución de las defensas durante la gestación. Los abortos suelen producirse entre el 7° y 11° mes de gestación. También puede ocurrir una reabsorción temprana del embrión. Existen vacunas disponibles para la prevención de VHE-1/VHE-4, sin embargo no todos los criaderos vacunan contra este virus, es el caso de este estudio realizado que los tres criaderos no cuentan con un Programa de Vacunación. Por todo lo mencionado anteriormente, el objeto de este estudio es determinar si existe una asociación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4 y problemas reproductivos en yeguas de tres criaderos de Caballo Peruano de Paso del distrito de Cieneguilla-Lima, Perú.

II.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES

Los antecedentes históricos de la Rinoneumonitis Equina (RNE) datan desde la mitad del siglo XIX (1851); se la considera como una enfermedad de distribución mundial (Matsumoto, 1965; Sabine, 1983; Smith,1986) y se creía que se trataba de un solo virus herpes equino tipo 1 (VHE-1) con dos subtipos de propiedades físico-químicas y biológicas definidas y con características patogénicas propias: el VHE-1 subtipo 1 que produce formas clínicas con sintomatología respiratoria, nerviosa, abortos y muertes perinatales y el VHE-1 subtipo 2 asociado con cuadros clínicos respiratorios (Burrows, 1969; Dutta, 1982; Turtinen, 1982; Patel, 1983; Allen, 1986; Chowdhury, 1986).

Actualmente se sabe que se trata de dos virus con características genéticas y antigénicas que permiten diferenciarlos por lo que se les denomina VHE-1 y VHE-4 (Simpson, 1981; Studdert, 1981; Allen, 1982; Allen, 1983; Studdert, 1983; Fitzpatnck, 1984; Studdert, 1984; Yeargan, 1985; Engels, 1986; Fenner, 1987).

La primera presentación clínica observada fue a comienzos de 1922, año en que se presentó un gran brote de abortos equinos en Kentucky (Estados Unidos de Norteamérica) (Dimock, 1933). En la década del 30 se asoció el aborto con la presentación respiratoria, al observar que las yeguas preñadas abortaban meses después del cuadro clínico respiratorio. Por diversos estudios se logró demostrar que los agentes causantes de los abortos y de la enfermedad respiratoria eran semejantes (Doll *et al.,* 1954). La asociación entre el HVE-1 y mieloencefalitis se reportó por primera vez en 1966, cuando se aisló el virus de tejido nervioso de animales con parálisis (Saxegaard, 1966). La presentación de cuadros encefalíticos ha sido reportada cada vez con mayor frecuencia, en forma independiente o asociada a cuadros respiratorios (Berríos, 1992; Perl *et al*., 1997).

La RNE se presentó en Chile por primera vez en el último trimestre de 1969, en un gran brote de abortos que duró aproximadamente hasta 1976, causando serias pérdidas económicas en la hípica nacional (Berríos y Celedón, 1992).

La existencia de la RNE en la República Argentina fue comunicada por primera vez en 1949 por Monteverde y Garbers (De Diego, 1974). Existen antecedentes de equinos serológicamente positivos desde el año 1965, aunque recién se consiguió aislar el VHE-1 en el año 1980, a partir de un feto abortado (Rufino, 2003).

La Universidad Nacional de Colombia, trabajando con muestras tomadas de un feto abortado proveniente de un criadero de equinos, con historia de importación de animales, lograron por primera vez el aislamiento de un VHE (Ramírez *et al.,* 2001).

Según reportes de la OIE, países de América que poseen reportes de la presencia del VHE son: Chile, Argentina, EUA y Canadá, en los cuales el virus se reporta como enzoótico; Brasil lo reporta desde 1994, México desde 1996; en Perú se reporta pero su dispersión se encuentra limitada a algunas zonas del país; en Panamá se tiene reportada y su último brote fue en 1997; en Uruguay se tiene evidencia serológica del agente; y en Paraguay se tiene evidencia de signos clínicos desde 2001, al igual que en la Islas Caimán; en República Dominicana hay presencia activa del virus desde 1997 hasta la fecha. A escala mundial se ha reportado en muchos países con fuerte influencia en la industria equina mundial, como Australia y Nueva Zelanda, en los cuales se encuentra el virus de manera enzoótica; República Checa, Dinamarca, Francia, Finlandia, Alemania, Hungría, Irlanda, Italia, Holanda, Noruega, Polonia, Rumania, Sudáfrica, España, Suecia, Suiza, Reino Unido, Emiratos Árabes, entre otros.

2.2 LOS VIRUS

2.2.1 Taxonomía

El virus de la RNE está incluido en la familia Herpesviridae que comprende al menos 100 virus distintos, subfamilia Alphaherpesvirinae, género Varicellovirus que involucra a los virus herpes bovino tipo 1, virus herpes porcino tipo 1 o virus de la enfermedad de Aujeszky, virus herpes humano tipo 3 (Johnson, 2011).

Existen otros virus herpes que afectan al equino, el virus herpes equino tipo 2 (VHE-2) causante de rinitis y conjuntivitis, el virus herpes equino tipo 3 (VHE-3) causante del exantema coital equino, una enfermedad venérea autolimitante y el virus herpes equino tipo 5 (VHE-5) al cual no se le atribuye patología específica (Crabb, 1995; Vasconcellos, 1997; Borchers *et al.*, 1999).

2.2.2 Características

Los virus herpes equino tipo 1 y tipo 4 se caracterizan por la capacidad que tienen de permanecer en forma latente en los ganglios nerviosos especialmente en el trigémino y en los leucocitos (células mononucleares de sangre periférica: CMSP), lo que favorece en un alto porcentaje que los animales permanezcan infectados de por vida. En este estadío puede ocurrir la subsecuente reactivación de la latencia, ocasionada por condiciones de estrés, desencadenando la eliminación del virus al medio ambiente lo cual ocasiona nuevos brotes de la enfermedad (Hamzah, 2008).

2.2.3 Estructura

El VHE-1 y VHE-4 presentan todas las características morfológicas de la familia Herpesviridae: poseen una envoltura lipoproteica laxa, el «Envelope» que le confiere al virión una forma ligeramente redondeada y un diámetro de 150 a 170 nm. La Cápside de simetría cúbica, está formada por 162 capsómeros alargados, de los cuales 150 son de sección hexagonal y 12 pentagonales (en los vértices). El diámetro aproximado de la nucleocápside es de 100-110 nm. (Coto, 1983; Carballal, 1991).

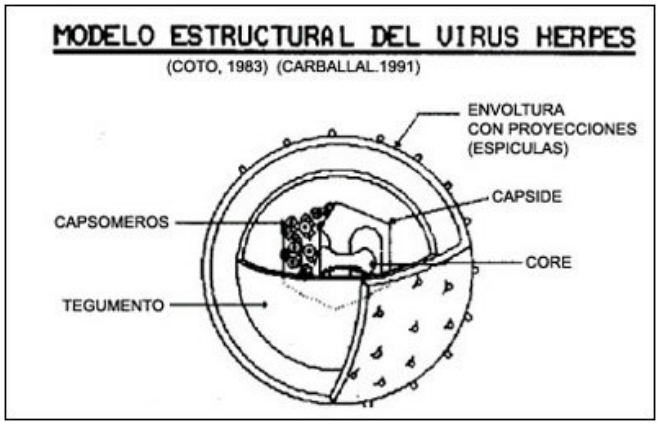


Figura 1. Modelo estructural del virus herpes (Coto, 1983; Carballal, 1991)

El genoma de VHE-1 está constituido por un genoma ADN de cadena doble entremezclada (dsADN) de 94 MDa (megadaltons), formada por una región L de 73 MDa covalentemente ligada a una región S de 21 MDa. La región S contiene dos cadenas idénticas repetidas IRs de 8 MDa, que sostienen una región única, corta de 5 MDa denominada U y que permite que la región S se invierta en su orientación relativa a la región fija L (Baumann, 1989). El genoma del VHE-4 es semejante al anterior y está formado también por una cadena doble de ADN de 144 kpb (kilopares de bases) compuesta de dos segmentos covalentemente ligados, uno de 109 kpb denominado L y otro de 35 kpb denominado S (Cullinane,1988; Nicolson, 1990).

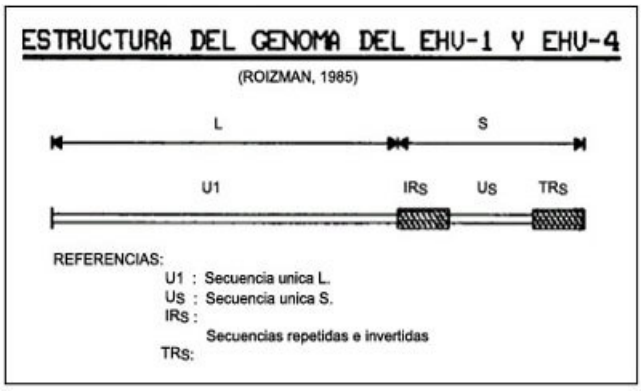


Figura 2. Estructura del genoma del VHE-1 y VHE-4 (Roizman, 1985)

Ambos virus poseen una capacidad de código de 80 a 100 genes y sus genomas son colineales con los de Herpes Single Virus (HSV), Pseudorabies Virus (PRV) y Varicella Zoster Virus.

Los VHE-1 y VHE-4 presentan un 10 a 20 % de homología en sus genomas lo que sugiere que ambos virus proceden de un progenitor común; sin embargo, sus perfiles aritigénicos pueden ser distinguidos por endonucleasas de restricción, fingerprints, y por sus propiedades patogénicas para el equino (Allen, 1986).

El virión posee 28 proteínas estructurales cuyos pesos moleculares oscilan entre 276 Kd y 16 Kd (Kilodaltons). Ambos virus expresan seis glicoproteínas mayores designadas: Gp2; Gp10; Gp13; Gp14; Gp17/18 y Gp21 /22, con pesos de 200 Kd, 125, 95, 90, 68 y 45 respectivamente y seis glicoproteínas menores. Todas son constituyentes de la envoltura o envelope y algunas, se proyectan hacia afuera en forma de protuberancias o espículas. Presentan de 6 a 8 polipéptidos, que se encuentran en la estructura amorfa denominada tegumento que separa la cápside del envelope (Turtinen, 1982; Allen, 1987). Poseen además 5 proteínas mayores que pertenecen a la nucleocápside, siendo la proteína denominada VP 9 la que se encuentra en mayor proporción representando el 65% del total de la masa proteica de la cápside.

Propiedades biológicas, relacionadas con la capacidad de adsorción, penetración, tipo y variación antigénica, residen en las glicoproteínas del envelope (Papp-Vidd, 1979; Ben Portat, 1986; Bridges, 1988; Crabb, 1990). Entre los dos tipos de HVE se observan diferencias de movilidad electroforéticas en gP 2, 13, 14, 18 y 25, también en VP 24a, 26a y 26b (Meredith, 1989). gP 2, 10, 13 y 14 se encuentran en ambos tipos vírales y de ellas gP 2 y 14 muestran experimentalmente mayor reacción cruzada (Whittaker, 1990), gP 18 y 22a son específicas de tipo (Bryans, 1976; Turtinen, 1982).

La porción genómica del VHE-1 que codifica las seis glicoproteínas mayores ha sido identificada: cinco de las glicoproteínas son codificadas desde secuencias que se encuentran dentro de la región L mientras solo una de ellas (gP 17/18) es codificada en la región S (Audonnet, 1990). Allen y Yeargan (1987) sostienen que algunas de las glicoproteínas que se encuentran en el virión en menores cantidades y otras aún no identificadas podrían ser codificadas en la región S. El análisis de la secuencia de nucleótidos de la Gp13 y Gp 14 del VHE-1 y VHE-4 revela una homología significativa con las glicoproteínas gC y gB respectivamente del virus herpes Simplex tipo 1 (Little, 1981; Riggio, 1989; Okazaki, 1990; Whittaker, 1991). Las glicoproteínas son los principales inmunógenos involucrados tanto en la respuesta humoral como celular (Ben Portat, 1986) y son los elementos a tener en cuenta para el desarrollo de futuras vacunas (Papp-Vidd,

1979). Anticuerpos monoclonales contra gp13, gp14 y gp17/18 protegen a hamsters frente a una descarga letal de VHE-1. Los genes gp13 y gp14 expresados separadamente o en asociación en vacunas experimentales con virus recombinantes de vaccinia han demostrado capacidad protectora en hamsters y la importancia del rol que tales glicoproteinas representan en la protección contra VHE-1 (Shimizu, 1989; Guo, 1989; Guo, 1990).

