

RINONEUMONÍA EQUINA (INFECCIÓN POR EL HERPESVIRUS 1 Y 4 DE LOS ÉQUIDOS)

RESUMEN

La rinoneumonía equina (RE) es un término colectivo para designar a cualquiera de las varias enfermedades clínicas infecciosas que pueden tener lugar como consecuencia de la infección por uno de los dos herpesvirus que están estrechamente relacionados, los herpesvirus equinos 1 y 4 (HVE-1 y HVE-4). La infección por el HVE-1 forma parte de la lista de enfermedades de la OIE. Tanto el HVE-1 como el HVE-4 son endémicos en muchas poblaciones de équidos domésticos de todo el mundo.

La infección primaria por el HVE-1 o por el HVE-4 se caracteriza por producir una enfermedad primaria de las vías respiratorias altas, de gravedad variable, que depende de la edad y el estado inmunitario del animal infectado. El HVE-1 también causa complicaciones más graves, como abortos, nacidos muertos en el periodo perinatal, o enfermedades neurológicas paralíticas (mieloencefalopatía por herpesvirus equino). El HVE-4 se ha asociado a casos esporádicos de abortos, pero a los grandes brotes que tienen lugar con el HVE-1. Como ocurre con otros herpesvirus, tanto el HVE-1 como el HVE-4 inducen infecciones latentes crónicas y pueden reactivarse en caso de estrés o de gestación. Es probable que la mayoría de caballos resulten re-infectados varias veces a lo largo de su vida, a menudo de forma leve o subclínica. Por lo tanto, la detección de ADN vírico o de anticuerpos contra el HVE deberá interpretarse con cautela.

Identificación del agente: El método estándar para la identificación de HVE-1 y de HVE-4 a partir de material clínico adecuado o de las necropsias es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de un aislamiento en el laboratorio del virus en cultivo celular. Mediante una PCR específica de tipo puede lograrse la identificación positiva de cepas víricas como HVE-1 o HVE-4. Los virus se pueden aislar fácilmente en cultivos celulares equinos de extractos de hisopos de la nasofaringe de los caballos, tomadas durante el estado febril de la infección del tracto respiratorio, de la placenta y del hígado, el pulmón, el bazo, o el timo de los fetos abortados y de los potros muertos prematuramente, y de la fracción de leucocitos de la sangre de los animales con infección aguda por HVE-1. A diferencia del HVE-4, el HVE-1 también crecerá en distintos tipos celulares no equinos, como la línea celular RK-13, y esta propiedad puede aprovecharse para distinguir entre ambos virus.

Se puede establecer un diagnóstico preliminar rápido del aborto inducido por el HVE-1 o (de manera infrecuente) el HVE-4 mediante la detección del antígeno vírico por inmunofluorescencia directa en cortes de tejidos congelados de la placenta o los fetos abortados utilizando un antisuero policlonal conjugado.

La observación postmórtem de las lesiones histopatológicas del HVE-1 en la placenta y los tejidos de fetos abortados, en casos de muerte perinatal de potros o en el sistema nervioso central de los animales con afecciones neurológicas complementa el diagnóstico de laboratorio.

Pruebas serológicas: La mayoría de caballos posee algún nivel de anticuerpos contra HVE-1/4, por lo tanto, la detección de la presencia de anticuerpos específicos en el suero procedente de una muestra única de sangre no confirma un resultado positivo reciente de la infección. Deben analizarse muestras pareadas de sueros, las primeras de la fase aguda, y las segundas de la convaleciente, procedentes de animales sospechosos de estar infectados por el HVE-1 o el HVE-4, a partir de las cuales se diagnosticará la enfermedad si se comprueba que los títulos de anticuerpos específicos contra el virus aumentan cuatro o más veces entre las primeras y las segundas muestras; estos análisis puede realizarse mediante la prueba de la neutralización del

virus (VN) o la de la fijación del complemento (CF). Ninguna de estas pruebas es específica de tipo, pero ambas han demostrado ser útiles para el diagnóstico, sobre todo porque la respuesta de anticuerpos frente a una infección reciente es relativamente corta. También se ha utilizado, aunque poco, un enzimoimmunoanálisis específico de tipo (Crabb et al., 1995; Hartley et al., 2005).