2.3 LOS HOSPEDEROS

Solamente los miembros de la familia Equidae (caballos, asnos y cebras) son hospederos naturales de estos virus (Montali, 1985) mientras que los hospederos experimentales incluyen hamsters de Siria lactantes y de 4 a 6 semanas de edad (Doll, 1953), ratones lactantes (Bartha, 1969), huevos embrionados (Doll, 1954a) y cobayos lactantes previo tratamiento con inmunosupresores. En in vitro se multiplica en cultivos de tejidos equinos (Bartha, 1969), en cultivos primarios de células de riñón ovino, porcino, bovino y conejo. También se ha adaptado a numerosas líneas celulares (Burrows, 1972); el VHE-1 se multiplica en una amplia variedad de las mismas, mientras que el VHE-4 lo hace selectivamente en células de origen equino y en la línea PK15 (riñón porcino). Producen un efecto citopatogénico que consiste en el redondamiento, aumento de tamaño y refringencia celular, formación de sincitios y lisis; también son observables cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos, con marginación de la cromatina (Burrows, 1969).

2.4 PATOGÉNESIS

El tracto respiratorio es la vía natural de entrada para VHE-1 y VHE-4, y la mucosa del epitelio respiratorio es el tejido blanco primario para la infección (Allen *et al*., 1986; Gibson *et al*., 1992; Allen *et al*., 1999). 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 infectivos generados por espiraciones forzadas y rápidas (resoplidos) están formados por partículas con una alta carga viral. Estos aerosoles pueden expandirse por cortas distancias entre los criaderos o corrales. La eficacia de transmisión por el aerosol y la consecuente capacidad de difusión rápida de infecciones por virus herpes generalmente es menor que las que se observan con el virus de la influenza. 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 virus herpes toma entre 2 y 5 días. Los caballos infectados por primera vez pueden eliminar el virus por períodos prolongados (hasta 14 días). El pico máximo de excreción viral ocurre 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 virus herpes que está infectando. La patología de la Enfermedad del Tracto Respiratorio Superior (ETRS) causada por virus herpes, 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 mononucleares en la lámina propia por debajo del epitelio destruido (Fig. 3) (Gibson *et al.*, 1992; Kydd *et al.*, 1994a).

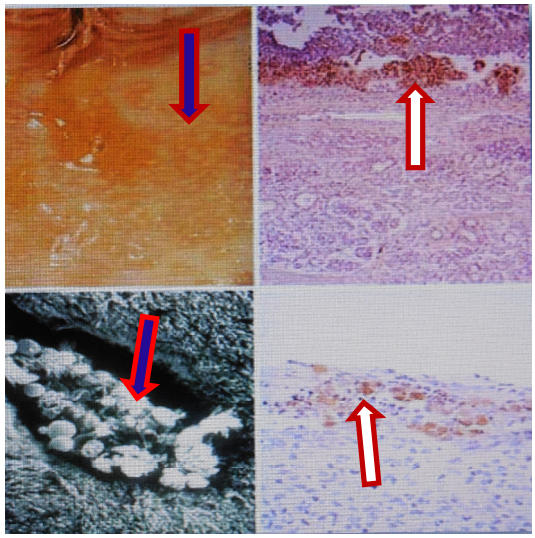


Figura 3. Enfermedad respiratoria equina causada por VHE-1 o VHE-4 que demuestran las lesiones herpéticas vesiculares en el mucosa nasal (arriba-izquierda), destrucción focal de las células respiratorias epiteliales ciliadas (abajo izquierda), y la presencia de antígenos virales (coloración marrón) en las células del epitelio nasal (derecha) (Reprod. de Allen GP, *et al.* 1999).

Los signos respiratorios de VHE-1 o VHE-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 (Prickett, 1970). 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. 4) (Kydd, 1994b).

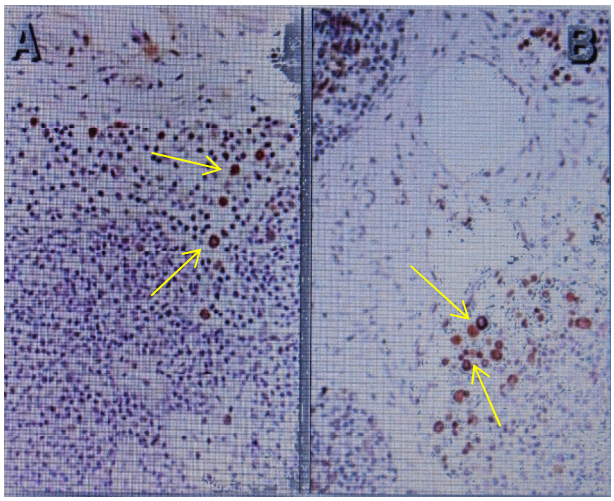


Figura 4. Técnica de coloración por inmunoperoxidasa para antígeno de VHE-1 en leucocitos mononucleares dentro del ganglio linfático submandibular de un caballo infectado. Los linfocitos que contienen al antígeno viral están presentes en el seno subcapsular (A), el seno medular (B), y dentro del parénquima de la corteza (A) del ganglio linfático. (Reproducido de Allen *et al*., 1999).

La infección de leucocitos mononucleares dentro de los ganglios linfáticos resulta en una viremia asociada a los leucocitos, que puede persistir durante varios días. Con VHE-1 en particular, la difusión viral a otros órganos 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 de la patogenia de las secuelas posteriores a cuadros respiratorios por VHE-1, ya sea de aborto o de enfermedad neurológica (Allen *et al*., 2002; Gibson *et al*., 1992).

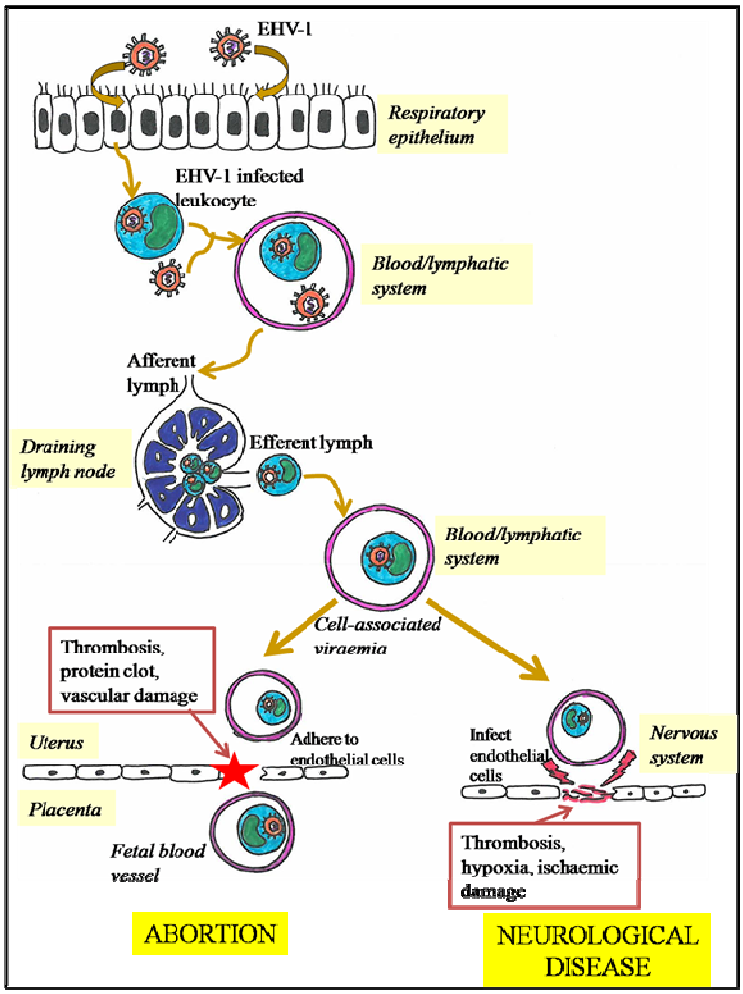


Figura 5. Diagrama esquemático de la patogénesis del VHE-1 (Allen, 1999)

2.5 RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune de los equinos a una infección por VHE-1 es similar a la de otras especies infectadas por virus herpes. El mecanismo es complejo y se conoce poco sobre el mismo. Incluye a la respuesta innata y adaptativa, tanto celular como humoral (Allen, 1986; Allen *et al*., 2004). Los Anticuerpos maternales transmitidos por el calostro protegen a los potrillos de la infección natural. La inmunidad conferida por ellos depende de su concentración en el calostro y del volumen ingerido por el potrillo en las primeras 24 horas de vida. Los anticuerpos calostrales poseen una vida media de 26 días y decaen exponencialmente, de manera que entre los 4-6 meses de edad los potrillos pueden ser infectados naturalmente. Sin embargo, se ha comprobado que a los 30 días pos parto los anticuerpos calostrales son prácticamente indetectables (Allen *et al*., 2004).

La infección natural del tracto respiratorio de los equinos es seguida por la rápida aparición de anticuerpos en sangre, aunque el título decae de manera exponencial; por lo tanto, los animales se tornan nuevamente susceptibles al virus entre los 4 y 5 meses posteriores a su recuperación. La resistencia a la reinfección durante este período se encuentra garantizada por: 1) los elevados niveles de Anticuerpos en sangre y en mucus nasofaríngeo, 2) la actividad proliferativa de linfocitos T CD4+ activados por el virus, 3) la presencia de precursores de linfocitos T citotóxicos CD8+ virus específicos, 4) la actividad de células *Natural Killer*, 5) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos virus específico (Allen *et al*., 2004). Cuando estos mecanismos de resistencia decaen, la mucosa respiratoria puede ser nuevamente reinfectada por el virus en forma repetida. Estas múltiples reinfecciones, no producen signos clínicos de enfermedad respiratoria, aunque pueden generar manifestaciones de enfermedad neurológica o abortiva. Si bien se sabe que la inmunidad mediada por células puede modificar la frecuencia de la enfermedad, contribuir a la recuperación de los animales y a la inhibición de la replicación viral *in vitro*, aún no se ha podido dilucidar exactamente el rol que la misma desempeña *in vivo*. El mecanismo por el cual el virus escapa a la neutralización por anticuerpos en su pasaje al feto, está estrechamente relacionado a la viremia asociada con células, de manera que el virus puede llegar al útero preñado sin ser afectado por la acción de los anticuerpos. La leucopenia que se observa durante la fase virémica es más intensa en

hembras preñadas, y debido a que sólo abortan una vez, se han sugerido alteraciones cualitativas de la inmunidad mediada por células (Mumford *et al*., 1994) aludiendo que la protección contra VHE-1 es compleja (Dunowska, 2014).

Los virus herpes, incluyendo VHE-1, han desarrollado sofisticados mecanismos para evitar ser eliminados mediante la respuesta inmune del hospedador, entre los que se encuentran: disminuir la expresión de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (CMH-1), evitar la lisis mediada por células *natural killer*, y permanecer quiescentes dentro de neuronas y linfocitos mediante el desarrollo de latencia (Huang *et al*., 2014).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Aislamiento Viral

Para un aislamiento primario eficaz del VHE-1 y VHE-4 de los caballos con enfermedad respiratoria, se deben utilizar cultivos celulares de origen equino. Los VHE-1 y VHE-4 se pueden aislar de muestras nasofaríngeas usando células primarias de riñón equino fetal o líneas celulares de fibroblastos equinos derivados de tejido dérmico (E-Derm) o pulmonar (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

Muestras de tejido: Para el aislamiento del VHE-1 se pueden utilizar varios tipos celulares (por ejemplo, riñón de conejo [RK-13 (AATC–CCL37)], riñón de hámster neonato [BHK-21], riñón bovino de Madin–Darby [MDBK], riñón de cerdo [PK-15], etc.). Puede resultar útil inocular muestras tanto en células no equinas como en células equinas paralelamente para distinguir entre el VHE-1 y el VHE-4 (que puede causar casos esporádicos de abortos) (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

Muestras de sangre: Tanto el VHE-1 como el VHE-4, aunque este último con menor frecuencia, pueden aislarse a partir del CMSP (células mononucleares de sangre periférica), (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

2.6.2 Detección de antígeno viral

2.6.2.1 Inmunofluorescencia directa

La detección de antígenos de VHE-1 por inmunofluorescencia directa en muestras de tejidos post-mórtem de fetos equinos abortados supone un método indispensable en los laboratorios para realizar un rápido diagnóstico preliminar de aborto por herpesvirus equino. Las comparaciones en paralelo de las técnicas de inmunofluorescencia y de aislamiento en cultivo celular en más de 100 casos de aborto equino proporcionan evidencia de que la fiabilidad diagnóstica de la tinción por inmunofluorescencia directa de tejidos fetales obtenidos en necropsias se aproxima a la del aislamiento de los virus en los mismos tejidos (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

La detección de antígenos de VHE por inmunofluorescencia directa en muestras de tejido postmórtem de fetos equinos y placentas abortados proporciona un rápido diagnóstico preliminar de aborto por virus herpes (Gunn, 1992). La fiabilidad diagnóstica de esta técnica se acerca a la del intento de aislamiento del virus a partir de los mismos tejidos (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

2.6.2.2 Tinción con inmunoperoxidasa

Se han desarrollado métodos inmunohistoquímicos de tinción enzimática (IH) (por ejemplo, con peroxidasa), que constituyen procedimientos para detectar antígeno del VHE-1 en tejidos fijados de fetos equinos abortados, tejidos placentarios o de caballos con afección neurológica (Schultheiss *et al*., 1993; Whitwell *et al*., 1992). Tales técnicas pueden utilizarse como alternativa a la inmunofluorescencia, que se describe arriba, y también pueden aplicarse fácilmente a las muestras tisulares de archivo. La tinción inmunohistoquímica del VHE-1 es particularmente útil para la evaluación simultánea de las lesiones morfológicas y la identificación del virus. También se puede realizar la tinción con inmunoperoxidasa para VHE-1 o VHE-4 sobre monocapas de células infectadas (Van Maanen *et al*., 2000). En cada prueba de inmunoperoxidasa deben incluirse controles adecuados para considerar tanto la especificidad del método como la especificidad del anticuerpo. En un Laboratorio de Referencia de la OIE, este método se utiliza de forma ordinaria para tejido congelado o fijado, empleando sueros policlonales de conejos expuestos al VHE-1. Este método de tinción no es específico de tipo y, por lo tanto, para

discriminar entre el VHE-1 y el VHE-4 tiene que combinarse con el aislamiento del virus o con una PCR, pero constituye un método útil para el diagnóstico rápido del aborto inducido por VHE (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

2.6.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se ha convertido en el principal método de diagnóstico para la detección de los VHE-1/4 en muestras clínicas, en tejido de archivo incluido en parafina o en cultivos celulares inoculados (Borchers, 1993; Lawrence *et al*., 1994; O'Keefe *et al*., 1994; Varrasso *et al*., 2001). Se han designado varios cebadores de PCR específicos de tipo para distinguir entre el VHE-1 y el VHE-4. La correlación entre la PCR y el aislamiento del virus es alta en el diagnóstico del VHE-1 y del VHE-4 (Varrasso *et al*., 2001). El diagnóstico por PCR es rápido, sensible y no depende de la presencia de virus infeccioso en la muestra clínica (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

Para el diagnóstico de la infección activa por VHE, la PCR es el método más fiable cuando las muestras son tisulares y proceden de fetos abortados o de tejido placentario, así como de hisopos de nasofaringe de potros y caballos de un año. Es especialmente útil en brotes epizoóticos explosivos de abortos o de enfermedad neurológica del tracto respiratorio en la que identificar rápidamente el virus resulta fundamental para orientar las estrategias de gestión, como las restricciones en los desplazamientos. La PCR de la médula espinal y del encéfalo, así como de leucocitos de sangre periférica (células mononucleares de sangre periférica-CMSP) es importante para el diagnóstico en caballos con signos neurológicos. No obstante, la interpretación de la amplificación por PCR de fragmentos genómicos del VHE-1 o el VHE-4 en ganglios linfáticos o del nervio trigémino de caballos adultos se complica por la alta prevalencia de ADN latente de VHE-1 y VHE-4 en estos tejidos (Welch *et al*., 1992) (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

2.6.2.4 Histopatología

Debe realizarse un examen histopatológico de los cortes de placenta y pulmón, hígado, glándulas suprarrenales y timo de fetos abortados; cerebro y médula espinal de caballos con afectación neurológica. En los fetos abortados, los cuerpos de inclusión

intranucleares eosinofílicos que se encuentran en el epitelio bronquiolar o en las células de la periferia de zonas de necrosis hepática son compatibles con un diagnóstico de infección por virus herpes. La lesión microscópica característica que se asocia a la neuropatía por el VHE-1 es una vasculitis trombótica degenerativa de los vasos sanguíneos pequeños del cerebro o la médula espinal (manguitos perivasculares e infiltración por células inflamatorias, proliferación endotelial y necrosis, y formación de trombos) (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

2.6.3 Detección de Anticuerpos

La concentración sérica de los anticuerpos anti-VHE-1/4 se puede determinar mediante pruebas de neutralización de los virus (NV) (Thomson *et al.,* 1976), pruebas de fijación de complemento (CF) (Thomson *et al*., 1976) o ELISA (Crabb*et al*., 1995a). No hay reactivos o técnicas internacionalmente estandarizadas para realizar ninguna de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a los VHE-1/4; las determinaciones del título en un mismo suero pueden ser diferentes de un laboratorio a otro. Además, la CF y la VN detectan anticuerpos que tienen reacciones cruzadas entre el VHE-1 y VHE-4. Sin embargo, la detección por cualquiera de estas pruebas de un incremento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos frente al VHE-1 o el VHE-4 a lo largo de la enfermedad es una confirmación serológica de infección reciente con uno de los virus. Se venden kits de ELISA específicos de tipo (Manual Terrestre de la OIE, 2015).

2.6.3.1 Ensayo Inmunoabsorbente Ligada a Enzima (ELISA)

Se la considera de mayor sensibilidad que la prueba de Neutralización Viral, aunque menor que la prueba de PCR. El desarrollo de ELISAS específicos de tipo, que detecte anticuerpos a epítope específico tipo inmunodominante de gG ha permitido el serodiagnóstico específico de infecciones entre VHE-1 y VHE-4 (Crabb y Studdert, 1993; Crabb *et al*., 1995a; Yasunaga *et al*., 1998; Van Maanen, 2002). También se han desarrollado ELISA de bloqueo para el diagnóstico de esta infección, los cuales son fáciles de utilizar, económicos en el uso de reactivos y no necesitan de ambas cepas (VHE-1 y VHE-4) para el diagnóstico serológico de VHE-1 o VHE-4 (Van Maanen *et al*., 2000; Van Maanen, 2002).

2.6.3.2 Neutralización Viral en Cultivos Celulares

Viene a ser una prueba serológica extensamente usada y recomendada por la OIE para el diagnóstico de RNE. Posee alta especificidad y detecta anticuerpos neutralizantes o protectores. La prueba se basa en que los anticuerpos específicos o neutralizantes presentes en el suero del animal son capaces de neutralizar el efecto citopático del virus el cual es detectado mediante la adición de un indicador que son las células (O'Neill *et al*., 1999; Van Maanen, 2001).

2.7 EPIDEMIOLOGÍA

Los virus herpes son enzoóticos en la mayoría de la población equina. Muchos estudios documentan un gran número de caballos seropositivos a VHE-4 y en menor medida a VHE-1, pues en los adultos se produce una seroconversión del virus al tipo 4 (Edington *et al,* 1994; Gilkerson *et al,* 1998).

Los factores epidemiológicos más destacables son la temprana infección de los caballos jóvenes, afectando a un gran número de ellos, y el estado de latencia en el que queda el virus en los caballos adultos tras la infección. La presentación de ambos virus herpes en potrillos menores de 3 meses nacidos de yeguas vacunadas no es común debido al paso de anticuerpos. El VHE- 4 es, principalmente, significativo en *yearlings* (crías de 1 año). En potros de 2 a 3 años confinados en centros de entrenamiento la aparición de la enfermedad respiratoria es en brotes agudos y de forma autolimitante y también está asociada al VHE-4. Los caballos mayores de 3 años de edad que han sido expuestos a la infección muestran evidencia serológica de reinfecciones por VHE-1 y VHE-4 (Wood *et al*, 1995).

Una característica muy importante de este virus es que puede quedar latente. La latencia se produce cuando después de una infección no es reconocido ni destruido por el sistema inmune, permaneciendo en el organismo durante toda la vida. Las zonas típicas donde el virus permanece latente son los ganglios del tracto respiratorio y el ganglio trigémino. Esta característica ha sido demostrada en el 40-60% de los caballos previamente infectados y representa un papel muy importante en la prevalencia del VHE-1

y VHE-4, así como en su difusión. Es una situación reversible en la cual el genoma vírico, tras episodios de estrés o administración de corticoides a dosis altas, puede ser reactivado (Allen, 2002). Las cirugías, transportes, concursos, partos, lactación, temperaturas extremas y otras alteraciones en la vida del caballo pueden producir reinfecciones. Una vez que se ha reactivado el virus, se multiplica e invade el epitelio de las vías aéreas. En la mayoría de los casos no aparecen signos clínicos de enfermedad respiratoria por lo que representan una fuente de contagio importante. Cuando ocurre en una yegua gestante puede sufrir un aborto o puede no ser afectada, además contagiará a otras yeguas gestantes y por ende pueden abortar. Si se produce en una yegua con potrillo, lo infectará y el virus podrá quedar en estado de latencia (Edington *et al.,* 1994).

Es un virus muy contagioso y se contagia rápidamente entre los animales susceptibles. En un animal infectado el riesgo de transmitir la enfermedad es muy alto durante los primeros 10 días y disminuye significativamente después de los 28 días, que es el tiempo que se recomienda mantener el aislamiento (Allen, 2002).

La transmisión se produce a través del tracto respiratorio, por contacto directo o indirecto con las secreciones nasales y conjuntivales de todos los casos respiratorios y neurológicos. Las yeguas que presentan problemas de abortos o potrillos enfermos, se contagian a partir de las placentas, membranas fetales, secreciones y excreciones de los neonatos infectados (Slater, 2007).



Foto 1. Aborto de yegua con 7 meses de gestación por VHE-1 (Fotografía propia)



Foto 2. Descarga nasal mucopurulenta de un potrillo de 1 año de edad infectado con VHE-4 (Fotografía propia)

2.8 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

El programa de prevención y control de la rinoneumonitis equina, está basado en un plan de vacunación profiláctico enfocado a incrementar la inmunidad contra el VHE-1 y VHE-4 en la población animal. La vacunación para yeguas preñadas debe realizarse en el 5º, 7º y 9º mes de gestación para proveer protección en los meses donde el feto es más susceptible a la infección viral. La vacunación a los potrillos debe comenzarse con una primovacunación a los 4-6 meses de edad, seguido de una segunda vacunación 4-6 semanas posterior a la primera administración y por último una tercera aplicación a los 10-12 meses de edad (Timoney, 2011). Se recomienda la revacunación cada 4 meses de intervalo.

Se dispone de vacunas vivas atenuadas y de vacunas inactivadas como productos autorizados y preparados para la utilización comercial como ayuda profiláctica en la reducción de los casos de enfermedad causada por la infección con los VHE-1/4. La experiencia clínica ha demostrado que ninguna de las preparaciones de vacuna proporciona un grado absoluto de protección contra la enfermedad. Los fabricantes respectivos recomiendan dosis múltiples, con la repetición anual, de las vacunas contra la rinoneumonitis equina comercializadas en la actualidad, con cronologías de vacunación que varían dependiendo de la vacuna en particular (OIE, 2015).