Requisitos para las vacunas: Existen vacunas víricas vivas atenuadas y vacunas víricas inactivadas, que pueden utilizarse para favorecer el control de los HVE-1/4. La vacunación resulta útil para disminuir la gravedad de la infección respiratoria en los caballos jóvenes y la incidencia de abortos en las yeguas, aunque en las vacunas actuales no se observa la protección contra la enfermedad neurológica. La vacunación no debe considerarse una práctica sustitutiva de un buen manejo durante la producción, que se ha demostrado que reduce el riesgo de infección. Se recomienda una revacunación a intervalos frecuentes independientemente del tipo de vacuna utilizada, ya que la duración de la inmunidad inducida por las vacunas actualmente disponibles es relativamente corta.

Los estándares para la producción y licencia de las vacunas atenuadas e inactivadas que contienen el HVE se establecen por las correspondientes agencias veterinarias reguladoras en los países de producción y uso de las vacunas. No existe un único sistema de estándares para las vacunas contra el HVE reconocido internacionalmente. Sin embargo, en cada caso, la producción de la vacuna se basa en un sistema consistente en un minucioso esquema de producción en la que se emplea una línea celular bien caracterizada y un lote de inóculo primario de virus vacunal que ha sido validado en cuanto a la identidad vírica, la inocuidad, la pureza vírica, la inmunogenicidad y la ausencia de agentes microbianos indeseables.

A. INTRODUCCIÓN

La rinoneumonía equina (RE) es un término que históricamente ha descrito una constelación de distintas enfermedades en los caballos, que pueden incluir enfermedades respiratorias, aborto, neumonitis neonatal de los potros, o mieloencefalopatía (Allen & Bryans, 1986; Allen *et al.*, 1999; Bryans & Allen, 1988; Crabb & Studdert, 1995). Desde hace más de 60 años se considera que la enfermedad representa un reto para la industria equina internacional, y está causada por cualquiera de dos miembros de la familia *Herpesviridae*, los herpesvirus 1 y 4 (HVE-1 y HVE-4). El HVE-1 y el HVE-4 son alfa herpesvirus equinos muy próximos con una identidad en la secuencia nucleotídica de genes homólogos individuales de entre el 55% y el 84%, y una identidad en la secuencia de aminoácidos de entre el 55% y el 96% (Telford *et al.*, 1992; 1998). En todos los países en los que se mantienen grandes poblaciones de caballos como parte de la tradición cultural o de la economía agrícola, los dos herpesvirus son enzooticos. No se ha descrito evidencia alguna de que los dos herpesvirus de la RE impliquen riesgo alguno para la salud humana en las personas que trabajan con tales agentes. La infección por el HVE-1 forma parte de la lista de enfermedades de la OIE.

La transmisión vírica entre animales tiene lugar mediante inhalación de aerosoles de las secreciones respiratorias que contienen el virus. La morbilidad tiende a ser máxima en los caballos de corta edad que cohabitan en un mismo espacio. Los tejidos abortados y los líquidos placentarios de las yeguas infectadas pueden contener cantidades extremadamente grandes de virus vivo y suponen la principal fuente de infección. El uso extensivo de las vacunas no ha eliminado las infecciones por HVE, y el impacto económico anual a nivel mundial derivado de estos agentes patógenos equinos es inmenso.