Las prácticas a ejecutarse durante los brotes de infección por VHE-1/4 apuntan a reducir la diseminación de aerosoles infecciosos, el contacto directo, y fómites contaminados, así como a reducir el estrés inducido por la infección latente. Implementar prácticas de aislamiento, cuarentena y desinfección son claves importantes para el control de la enfermedad. Si se presentan síntomas respiratorios sugestivos de infección por VHE-1/4, al igual que abortos sospechosos por rinoneumonitis, se debe aislar a los animales afectados con prontitud y por completo del resto de los ejemplares (OIE, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se utilizaron 60 yeguas de tres criaderos de la raza Caballo Peruano de Paso (CPP), ubicadas en diferentes zonas del distrito de Cieneguilla que se encuentra a 30 Km. de la ciudad de Lima. Sus límites son: por el Norte con Ate-Vitarte y Chaclacayo, por el Este con el distrito de Antioquía (Huarochirí) y por el Sur y Oeste con el distrito de Pachacámac a una altitud media de 300 msnm, 12º05'30" de latitud sur y 76º46'30" de longitud oeste; temperatura promedio de 18ºC, humedad relativa de 85%.

El peso corporal estuvo entre 350 y 400 Kg. aproximadamente y con una buena condición corporal (en promedio 6/9) para los criaderos A y C, el criadero B con un peso corporal entre 300 y 350 Kg. y con una condición corporal en promedio 4.5/9. Los animales de los criaderos A y B se encontraban estabulados en corrales y boxes. Los caballos del criadero C, se ubicaban de la siguiente manera: las yeguas gestantes, yeguas vacías, potrancas, potrillos destetados mayores de 4 meses se encontraban en cuatro corrales amplios respectivamente; los potros y sementales se encontraban individualmente estabulados en corrales y boxes. La alimentación era a base de heno o chala verde más alimento balanceado (criapotrina) y sal en bloque a voluntad (criaderos A y C). En el criadero B, se alimentaba a los animales con heno más concentrado (mezcla de maíz, afrecho y cebada).

En los diferentes criaderos, se utilizaban reproductores machos del mismo criadero por monta natural o inseminación artificial, también sementales de otros criaderos aledaños o fuera del distrito de Cieneguilla mayormente por inseminación artificial.

Se tomaron muestras de sangre de 60 yeguas mayores de 3 años de edad, por medio de punción yugular con el sistema vacutainer procedentes de tres criaderos de Caballo Peruano de Paso en el distrito de Cieneguilla en el mes de agosto del año 2015. Luego de inmediato se transportó con cadena en frío (caja de tecnopor más gel refrigerante) a la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de

la FMV-UNMSM, después de la coagulación sanguínea se separó el suero y se guardó a -20ºC hasta el momento de su procesamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número total de yeguas de los tres criaderos en estudio, con su respectivo historial reproductivo (n=60). Lima, 2016

Nombre Criaderos	Nº total de yeguas	Nº yeguas con problemas reproductivos	Nº yeguas sin problemas reproductivos	Nº de yeguas con abortos	Nº de yeguas con mortalidades embrionarias
A	11	8	3	4	5
B	24	15	9	10	13
C	25	11	14	8	10
TOTAL	**60**	**34**	**26**	**22**	**28**

Nº yeguas con problemas reproductivos: Aquí está incluido las yeguas con abortos y mortalidades embrionarias. *Hay animales que han tenido tanto abortos como mortalidades embrionarias, yeguas con sólo abortos y otras solamente con mortalidades embrionarias*.

Son determinadas como muertes embrionarias a aquellas yeguas que han sido diagnosticadas como preñadas con ecografía y que presentan celo post diagnóstico.

Ver en Apéndice 1 (página 55): Historial de Salud Reproductiva de los 60 animales.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Equipos de Laboratorio

Centrífuga, Refrigeradora, Baño María (PrecisionScientific, USA), Congeladora Cryotechnics L. T. Freezer -40ºC, Aparato de Flujo Laminar, Cabina de células tipo III, Estufa con 5% CO_2 a 37ºC (Memmert, Alemania), Estufa para incubar microplacas (37ºC), Autovortex Mixer SA2 (agitador magnético), Microscopio de luz invertida (Leitz), Frasco de Erlenmeyer de 50 mL, Propipeta, , micropipetas de 50 µL y 100 µL, pipeta multicanal de 50 µL y 100 µL, pipetas simples (1 mL, 5 mL y 10 mL).

3.2.2 Reactivos y Materiales de Diagnóstico

3.2.2.1 Reactivos

Medios para cultivo celular (solución 10% primarios y 3% primarios), Tripsina Versene, Medio de cultivo MEM: Minimal Essential Medium (Es un diluyente de suero más antibiótico), suero fisiológico para medios.

3.2.2.2 Materiales de Diagnóstico

Viales eppendorf, microplacas de 96 pocillos, canaletas, tips, frascos de cultivo celular (pequeños y grandes), papel toalla, algodón y alcohol 70º.

❖ **Cultivo de Células**

Se realizó un cultivo de células secundarias de cornete nasal de feto bovino (CNB), aisladas de acuerdo al protocolo desarrollado por la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM.

❖ **Cepa viral**

Se empleó la cepa viral procedente de EE.UU. (Vacunal Rhinomune HVE-1), donado por el Dr. Robert Ellis, adaptada a células de cornete nasal de feto bovino, con un título de $100^{-5}DI_{50}CC/50$ µL mantenida en congelación a -70ºC como cepa de laboratorio.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Detección de Anticuerpos

3.3.1.1 Prueba de Neutralización Viral (NV) en cultivos celulares

Se utilizó el método de microtitulación en microplacas descartables de 96 pocillos según el protocolo disponible en la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM.

Procedimiento

- Las muestras de suero equino fueron inactivadas a una temperatura de 56ºC (Baño María) durante 30 minutos.
- Se prepararon los controles de virus en concentraciones de 100 DI_{50} CC/50 µL y 10 DI_{50} CC/50 µL, 1 DI_{50} CC/50 µL y 0.1 DI_{50} CC/50 µL.
- Se distribuyó 50 µL del medio MEM (diluyente más antibiótico) en todos los pocillos de las microplacas, desde las hileras A hasta la H (5 placas), excepto los pocillos destinados a ser el control celular (placa VI).
- Se agregaron 50 µL de cada uno de los sueros problemas a los pocillos de 5 microplacas y parte de la placa VI.
- Se hicieron diluciones seriadas dobles de cada suero, comenzando con la dilución 1:2 (fila H), 1:4 (fila G), 1:8 (fila F) hasta llegar a 1:256 (fila A).
- Se añadieron 50 µL del virus conteniendo las 100 DI_{50} CC/50 µL a todos los pocillos, con excepción del control celular.
- Las placas fueron incubadas a 37ºC por una hora.
- Se añadió 100 µL de una suspensión de células de cornete nasal de feto bovino a todos los pocillos en una concentración de $3x10^5$ células/mL.
- Por último, las microplacas fueron incubadas en un horno con una atmósfera de 5% de CO_2 y una temperatura de 37ºC. Los resultados se leyeron a las 72 horas.

El título de anticuerpos del suero fue la dilución mayor que neutralizó el 100% de la capacidad infectante del virus.

Lectura

Los resultados se evalúan conforme al efecto citopático que provoca el virus. La ausencia de efecto citopático indica la presencia de anticuerpos neutralizantes, es decir, hay más anticuerpos y menos virus, bloquean todo el 100% de virus. Por el contrario, la presencia de efecto citopático es cuando hay menos anticuerpos y más virus, estos infectan a las células multiplicándose y generando su destrucción.

Los títulos de anticuerpos se agruparon en *(clasificación arbitraria, elaboración propia):*

Bajos.- De 1:2 a 1:8

Medios.- De 1:16 a 1:64

Altos.- De 1:128 a 1:>256

3.3.2 Análisis de Datos

Se utilizó el Test Chi-cuadrado (X^2) para tablas de contingencia 2x2. Esta prueba va a permitir determinar el grado de asociación o independencia entre las dos variables en estudio: anticuerpos neutralizantes contra Virus Herpes Equino tipo 1 (VHE-1) y Virus Herpes Equino tipo 4 (VHE-4) y problemas reproductivos (abortos y/o mortalidades embrionarias).

IV. RESULTADOS

Luego del análisis serológico la prevalencia de anticuerpos en los animales evaluados fue: del total de muestras evaluadas (n=60), el 76.67% (46/60) resultaron positivas a anticuerpos contra VHE-1/VHE-4. Los resultados por criaderos estuvieron asociados con la seropositividad, la cual fue variable con valores de prevalencia para los VHE-1/4 desde un 100% (11/11), 66.67% (16/24) y 76% (19/25) para los criaderos A, B y C respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4 en yeguas según criaderos, detectados por la Prueba de Neutralización Viral (n=60). Lima, 2016

Criadero	Nº de yeguas totales	Positivos a Anticuerpos contra VHE-1/VHE-4	
		nº	%
A	11	11	100.00
B	24	16	66.67
C	25	19	76.00
Total	60	46	76.67

El Cuadro 3, indica que del total de las 60 yeguas muestreadas, 34 (57%) yeguas tuvieron problemas reproductivos. De ellas, 28 son positivas y 6 son negativas a la presencia de anticuerpos contra VHE-1/4. Estos animales positivos indican indirectamente la presencia del virus herpes equino en los criaderos y en el distrito muestreado.

Cuadro 3. Número de yeguas que presentan anticuerpos positivos y negativos en tres criaderos con y sin problemas reproductivos (n=60). Lima, 2016

Yeguas / Anticuerpos	CPR	SPR	TOTAL
Positivos	28	18	**46**
Negativos	6	8	**14**
TOTAL	**34 (57%)**	**26 (43%)**	**60 (100%)**

CPR: Con Problemas Reproductivos

SPR: Sin Problemas Reproductivos

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado: x^2_{calc} =1.42, p=0.2337

El análisis estadístico del Chi-cuadrado nos determinó un x^2_{calc} = 1.42; p = 0.2337, indicando que no hay asociación estadística significativa entre la presencia de problemas reproductivos y la presencia de anticuerpos contra VHE-1/4.

Las yeguas seropositivas al VHE-1/4 fueron evaluadas según los títulos de anticuerpos: en bajos (de 2 a 8, inversa de la dilución en la prueba de virus neutralización), medios (de 16 a 64) y altos (de 128 a ≥256), siendo los títulos medios los que predominan en la población muestreada ((20/46)*100=43.5%), y con igual número de animales con títulos de anticuerpos bajos ((13/46)*100=28.3%) y altos (28.3%); esto indica que el virus está activo en los tres criaderos, existiendo reservorios naturales de este patógeno y que la exposición al mismo sea inevitable en los diferentes criaderos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de yeguas con títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4, según su registro reproductivo (n=60). Lima, 2016

Criadero	Yeguas	Con Título de Anticuerpos* contra VHE-1/VHE-4 (Positivos)			
		Bajos (2 a 8)	Medios (16 a 64)	Altos (128 a ≥256)	Total
A (n_A=11)	SPR	0	1	2	**3**
	CPR	1	4	3	**8**
B (n_B=24)	SPR	3	2	1	**6**
	CPR	4	3	3	**10**
C (n_C=25)	SPR	2	5	2	**9**
	CPR	3	5	2	**10**
	Total	**13**	**20**	**13**	**46**

***Inversa de la dilución del suero**

SPR: Sin Problemas Reproductivos

CPR: Con Problemas Reproductivos

Cuadro 4.1 Número de yeguas con títulos de anticuerpos bajos y altos contra VHE-1/VHE-4, según su registro reproductivo (n=60). Lima, 2016

Yeguas / Anticuerpos	Bajos	Altos	TOTAL
Positivos	5	13	**18**
Negativos	8	20	**28**
TOTAL	**13**	**20**	**46**

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado **:** x^2_{calc} =0.00, p=0.9535

Con corrección de Yates: x^2_{calc} =0.08, p=0.7817

El análisis estadístico del Chi-cuadrado entre la presencia de bajos/altos niveles de anticuerpos contra VHE-1/4 y los anticuerpos positivos/negativos, indican que no hay asociación estadísticamente significativa (p>0.05): X^2 = 0.08, p=0.7817 con corrección de Yates.

Las yeguas con edad comprendidas entre 3 a 8 años tienen un mayor número de seropositivas (n=31) que las yeguas de 9 a 14 años (n=11) junto con las de mayor edad de 15 a 20 años (n=4), siendo éstas últimas los de menor número de animales seropositivas (9%) (Cuadro 5).

Cuadro 5: Porcentaje de animales con títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/VHE-4, según rango de edades (n=60). Lima, 2016

Rango de edades de yeguas (años)	Con Título de Anticuerpos* contra VHE-1/VHE-4 (Positivos)				
	2-8	16-64	128- ≥256	Total	%
3-8	8	14	9	31	**67**
9-14	4	4	3	11	**24**
15-20	1	2	1	4	**9**
Total	**13**	**20**	**13**	**46**	**77**

***Inversa de la dilución del suero**

En el cuadro 6, se observa que existen 17 yeguas positivas a anticuerpos con problemas de abortos y 5 yeguas seronegativas también tuvieron problemas de abortos, sin embargo al evaluar la asociación estadística con la prueba Chi-cuadrado se determinó que el número de yeguas con/sin problemas de abortos son independientes de su determinación de anticuerpos ($p>0.05$).

Cuadro 6. Número de yeguas con/sin problemas de abortos, según su determinación de anticuerpos (n=60). Lima, 2016

Yeguas / Anticuerpos	Con Abortos	Sin Abortos	TOTAL
Positivos	17	29	**46**
Negativos	5	9	**14**
TOTAL	**22**	**38**	**60**

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado **:** x^2_{calc} =0.01, p=0.9327

Con corrección de Yates: x^2_{calc} =0.05, p=0.8163

En el cuadro 7, se evalúa las mortalidades embrionarias y la presencia de anticuerpos contra VHE-1/VHE-4, observándose que 28 yeguas tuvieron diagnóstico de mortalidad embrionaria de las cuales 23 tuvieron anticuerpos contra VHE-1/VHE-4 y 5 fueron seronegativas, sin embargo 5 yeguas seronegativas también tuvieron mortalidades embrionarias. Al evaluar la asociación estadística con la prueba Chi-cuadrado se determinó que el número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias son independientes de su determinación de anticuerpos ($p>0.05$).

Cuadro 7. Número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias, según su determinación de anticuerpos (n=60). Lima, 2016

Yeguas / Anticuerpos	Con Mortalidades Embrionarias	Sin Mortalidades Embrionarias	TOTAL
Positivos	23	23	**46**
Negativos	5	9	**14**
TOTAL	**28**	**32**	**60**

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado : x^2_{calc} =0.88, p=0.3482

Con corrección de Yates: x^2_{calc} =0.40, p=0.5272

V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el VHE-1/4, está presente en la población de yeguas con una prevalencia de 76.67%, siendo mayor al 48.9% detectado por Galindo *et al.* (2014) en un muestreo de caballos de todo el Perú y al de Ríos *et al*. (2002) que obtuvo un 44.2% muestreando caballos del Valle de Lima. Estas diferencias en las prevalencias se puede deber al diseño de muestreo entre los trabajos. El obtenido en este estudio es una prevalencia real ya que se han muestreado al 100% de las yeguas de los tres criaderos, mientras en el de Galindo *et al.* (2014) es un estimado de todo el Perú, significando que existen regiones del Perú en donde el virus está en bajas prevalencias y en otras regiones como en el distrito de Cieneguilla está en una alta prevalencia. La alta prevalencia en los criaderos muestreados (Cuadro 2), se puede deber a que los animales están en contacto con los reservorios biológicos conocidos del virus, mayormente animales que han superado los cuadros clínicos de la infección y tienen una infección latente, los cuales pueden servir como fuente directa de infección natural para caballos susceptibles. También están los caballos infectados activos, los cuales liberan progenie viral en las secreciones nasales, los fetos, membranas fetales o secreciones del tracto reproductivo de una yegua, luego de esta haber abortado por VHE-1 (Allen, 2002). De otro lado, se ha visto que la madres son la principal fuente de infección de estos virus para los potrillos, que se convierten en importantes reservorios para las poblaciones contiguas (Harless y Pusterla, 2006).

La mayor presencia de hembras seropositivas parece no tener importancia epidemiológica, al parecer, el sexo no se considera un factor de riesgo para adquirir la infección. Estudios en el Valle de Lima (Perú), mostraron que no existe asociación estadística entre los títulos a VHE-1/4 versus las variables sexo, actividad y procedencia de los animales (Ríos *et al*., 2002) lo cual sugiere que el sexo del animal no es un factor de predisposición a la enfermedad. Galindo *et al*. (2014), también afirma que la variable sexo no es factor de riesgo para la presentación de infecciones por RNE en el Perú.

La prueba de virus neutralización utilizado determina la presencia de anticuerpos neutralizantes, pero no distingue los anticuerpos específicos del Virus Herpes Equino-1 (VHE-1) y del Virus Herpes Equino-4 (VHE-4) (Thomson *et al.,* 1976), por lo que las prevalencias encontradas en este estudio es de virus herpes equino en general. Existen diferencias en las sintomatologías clínicas y patogenicidad entre estos virus herpes, siendo el VHE-1 más abortivo y presentación de cuadros respiratorios en forma epizoótica, mientras que el VHE-4 provoca cuadros respiratorios durante todo el año en forma más común (Matsumura *et al*., 1992). La alta seroprevalencia encontrada en los criaderos y la falta de cuadros clínicos severos podría deberse a la presencia del VHE-4, debido a que este virus está cada vez más difundido en la crianza en el mundo. Así, se ha reportado en un estudio transversal realizado en Turquía (1995) utilizando la prueba de ELISA tipo específica, con una población de 229 yeguas madres Pura Sangre Inglés (SPC) con potrillo al pie, se encontró una prevalencia de 100% para VHE-4 y de 26.2% y 11.4% para VHE-1 en madres y potrillos respectivamente (Gilkerson *et al*., 1999), en este mismo país en el año 2015 se obtuvo en caballos una prevalencia de 52.48% a VHE-1 y 83.69% para VHE-4 (Yildirim *et al*., 2015). La vacunación de las yeguas preñadas con una vacuna de virus muerto cada dos meses o con vacuna viva modificada cada tres meses contra el virus herpes equino, están indicadas para reducir el riesgo de aborto (Gilkerson *et al*., 1999).

La prueba de neutralización viral es la técnica estándar para el diagnóstico de la RNE, con una especificidad diagnóstica cercana al 100%, dependiendo del sistema indicador, pero con una menor sensibilidad 80% aproximadamente. Es así que una muestra podría ser considerada positiva a anticuerpos a partir de la dilución 1:2 (OIE, 2015). El alto porcentaje de caballos con títulos de anticuerpos entre 1:16 a 1:64 (Cuadro 4), podría indicar anticuerpos residuales producto de antiguas infecciones primarias, reactivaciones virales, o anticuerpos vacunales, pues la prueba de neutralización viral no discrimina anticuerpos de origen vacunal de los inducidos por virus de campo (Allen *et al*., 2000; Van Maanen *et al*., 2000).

En este estudio se ha determinado que existe un alto porcentaje (57%) de yeguas con problemas reproductivos (abortos y mortalidades embrionarias) del total muestreado, siendo un problema de importancia en la crianza de los caballos de paso en el Perú y que es similar a lo reportado en otras razas de caballos en otros países (Smith *et al*., 2003).

Los problemas reproductivos estudiados en este trabajo como abortos y muertes embrionarias, tienen diversas causas que incluyen a las hormonales, de manejo, nutricionales, las infecciosas de origen bacteriano y viral, y otras (Tibary *et al*., 2014). Por la alta prevalencia de anticuerpos contra VHE-1/4, se observa que el 82% (n=28) de las yeguas con problemas reproductivos eran seropositivas a VHE-1/4 y 6 yeguas eran seronegativas, indicando que existen otras causas asociadas a estos problemas reproductivos (Cuadro 3).

El análisis de los títulos de anticuerpos contra VHE-1/4 determinó que existen una amplia variedad de títulos indicando que existe un movimiento activo del virus en los tres criaderos en estudio. Los niveles de anticuerpos son bajos en infecciones virales iniciales, incrementándose durante el desarrollo de la infección y siendo mayores durante la convalecencia, debido a esto los resultados de títulos de los sueros positivos fueron analizados en el estudio en bajos (hasta 1:8), medianos (de 1:16 a 1:64) y altos (de 1:128 a más) (Cuadro 4), indicándose que en infecciones naturales y con problemas de abortos se pueden encontrar altos títulos de anticuerpos contra VHE de hasta mayores a 1: 256 (Rivera *et al*., 1997). Se encontró que el mayor porcentaje de animales seropositivos (43.5%) tenían un rango mediano de título de anticuerpos (1:16 a 1:64), a diferencia que los de bajos niveles y altos niveles que se encontraban en el 28% de la población, indicando que la población está siendo expuesta al virus durante todo el período de producción. Los animales sin problemas reproductivos de los tres criaderos, mostraron títulos mayores a 1:128 (Cuadro 4). Estos niveles de anticuerpos habrían sido producidos por infecciones subclínicas (Van Maanen *et al*., 2000). Una de las consecuencias de estas infecciones subclínicas es el aborto en las yeguas preñadas, donde llegan a presentar títulos mayores a 1:256 (Rivera *et al*., 1997); aunque se menciona que la importancia biológica de estos niveles elevados de anticuerpos respecto a la inmunoprotección es cuestionable (Burky *et al*., 1990).

Se ha determinado que conforme avanza el rango de edades, va disminuyendo el número de animales con títulos de anticuerpos positivos. En yeguas de 3-8 años, se tiene el 67% con anticuerpos contra el VHE-1/4, de 9-14 años un 24% y de 15-20 años un 9% (Cuadro 5). Esto pudo haber sido inducido por una infección natural o por vacunación

contra la RNE ya que la prueba de neutralización viral no discrimina a los anticuerpos inducidos por virus de campo o por vacuna (Van Oirschot *et al.,* 1996) a pesar que los registros de las yeguas en el presente estudio, indican que no fueron vacunados en los últimos dos años. Las tasas de parición en las yeguas disminuyen después de los 14-16 años de edad. Aunque en las yeguas viejas aumentan las pérdidas en gestación avanzada, parece ser que la causa más común de la disminución de la fertilidad en estas yeguas, son las pérdidas en la preñez temprana. El uso de la ecografía en la detección de la preñez en yeguas a los 10-14 días después de la ovulación conduce al estudio de la incidencia de pérdida embrionaria entre los días 14 y 40. Varios estudios demostraron que las tasas de preñez disminuyen y las tasas de pérdida embrionaria aumentan con la edad de las yeguas. El diagnóstico de preñez se puede realizar entre el día 9 y 12 postovulación, teniendo en cuenta que se deben hacer chequeos frecuentes para confirmar el crecimiento de la vesícula y evitar confusiones con quistes endometriales (Ball, 1988). En un estudio se comparó la tasa de preñez entre yeguas jóvenes (5-7 años) y yeguas mayores (>15 años) y se encontró una tasa de preñez baja al día 12 y mayor porcentaje de pérdida embrionaria (32 y 62% respectivamente) en yeguas mayores que en las jóvenes (100% y 11% respectivamente), lo cual puede evidenciar que la edad está asociada con aumento en la inflamación endometrial, bajas tasas de preñez y alto porcentaje de mortalidad embrionaria (Carnevale y Ginther, 1992). Esta alta tasa de mortalidad embrionaria se debe a una mayor susceptibilidad a la infección, mayor incidencia de endometritis crónica y disminución de la función ovárica (Morel *et al*., 2005). Las yeguas de mayor edad también presentan otro factor de riesgo para la presentación de mortalidad embrionaria, debido a la alta incidencia de ovulaciones múltiples. Morel *et al. (*2005), encontró una menor incidencia de ovulación múltiple en yeguas de 2-4 años (20,7%) comparado con yeguas de 17-19 años (35,6%) las cuales también presentaron mayor tasa de mortalidad embrionaria (53,1%).