En caballos menores de 3 años, la RE clínica adopta forma de una enfermedad respiratoria aguda y febril, que se extiende rápidamente a todo el grupo de animales. Los virus infectan y se multiplican en las células epiteliales de la mucosa respiratoria. Los signos de la infección aparecen entre 2 y 8 días después de la exposición al virus y se caracterizan por fiebre, inapetencia, depresión y rinorrea. La gravedad de la enfermedad respiratoria varía con la edad del caballo y el grado de la inmunidad resultante de la vacunación previa o de la exposición natural. La fiebre y las complicaciones son más probables en el caso de HVE-1 y de HVE-4. Son corrientes las infecciones subclínicas por el HVE-1/4, incluso en los animales jóvenes. Aunque la mortalidad es rara en la RE sin complicaciones y lo normal es la recuperación completa después de 1–2 semanas, la infección respiratoria es una causa muy frecuente e importante de la interrupción de las actividades de los caballos mantenidos para el adiestramiento, las carreras u otros acontecimientos ecuestres. La inmunidad protectora que provoca la infección es de corta duración, y los animales convalecientes son susceptibles a la reinfección por el HVE-1/4 después de varios meses. Aunque las reinfecciones por los dos herpesvirus causan enfermedades respiratorias menos graves o clínicamente poco evidentes, seguirá existiendo el riesgo de un posterior aborto o enfermedad neurológica. Como ocurre con otros herpesvirus, los HVE-1/4 causan infecciones latentes crónicas y los caballos infectados de este modo suponen un posible riesgo de infección para otros caballos. El virus puede reactivarse como consecuencia del estrés o de la gestación. Los mayores riesgos clínicos que presenta la RE en los

caballos de cría, de carreras o de recreo, son las secuelas potenciales del aborto y de trastornos neuronales después de la infección respiratoria por el HEV-1.

La enfermedad neurológica, también denominada mieloencefalopatía por herpesvirus equino, sigue siendo infrecuente pero es una complicación grave de la infección por el HVE-1. Una mutación puntual en el gen de la ADN-polimerasa (ORF30) se ha asociado a un riesgo alto de enfermedad neurológica, aunque existen cepas sin este cambio que también pueden causar parálisis (Nugent *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2007). Se han empleado técnicas de tipificación de las cepas para identificar virus que portan el marcador neuropático, lo cual puede resultar de ayuda para conocer los posibles aumentos de riesgo de complicaciones neurológicas. La tipificación de la cepa puede resultar de utilidad en cuanto a la aplicación de las medidas de seguridad durante el control de los casos de brotes de mieloencefalopatía por herpesvirus equino.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tanto el HVE-1 como el HVE-4 pueden ser virus altamente contagiosos y el primer puede causar brotes explosivos de abortos y/o enfermedad neurológica. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico rápidos son útiles para la gestión de la enfermedad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado mucho en laboratorios de diagnóstico y es rápida y sensible. Se han desarrollado PCR en tiempo real que permiten una determinación simultánea de HVE-1 y de HVE-4 y una cuantificación de la carga vírica. El aislamiento del virus también puede resultar útil, sobre todo para la detección de viremia. Esto es también aplicable en el caso de los abortos y las muertes de potros neonatos asociados a HVE-1, cuando el alto nivel de virus en los tejidos suele producir un efecto citopático en 1-3 días. En cuanto a la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia, pueden resultar extremadamente útiles para el diagnóstico rápido del aborto inducido por HVE a partir de tejido fresco o fijado, y son relativamente sencillas. También se han descrito otras técnicas basadas en el enzoinmunoanálisis (ELISA) o en sondas de hibridación de ácido nucleico, pero su uso suele restringirse a laboratorios especializados y no se incluyen en este capítulo.

Tabla 1. Pruebas disponibles para el diagnóstico de la rinoneumonía equina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	+++	–	+++	–	–
PCR	–	+++	–	+++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
VN	+	+	+	+++	+++	+++
ELISA	+	+	+	++	+++	+
CF	–	–	–	+++	–	–

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; CF = fijación del complemento;

VN = neutralización del virus; ELISA = enzoinmunoanálisis.

1 Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica.

1. Identificación del agente etiológico

1.1. Obtención y preparación de las muestras

Hisopos nasales/nasofaríngeos: el extracto de hisopo se puede utilizar para la extracción de ADN y la posterior detección de virus mediante PCR empleando una de las muchas técnicas publicadas o un kit comercial (véase abajo). El aislamiento del virus también se puede intentar a partir de extractos de hisopo. Para aumentar la probabilidad de aislar el virus vivo, es mejor obtener los hisopos de caballos que se encuentren en la fase más inicial, en el estadio febril de la enfermedad respiratoria, y que aplicándolos a las narinas muestreando la zona con un hisopo del tamaño y la longitud adecuada para caballos. Después de la toma del hisopo, el algodón absorbente se separa del alambre y se transporta inmediatamente al laboratorio de virología en 3 ml de medio de transporte de virus muy frío (pero no helado) (MEM [medio mínimo esencial] libre de suero y con antibióticos). La infectividad de los virus se puede prolongar mediante la adición de seroalbúmina bovina, de suero fetal bovino o de gelatina al 0,1% (p/v).