En el Cuadro 6, se observó que 17 yeguas positivas y 5 negativas a anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/4 tuvieron problemas de abortos, siendo estas variables independientes estadísticamente e indicando que existen otras causas de aborto en las yeguas en estudio; sin embargo algunos abortos pueden ser debido a que el VHE-1/4 causan abortos en yeguas que no muestran ningún otro signo clínico de enfermedad, generalmente abortan entre los 6 y 11 meses de gestación, las mortalidades embrionarias ocurren hasta los 60 días. El aborto antes de los 5 meses de gestación es raro debido al

largo período de incubación (9-121 días) que requiere el virus (Crabb, 1996). Es ampliamente conocido que en todas las infecciones herpéticas una vez que el animal es infectado este debe ser considerado infectado de por vida porque el virus puede persistir en estado de latencia en el ganglio trigémino y sistema linforeticular y leucocitos (Borchers *et al*., 1999). De otro lado, bajo condiciones de estrés como mal manejo, transporte prolongado, gestación, etc., el virus puede reactivarse e infectar a otros caballos y por ende mantenerse en la población equina (Goodman *et al*., 2007). En Lima - Perú existe un reporte de un brote de abortos por VHE-1/VHE-4 en donde el 76% (13/17) de yeguas tuvieron abortos en un período de tiempo corto (Rivera *et al.,* 1997). En un brote (Colombia) de 61 animales infectados clínicamente se observó abortos en 6 de 7 yeguas preñadas y de igual forma ocho animales desarrollaron encefalomielitis (Walter *et al*., 2013), motivo de interés para continuar con posteriores estudios radica en que el VHE-1/4 se considera un nuevo virus emergente que puede afectar otras especies de animales (Wohlsein *et al*., 2011). En Chile la RNE se presentó con un gran brote de abortos que ocurrió entre 1969 y 1976, causando incalculables pérdidas económicas a la hípica nacional (Berríos, 1992). Durante esa época se analizaron 183 muestras de suero de yeguas adultas, encontrándose una alta seropositividad (99.45%) (Manzur y col., 1980).

En el análisis de mortalidades embrionarias versus presencia de anticuerpos contra VHE-1/4 (Cuadro 7), estas variables son independientes; en general no se indica en las literaturas a este virus como un causante de muerte embrionaria de importancia debido a que la mayoría de los abortos producidos por VHE-1/4 es en el último tercio de gestación (Mumford *et al*., 1884). Existen factores intrínsecos, extrínsecos y embrionarios que pueden ser la causa de esta muerte embrionaria (Kanitz *et al*., 2007). Los factores intrínsecos son de origen materno y pueden ser trastornos hormonales o inmunológicos, enfermedad endometrial, infecciones, edad y lactancia (Madill, 2002). Entre los factores extrínsecos se pueden incluir condiciones de estrés, calidad nutricional, clima, calidad y procesamiento del semen; y entre los factores embrionarios anomalías cromosómicas (Vanderwall y Newcombe, 2007).

En nuestro país hay poca información acerca del rol del HVE, sobre todo en los animales jóvenes, pero la presencia de anticuerpos en el 76.67% de las yeguas estudiadas significa que la infección por este virus tiene amplia difusión en la población equina del distrito de Cieneguilla.

VI. CONCLUSIONES

1.- Existe una alta prevalencia del Virus Herpes Equino-1/4 en los criaderos muestreados del distrito de Cieneguilla.

2.- En los diferentes criaderos se detectaron animales con diferentes títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VHE-1/4, determinando una respuesta a una infección activa debido al no uso de un Programa de Vacunación en los criaderos.

3.- La presencia de anticuerpos contra VHE-1/4 no está asociada a la presencia de problemas reproductivos en las yeguas de los tres criaderos. Estos están producidos por una etiología muy variada.

VII. RECOMENDACIONES

- Todos los criaderos o haras con crianza de equinos de diferentes razas, deben contar con un Programa de Vacunación contra la Rinoneumonitis Equina.

- Si ocurre algún aborto en un determinado criadero, se tiene que enviar de inmediato las muestras respectivas del feto abortado y/o placenta al Laboratorio para su diagnóstico.

- El uso de progestágenos (hormona progesterona: Progestyn A-E) puede ser de utilidad para prevenir el aborto en yeguas en las cuales la gestación corra riesgo debido a un exceso en la secreción de prostaglandinas.

VIII. LITERATURA CITADA

1.- Allen GP, Turtinen LW. 1982. Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of Equina herpesvirus-1. Journal of Virology 44(1): 249-255.

2.- Allen GP, Yeargan MR, Turtinen LW, Bryans JT, Mc Collum WH. 1983. Molecular epizootiologic studies of equina herpesvirus-1 by restriction endonuclease fingerprinting of viralDNA. Am J VetRes44(2): 263 - 271.

3.- Allen GP, Bryans JT. 1986. Molecular epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, Vol. 2, Pandey R, ed Karger Basel Switzerland & New York USA, 78–144.

4.- Allen GP, Yeargan M. 1987. Use of Ig 11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glycoproteins of equine herpesvirus 1. J Virol 61: 2454-2461.

5.- Allen GP, Kydd JK, Slater JD, Smith KC. 1999. Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. Equine Infectious diseases VIII, Proceedings. R&W Publications Dubai pp 129–146.

6.- Allen GP. 2002. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4. In: Equine Respiratory Diseases, ed. (Eds) LP. International Veterinary Information Service, Ithaca NY.

7.- Allen GP. 2004. Equine rhinopneumonitis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed. OIE, 5th Edition. París; Office International des Epizooties.

8.- Allen GP, Bolin DC, Bryant U, Carter CN, Giles RC, Harrison LR *et al*. 2008. Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. Equine Vet J 40(2): 105-110.

9.- Allen WR. 2000. The physiology of early pregnancy in the mare. Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP). 46: 338-354.

10.- Audonnet JC, Winslow J, Allen GP, Paoletti E. 1990. Equine herpesvirus type 1 unique short fragments encodes glycoproteins with homology to herpes simplex virus type 1 gD, gI and gE. J Gen 71: 2969 - 2978

11.- Bartha A. 1969. The virology of Equina herpesvirus-1 infection. In Proc of the 2nd IntConf on EqInf Dis:18-23.

12.- Baumann RP, Yalamanchili RR, O'Callaghan DJ. 1989. Functional mapping and DNA sequence of an Equina Herpesvirus-1 Ongin of replication Journal of Virology. Mar 1275 -1283.

13.- Ball BA. 1988. Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes and diagnostic considerations. Vet Clin North Am Equine Pract. 4(2):263-290.

14.- Ben Portat T, Demarchi J, Lomniczi B, Kaplan A. 1986. Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. Virology 154:325-334.

15.- Berríos P, Celedón M. 1992. Rinoneumonitis Equina en Chile (1969-1992). Avances en Ciencias Veterinarias 7:137-153.

16.- Borchers K, Slater J. 1993. A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. J Virol Methods 45: 331–336.

17.- Borchers K, Wolfinger U, Ludwig H. 1999. Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. J Gen Virol 80: 2165-2171.

18.- Burrows R. 1969. The general virology of the Herpesvirus group. En: Proc. of the 2nd Int Confon Eq Inf Dis 1 -12.

19.- Burrows R, Goodrige D. 1972. In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis virus strains. En Proc of the 3rd Int Conf on Eq Inf Dis 306-321.

20.- Bridges CG, Ledger N, Edington N. 1988. The characterization of equine herpes virus-1 infected cell polypeptides recognized by equine lymphocytes. Immunology 63: 193-198.

21.- Bryans JT. 1976. Immunization of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus1 vaccine. En: Proc of the 4th Int Conf on Eq Inf Dis: 8392.

22.- Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love C, Hinrichs K, Hartman D. 2011. Pregnancy Loss. En: Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love C, Hinrichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction. 3ra Ed Editorial Mosby Missouri. Pág: 332.

23.- Carballal G, Oubiña JR. 1991. Virología Médica: 6ª Ed El Ateneo. Buenos Aires.

24.- Coto CE, Torres RA. 1983. Naturaleza y estructura de los virus animales. Edigem S.A., Buenos Aires, Argentina.

25.- Cullinane AA, Rixon FJ, Davison AJ. 1988. Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. J Gen Virol 69 (Pt 7): 1575-1590.

26.- Crabb BS, Studdert MJ. 1990. Comparativa studies of proteins of equipe herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of natural hosts. Journal of General Virology 71: 2033 - 2041.

27.- Crabb BS, Studdert MJ. 1993. Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the c-termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. J Virol 67(10): 6332-6338.

28.- Crabb BS, Studdert MJ. 1995. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). Adv Virus Res 45: 153–190.

29.- Crabb BS, Macpherson CM, Reubel GH, Browning GF, Studdert MJ, Drummer HE. 1995a. A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. Arch Virol 140(2): 245–258.

30.- Crabb BS, Studdert MJ. 1996. Equine Rhinoneumonitis (equine Herpesvirus 4) and Equine Abortion (equine Herpesvirus 1). En: Studdert MJ (eds) Virus Infections of Equines.Holanda-ELSEVIER-356.

31.- Chowdhury SI, Kubin G, Ludwig H. 1986. Equipe herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in lippizaner stud: a contribution to the classification of equipe herpesvirus. Arch Virol 90: 273-288.

32.- De Diego AI. 1974. Guía para el estudio de las enfermedades infecciosas de los animales (Aves y mamíferos). Edición del autor Buenos Aires. Argentina, 587.

33.- Dimock WW; Edwards PR. 1933. Isthere a filtrable virus of abortion in mares. Kentucky Agr Exp Sta Bull Suppl 333: 297-301 (Citado por Kaji, T. 1963. Nat Inst Anim Hlth Quart 3:11-20).

34.- Doll ER, 1953. Intrauterine and intrafetal inoculations with equine abortion virus in pregnant mares. Cornell Vet 43:112.

35.- Doll ER, Wallace ME, Richard MG. 1954. Termal, hematological and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: its similarity to equine influenza. Cornell Vet 44:181-190 (Citado por Kaji, T. 1963. Nat Inst Anim Hlth Quart 3:11-20.

36.- Doll ER, Wallace ME. 1954a. Cultivation of equipe abortion and equipe influenza virales on the chorioallantoic membrana of chicken embryos. Cornell Vet 44:453-461.

37.- Dunowska M. 2014. A review of Equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Clinical presentation, diagnosis and treatment. New Zealand Veterinary Journal 62(4): 171-178.

38.- Dutta SK, Shirpley WD. 1982. Immunity and the level neutralization antibodies in foals and mares vaccinated with a modified Live-virus rhinopneumonitis vaccine. Am J Vet Res 36:138 -139.

39.- Edington N, Welch HM, Griffiths L.1994. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. Equine Vet J 26(2):140-142.

40.- Engels M, Nowotny N, Metzler AE, Wyler R, Burki F. 1986. Genomic and antigenic comparison of an Equipe herpesvirus (EHV-1) isolate from the lippizan abortion stom with EHV-1 referente strains. Microbiológica 9: 221 - 224.

41.- Fenner F, Bachman PA, Gibss EP, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. 1987. Herpesviridae. En Veterinary Virology 330 – 373 (Academic Press).

42.- Fitzpatrick DR, Studdert MJ. 1984. Immunologic relationships between equipe herpesvirus type 1 (Equipe abortion virus) and type 4 (equipe rhinopneumonitis virus). Am J Vet Res 45(10): 1947- 1952.

43.- Fritsche AK, Borchers K. 2011. Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. Vet Microbiol 147: 176-180.

44.- Guo P, Goebel S, Davis S, Perkus ME, Languet B, Desmettre P, Allen G, Paoletti E. 1989. Expression in recombinant vaccinia virus of the equipe herpesvirus 1 gene encoding glycoprotein gp13 and protection of immunized animals. Journal of Virology 63:4189-4198

45.-Guo P, Goebel S, Perkus ME, Taylor J, Norton E, Allen G, Languet B, DesmettreP, Paoletti E. 1990. Coexpression by vacciniavirus recombinants of equipe herpesvirus-1 glycoproteins gp13 and gp14. Journal of Virology64: 2399 - 2406.

46.- Gunn HM. 1992. A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. Irish Vet J 44: 37–40.

47.- Galindo D, Rivera H, Ramírez M, More J, Manchego A, Mantilla J, Valderrama W. 2014. Seroprevalencia del Virus de la Rinoneumonitis en Caballos (*Equus caballus*) del Perú. Rev Inv Vet Perú 2015 26(2): 342-350. [Interne], [18 de mayo 2016]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i2.11005.

48.-Gilkerson JR, Love DN, Drummer HE, Studdert MJ, Whalley JM. 1998. Seroprevalencce of equine herpesvirus 1 in Thoroughbred foals before and after weaning. Aust Vet J 76:677-682.

49.-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.

50.- Gibson I, Stater J. 1992. Pathogenesis of equine herpesvirus 1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infection. Arch Virol 123:351-366.

51.- Goodman LB, Loregian A, Perkins GA, Nugent J, Buckles EL, Mercorelli B, Kydd JH, Palú G, Smith KC, Osterrieder N, Davis-Poynter N. 2007. A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. PLoS Pathog 3(11): e160.

52.- Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. 2002. Hormonas, Factores de Crecimiento y Reproducción. En: Hafez ESE, Hafez B (eds). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ma Ed Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. pp: 33-55.

53.- Harless W, Pusterla N. 2006. Equine Herpesvirus 1 and 4 Respiratory Disease in the Horse. Clin Tech Equine Pract 5: 197-202.

54.- Hamzah H, 2008. Latent equine herpesvirus infections in horses. PhD Thesis, Murdoch University, Public University in Perth, Western Australia. [Internet], [12 de setiembre 2016]. Disponible en: http://scialert.net/fulltext/?doi=ajava.2015.669.689

55.- Huang T, Lehmann MJ, Said A, Ma G, Osterrieder N. 2014. Major histocompatibility complex class I downregulation induced by Equine Herpesvirus type 1 pUL56 is through dynamin-dependent endocytosis. J Virol 88: 12802-12815

56.- Johnson DC, Baines JD. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. Nat Rev Microbiol 9: 382-394. doi: 10.1038/nrmicro2559.

57.- Kanitz W, Schneider F, Hoppen H-O, Unger C, Nürnberg G, Becker F. 2007. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. Anim Reprod Sci 97: 55–62.

58.- Kydd JH, Smith KC, Hannant D, *et al.* 1994a. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. Equine Vet J 26:466–469.

59.- Kydd JH, Smith KC, Hannant D, *et al.* 1994b. Distribution of equid herpesvirus-1 in the respiratory tract-associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. Equine Vet J 26:470-473.

60.- Lawrence GL, Gilkerson J, Love DN, Sabine M, Whalley JM. 1994. 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 47: 59–72.

61.- Little SP, Jofie JT, Courtney RJ, Shaffer PA. 1981. A virion - associated glycoprotein essential for infectivity of Herpes simplex virus type 1. Virology 115:149 - 160.

62.- Madill S. 2002. Reproductive considerations: mare and stallion. Vet Clin Equine. 18: 591-619.

63.- Manzur P, Berríos P, Celedón M, Ibarra L. 1980. Rinoneumonitis equina, estudio de niveles de anticuerpos seroneutralizantes en equinos fina sangre de carrera. Arch Med. Vet 12: 245-248.

64.-Matsumura T, Sugiura T, Imagawa H, Fukunaga Y, Kamada M. 1992. Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. J Vet Med Sci 1992 Apr; 54(2): 207-211.

65.-Meyers PJ, Bonnett BN, McKee SL. 1991. Quantifying the occurrence of early embryonic mortality on three equine breeding farms. Can Vet J 32: 665-672.

66.- Meredith DM, Stocks JM, Whittaker GR, Halliburton IW, Snowden BW, Killington RA. 1989. Identification of the gB homologues of equipe herpesvirus types 1 y 4 as disulphide-linked heterodimers and their characterization using monoclonal antibodies. Joumal of General Virology70:1161-1172.

67.- Montali RJ, Allen GP, Bryans JT, Phillips LG, Busch M. 1985. Equipe herpesvirus type 1 abortion in an onager and suspected herpesvirus myelitis in a zebra. J A V M A 185 (11): 1248-1249.

68.- Morel MCGD, Newcombe JR, Swindlehursta JC. 2005. The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. Theriogenology. 63: 2482–2493.

69.- Mumford JA, Hannant D, Jessett DM, O'Neill T, Smith KC, Ostlund EN. 1994. Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with equid herpesvirus-1. En: Plowright W. and Nakajima H. Equine Infectious Diseases VII. Newmarket Suffolk, R & W Publications, 261–275.

70.- Mongelvars JF, Juan Pérez AA. 2004. Estadística no paramétrica. Prueba Chi cuadrado [Internet], [29 de mayo 2016]. Disponible en: https://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Chi_cuadrado.pdf

71.- Nicolson L, Onions DE. 1990. The nucleotide secuence of the Equipe Herpesvirus 4 gC gene homologue. Virology 179: 378-387.

72.- Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP, Davis-Poynter N. 2006. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Non neuropathogenic Disease Outbreaks. Journal of Virology 80: 4047-4060. [Internet], [19 de setiembre del 2016]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006

73.- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2004. Equine Infectious Anemia: In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ed OIE 5th Edition ed París. Office International des Epizooties. [Internet], [20 de setiembre 2016]. Disponible: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.05.09.%20Rinoneumon%C3%ADa%20equina.pdf.

74.- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2015. Manual Terrestre de la OIE. [Internet], [12 de julio 2016]. Disponible en:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.05.09_Rinoneumonía_equina.pdf

75.- Okazaki K, Kumagai T, Honda E. 1990. The Immnuno dominant Glycoprotein Complex of Equid Herpesvirus (EHV-1) and the Counterpart of EHV-4. Japan, J Vet Sci 52 (5): 1127-1130.

76.- O'keefe JS, Julian A, Moriarty K, Murray A & Wilks CR. 1994. A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV-4 in archival tissue samples. NZ Vet J42: 93–96.

77.- O'Neill T, Kydd JH, Allen GP, Wattranq E, Mumford JA, Hannant D. 1999. Determination of equid herpesvirus 1-specific, CD8+, cytotoxic T lymphocyteprecursor frequencies in ponies. Vet Immunol Immunopathol 70(1-2): 43–54

78.- Ostlund EN, Powell DG, Bryans JT. 1990. Equine herpesvirus-1: a review. Proc Am Assoc Equine Pract 36: 387-95.

79.- Ostlund E. 1993. The equine herpesviruses. Vet Clin N Am Equine Pract9: 283-294.

80.- Papp-Vidd G, Derbyshire JB. 1979. The virus neutralising activity of antibodies especific to the envelope and nucleocapsis of equipe herpesvirus type 1. Capad J Comp Méd 43:231 - 233.

81.- Patel JR, Edington N. 1983. The pathogenicity in mice of respiratory abortion and paresis isolates of equipe herpesvirus 1. Vet Microbiol: 301 - 305.

82.- Prickett ME. 1970. The pathology of disease caused by equine herpesvirus 1. In: Bryans JT, Gerber H, eds Equine infectious diseases II. Basel: S Karger 24–33.

83.- Ramírez GC, Chaparro JJ, Vera VJ, Villamil LC, Romero JR. 2001. Primer aislamiento de herpesvirus equino en Colombia. Rev Col Cienc Pec 14:71.

84.- Reed SM, Toribio RE. 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. Vet Clin Equine 20: 631-642.

85.- Riggio MP, Cullinane AA, Onions DE. 1989. Identification and nucleotide sequence of the glycoprotein gB of equipe herpesvirus 4. Journal of Virology 63:1123-1133.

86.- Roizman B, Batterson W. 1985. Herpesvirus and their replication. En Virology: 497-526 (by B. N. Fields *et al* Rayen press, New York).

87.- Ríos P. 2002. Rinoneumonitis equina en caballos del valle de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 38 p.

88.- Rivera H; Samamé H; Oballe R. 1975. Aislamiento y caracterización de un virus aislado de feto equino abortado. Rev Vet Zootec 126: 10-13. [Internet], [18 de mayo 2016]. Disponible: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v08_n1/abortov.htm

89.- Rivera H; Alvitres R; Manchego A; Sandoval N; Rosadio R. 1997. Aborto por Virus Herpes Equino. Ver Inv Pec IVITA (Perú) 8: 49-55.

90.- Sabine M, Feilen C, Herbert L, Jones RF, WallserLomas S, Love D, Wild J. 1983. Equipe herpesvirusabortion in Australia 1977-1982. EquipeVet Journal 15(4): 366-370.

91.- Saxegaard F. 1966. Isolation and identification of equine pneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. Nordisk Veterinaer medicin 18: 504-516 (Citado por Perl S, Haines D, Yakobson B, SaminaI, Shein M, Sheichat N, Avni G 1997. Paresis in horses associated with equine herpes virus 1 infection. Isr J Vet Med 52:132-136.

92.- Simpson T, Roizman B. 1981. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equipe herpesvirus 1 by restriction endonucleases. Science 214: 562-564

93.- Shimizu M, Satou K, Nishioka N. 1989. Monoclonal antibodies with neutralizing activity to equipe herpesvirus 1. Archives of Virology104: 169 - 174.

94.- Schultheiss PC, Collins JK, Carman J. 1993. Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. J Vet Diagn Invest 5: 12–15.

95.- Slater J. 2007. Controlling Equine Herpesvirus 1 infections. Woorjaarsdagen. European Veterinary Conference.

96.- Smith P, Celedón MO, Zurita L, Berríos P. 1986. Estudio serológico de los virus parainfluenza-3, influenza equina y herpes equino tipo 1 en equinos fina sangre de carrera del Hipódromo Chile. Arch Med Vet 18:29-35.

97.- Smith K. 2008. Causes of late fetal loss and abortion. Proc 47th British Equine Veterinary Association Congress. Liverpool, Reino Unido. Sept.

98.- Smith KL, Allen GP, Branscum AJ, Cook RF, Vickers ML, Timoney PJ, Balasuriya UBR. 2010. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. Vet Microbiol 141(1-2): 5-11.

99.- Smith KC, Blunden AS, Whitwell KE, Dunn KA, Wales AD. 2003. A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. Equine Vet J 35: 496-501.

100.- Studdert MJ. 1983. Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory foetal and perinatal foal isolates of equina herpesvirus type 1. Archs Virol 77: 249-258.

101.- Studdert MJ, Fitzpatrick DR, Horner GW, Wetzbury HA, Gleeson LJ. 1984. Molecular epidemiology and pathogenesis of soma Equipe herpesvirus type 1 (equipe abortion virus) and type 4 (equipe rhinopneumonitis virus) isolates. Aust Vet Journal 61 (11): 345-348.

102.- Tibary A, Pearson LK, Fite CL. 2014. Reproductive tract infections. In: Sellon DC, Long MT editors. Equine Infectious Diseases, 2nd edition. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2014. Pp. 84-105.

103.- Timoney, P. 2011. Equine Herpesviruses. En Mckinnon A, Squires E, Vaala W, Varner D (eds). Equine Reproduction. Editorial Wiley-blackwell. Segunda edición. Volumen 2. Ames, Iowa, Estados Unidos de América. Páginas: 2376 - 2390.

104.- Turtinen LW, Allen GP. 1982. Identification of the envelope surface giycoproteins of equipe herpesvirus type 1. J Gen Virol 63: 481-485

105.-Thomson GR, Mumford JA, Campbell J, Griffiths L, Clapham P. 1976. Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. Equine Vet J 8: 58-65.

106.- Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. Vet Microbiol 53(1-2): 43-54.

107.- Van Maanen C, Vreeswijk J, Moonen P, Brinkhof J De Boer-Luijtze E, Terpserpstra C. 2000. Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory, and neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in The Netherlands. Vet Q 22(2): 88-93.

108.- Van Maanen C, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Damen EA, Derksen AG. 2001. Neurological disease associated with EHV-1 infection in a riding school: clinical and virological characteristics. Equine Vet J 33(2): 191-196.

109.- Van Maanen C. 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: An update. Vet Q 24(2): 58-78.

110.- Vanderwall DK, Newcombe JR. 2007. The pregnant mare: diagnosis and management. Early embryonic loss. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. Current Therapy in Equine Reproduction. Missouri: Saunders Elsevier, p. 374.

111.- Varrasso A, Dynon K, Ficorilli N, Hartley CA, Studdert MJ, Drummer HE. 2001. Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. Aust Vet J 79: 563–569.

112.- Vasconcellos, L. 1997. Correlacao entre abortamento equino e os níveis de anticorpos fixadores de complemento contra herpesvirus equino tipo-1 eméguas criadas no estado de Sáo Paulo. Ars Veterinaria 13(1): 52-58.

113.- Walter J, Seeh C, Fey K, Bleul U, Osterrieder N. 2013. Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. Acta Vet Scand 55(1): 19.

114.- Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griggith L, Edington N. 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. J Gen Virol 73(Pt 2): 261–268.

115.- Whitwell KE, Gower SM, Smith KC. 1992. An immunoperosidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques. Equine Vet J 24(1): 10-12.

116.- Whittaker GR, Wheldon LA, Giles LE, Stocks JM, Halliburton IW, Killington RA, Meredith DM. 1990. Characterization of the high Mr. glycoprotein (Gp 300) of equipe herpesvirus type 1 as a novel glycoprotein with extensiva O-Linked carbohidrate. Journal of General Virology 71: 2407-2416.

117.- Whittaker GR, Riggio MP, Halliburton IW, Killengton RA, Allen GP, Meredith DM. 1991. Antigenicand Protein Sequence Homology between VP 13/14, a Herpes Simplex Virus Tipe 1 Tegument Protein, and gP 10, a Glycoprotein of Equipe Herpesvirus 1 and 4. Journal of Virology 65(5): 2320-2326.

118.- Wood JLN, Chanter N, Sinclair R, *et al*. 1995. The epidemiology of outbreaks of respiratory disease and poor performance in racing Thoroughbred horses. In: Plowright W, Nakajima H, eds. Equine infectious diseases VII. New market: R & W Publications 358-359.

119.- Wohlsein P, Lehmbecke A, Spitzbarth I, Algermissen D, Baumgärtner W, Bo M, *et al*. 2011. Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. Vet Microbiol 149: 456-460.

120.- Yasunaga S, Maeda K, Matsumura T, Kai K, Iwata H, *et al.*1998. Diagnosis and sero-epizootiology of equine Herpesvirus type 1 and type 4 infections in Japan using a type specific ELISA. J Vet Med Sci 60:1133-1137.

121.- Yildirim Y, Yilmaz V, Kirmizigul AH. 2015. Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey. Iranian Journal of Veterinary Research, 16(4): 341–344.

122.- Yeargan MR, Allen GP, Bryans JT. 1985. Rapid Subtyping of equipe herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies. J Clip Microbiol 21: 694-697.

IX. APÉNDICE

Apéndice 1. Total de animales de los tres criaderos a trabajar con su respectivo historial de salud reproductiva (hasta el 2015)

CRIADERO A (n=11)					
YEGUA	**TÍTULO DE ANTICUERPOS**	**Edad (años)**	**N° Crías**	**N° Abortos**	**N° Mortalidades Embrionarias**
A1	8	15	4		1
A2	128	14.8	5	2	2
A3	64	9.6	2	1	
A4	32	9	3		
A5	32	5.8	2	1	
A6	32	5.4	1		1
A7	256	5.4	2		
A8	128	4.8	1		
A9	128	4.5	1	1	
A10	64	4.4			1
A11	128	3.2			1
CRIADERO B (n=24)					
B1	<2	3.9	1		
B2	<2	11	4	1	2
B3	4	4	1		
B4	8	5		1	1
B5	16	5	2		
B6	<2	12	3	1	1
B7	<2	15	6		
B8	4	9	4		
B9	<2	13	3	2	3
B10	32	4	1		
B11	<2	14	5	1	
B12	<2	4	1		
B13	256	7	2	1	1
B14	16	19	6		3
B15	8	8	3		
B16	8	7	3		1
B17	16	4			2
B18	128	3.3			1
B19	128	16	5	2	2
B20	128	6	2		
B21	32	8	2	1	1
B22	<2	5	1		1
B23	8	9	3	1	
B24	8	10	4	1	1

CRIADERO C (n=25)					
YEGUA	TÍTULO DE ANTICUERPOS	Edad (años)	N° Crías	N° Abortos	N° Mortalidades Embrionarias
C1	4	12	5		1
C2	8	4		1	1
C3	<2	5	2		
C4	128	11	4		
C5	<2	9.4	4		
C6	16	16	5	2	2
C7	<2	3.8	1		
C8	16	4.4	1		
C9	16	12	5		1
C10	16	8	3	1	1
C11	32	5	2		
C12	256	3.6			1
C13	8	3.9	1		
C14	128	13	5		
C15	64	14.8	4	2	3
C16	8	8.8	2	1	1
C17	<2	4.9	1		
C18	8	3			
C19	32	6	2		
C20	64	3			
C21	32	5.6	2		
C22	256	7.5	2	1	
C23	<2	10	3	1	2
C24	32	8	2	1	1
C25	<2	12	4		

Apéndice 2. Número de animales con títulos de anticuerpos neutralizantes contra VHE-1/4, según su registro reproductivo (n=60). Lima, 2016

Criadero	Yeguas	Sin Título de Anticuerpos* (Negativos)	Con Título de Anticuerpos* contra VHE-1/4 (Positivos)								
		<2	2	4	8	16	32	64	128	≥256	Total
A (n=11)	CPR	0	0	0	1	0	2	2	3	0	**8**
	SPR	0	0	0	0	0	1	0	1	1	**3**
B (n=24)	CPR	5	0	0	4	2	1	0	2	1	**10**
	SPR	3	0	2	1	1	1	0	1	0	**6**
C (n=25)	CPR	1	0	1	2	3	1	1	0	2	**10**
	SPR	5	0	0	2	1	3	1	2	0	**9**
	Total	**14**	**0**	**3**	**10**	**7**	**9**	**4**	**9**	**4**	**46**

*Inversa de la dilución del suero

CPR: Con Problemas Reproductivos

SPR: Sin Problemas Reproductivos

Apéndice 3. Cálculo de la Distribución Chi-cuadrado (Prueba de Independencia)

(Mongelvars, 2004)

Cuadro 3. Número de yeguas que presentan anticuerpos positivos y negativos en tres criaderos con y sin problemas reproductivos (n=60). Lima, 2016

Yeguas / Anticuerpos	CPR	SPR	TOTAL
Positivos	28	18	**46**
Negativos	6	8	**14**
TOTAL	**34 (57%)**	**26(43%)**	**60 (100%)**

CPR: Con Problemas Reproductivos

SPR: Sin Problemas Reproductivos

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado: x^2_{calc}=1.42, p=0.2337

El análisis estadístico del Chi-cuadrado nos determinó un x^2_{calc} = 1.42; p = 0.2337, indicando que no hay asociación estadística significativa entre la presencia de problemas reproductivos y la presencia de anticuerpos contra VHE-1/4.

Cálculo de Chi-cuadrado

a). Datos observados (f_o)

28	18	**46**
6	8	**14**
34	**26**	**60**

b). Cálculo de las frecuencias esperadas o teóricas (f_e)

34(46)/60=26.07	26(46)/60=19.93
34(14)/60=7.93	26(14)/60=6.07

c). Formulación de Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0): El número de yeguas con/sin problemas reproductivos son independientes de su determinación de anticuerpos.

Hipótesis Alternativa (H_1): El número de yeguas con/sin problemas reproductivos no son independientes de su determinación de anticuerpos.

d). Cálculo del grado de libertad (v)

Para calcular el grado de libertad, hay que restar el número de filas a 1 y el número de columnas a 1, multiplicando esta resta: V = (2 - 1)(2 - 1) = 1

e). Cálculo de Chi Cuadrado (X^2)

$X^2_{calc} = \Sigma((f_o - f_e) / f_e)$, f_o: frecuencia del valor observado; f_e: frecuencia del valor esperado

$X^2_{calc} = 1.42$

Cuadro 4.1 Número de yeguas con títulos de anticuerpos bajos y altos contra VHE-1/VHE-4, según su registro reproductivo (n=60). Lima, 2016

Yeguas / Anticuerpos	Bajos	Altos	TOTAL
Positivos	5	13	**18**
Negativos	8	20	**28**
TOTAL	**13**	**20**	**46**

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado : x^2_{calc} =0.00, p=0.9535

Con corrección de Yates: x^2_{calc} =0.08, p=0.7817

El análisis estadístico del Chi-cuadrado entre la presencia de bajos/altos niveles de anticuerpos contra VHE-1/4 y los anticuerpos positivos/negativos, indican que no hay asociación estadísticamente significativa (p>0.05): X^2 = 0.08, p=0.7817 con corrección de Yates.

Cuadro 6. Número de yeguas con/sin problemas de abortos, según su determinación de anticuerpos (n=60). Lima, 2016.

Yeguas / Anticuerpos	Con Abortos	Sin Abortos	TOTAL
Positivos	17	29	**46**
Negativos	5	9	**14**
TOTAL	**22**	**38**	**60**

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado : x^2_{calc} =0.01, p=0.9327

Con corrección de Yates: x^2_{calc} =0.05, p=0.8163

Al evaluar la asociación estadística con la prueba Chi-cuadrado se determinó que el número de yeguas con/sin problemas de abortos son independientes de su determinación de anticuerpos (p>0.05).

Cálculo de Chi-cuadrado

a). Datos observados (f_o)

17	29	**46**
5	9	**14**
22	**38**	**60**

b). Cálculo de las frecuencias esperadas o teóricas (f_e)

22(46)/60=16.87	38(46)/60=29.13
22(14)/60=5.13	38(14)/60=8.87

c). Formulación de Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0): El número de yeguas con/sin problemas de abortos son independientes de su determinación de anticuerpos.

Hipótesis Alternativa (H_1): El número de yeguas con/sin problemas de abortos no son independientes de su determinación de anticuerpos.

d). Cálculo del grado de libertad (v)

Para calcular el grado de libertad, hay que restar el número de filas a 1 y el número de columnas a 1, multiplicando esta resta: V = (2 - 1)(2 - 1) = 1

e). Cálculo de Chi Cuadrado (X^2)

$X^2_{calc} = \Sigma((f_o - f_e) / f_e)$, f_o: frecuencia del valor observado; f_e: frecuencia del valor esperado

$X^2_{calc} = 0.01$

Cuadro 7. Número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias, según su determinación de anticuerpos (n=60). Lima, 2016.

Yeguas / Anticuerpos	Con Mortalidades Embrionarias	Sin Mortalidades Embrionarias	TOTAL
Positivos	23	23	**46**
Negativos	5	9	**14**
TOTAL	**28**	**32**	**60**

Análisis estadístico con la Prueba Chi-cuadrado

Chi-cuadrado : x^2_{calc} =0.88, p=0.3482

Con corrección de Yates: x^2_{calc} =0.40, p=0.5272

Al evaluar la asociación estadística con la prueba Chi-cuadrado se determinó que el número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias son independientes de su determinación de anticuerpos (p>0.05).

Cálculo de Chi-Cuadrado

a). Datos observados (f_o)

23	23	**46**
5	9	**14**
28	**32**	**60**

b). Cálculo de las frecuencias esperadas o teóricas (f_e)

28(46)/60=21.47	32(46)/60=24.53
28(14)/60=6.53	32(14)/60=7.47

c). Formulación de Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0): El número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias son independientes de su determinación de anticuerpos.

Hipótesis Alternativa (H_1): El número de yeguas con/sin problemas de mortalidades embrionarias no son independientes de su determinación de anticuerpos.

d). Cálculo del grado de libertad (v)

Para calcular el grado de libertad, hay que restar el número de filas a 1 y el número de columnas a 1, multiplicando esta resta: V = (2 - 1)(2 - 1) = 1

e). Cálculo de Chi Cuadrado (X^2)

$X^2_{calc} = \Sigma((f_o - f_e) / f_e)$, f_o: frecuencia del valor observado; f_e: frecuencia del valor esperado

$X^2_{calc} = 0.88$