Muestras de tejido: puede extraerse ADN total empleando ciertos kits comerciales, para utilizarlo después en una PCR que detectará el ADN vírico (se describe abajo, en el Apartado B.1.2.i). Cuando se sospeche que un aborto se debe a HVE-1, el aislamiento del virus a partir de placenta o feto tiene mayor eficacia diagnóstica cuando se lleva a cabo en muestras tomadas asépticamente de la placenta, el hígado, los pulmones, el timo y el bazo. El virus se puede aislar postmórtem en los casos de la enfermedad neurológica por el HVE-1 mediante el cultivo de muestras de cerebro y médula espinal, pero tales intentos de aislamiento suelen ser infructuosos. Sin embargo, pueden ser útiles para un examen mediante PCR y examen histopatológico. Las muestras de tejido deberán transportarse al laboratorio y mantenerse a 4°C hasta que se inoculen en cultivo tisular. Las muestras que no se puedan procesar en unas horas, deberán guardarse a –70°C.

Sangre: para el aislamiento del virus a partir de leucocitos, se extrae una muestra de sangre de 20 ml mediante una técnica aséptica, utilizando como anticoagulante citrato, heparina o EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]. El EDTA es el anticoagulante de elección para la PCR. Las muestras deben transportarse sin demora al laboratorio sobre hielo, pero no congeladas.

1.2. Detección del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se ha convertido en el principal método de diagnóstico para la detección de los HVE-1 y HVE-4 en muestras clínicas, en tejido de archivo incluido en parafina o en cultivos celulares inoculados Borchers & Slater, 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 HVE-1 y el HVE-4. La correlación entre la PCR y el aislamiento del virus es alta en el diagnóstico del HVE-1 y del HVE-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.

Para el diagnóstico de la infección activa por HVE, 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 añojos. Es especialmente útil en brotes epizooticos explosivos de abortos o de enfermedad neurológica o respiratoria 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 células mononucleares de sangre periférica (células mononucleares de sangre periférica -CMSP) es importante para el diagnóstico en caballos con signos neurológicos.

Se han publicado gran variedad de pruebas PCR. Para distinguir entre el HVE-1 y el HVE-4, puede utilizarse una PCR anidada. Borchers & Slater (1993) han descrito un protocolo sensible adecuado para muestras clínicas o tisulares (secreciones nasales, leucocitos, encéfalo y médula espinal, tejidos fetales, etc.). No obstante, los métodos de la PCR anidada tienen un riesgo alto de contaminación cruzada en el laboratorio, de tal forma que para detectar el HVE-1 y el HVE-4 resultan preferibles las PCR de un solo paso, rápidas y sensibles (por ejemplo, Lawrence *et al.*, 1994). Los Laboratorios de Referencia de la OIE emplean PCR en tiempo real cuantitativas como las que tienen por objetivo secuencias heterólogas de genes de la glucoproteína principal para distinguir entre el HVE-1 y el 4. Diallo *et al.* (2007) describió una PCR en tiempo real múltiple que tiene por objetivo el gen de la glucoproteína B del HVE-1 y el HVE-4. Se han desarrollado protocolos que permiten diferenciar entre cepas del HVE-1 que contienen el marcador neuropático ORF30, empleando la digestión con enzimas de restricción de productos de la PCR (Fritsche & Borchers, 2011) o una PCR en tiempo real cuantitativa (Allen *et al.*, 2007, Smith *et al.*, 2012). También se han elaborado métodos para tipificar cepas con fines epidemiológicos, en base al gen ORF68 (Nugent *et al.*, 2006). Los Laboratorios de

Referencia de la OIE utilizan métodos internos para tipificar las cepas, pero estos protocolos todavía no se han validado entre distintos laboratorios a nivel internacional.

La PCR en tiempo real (o cuantitativa) se ha convertido en el método de elección para muchas pruebas de diagnóstico y permite una detección rápida y sensible del ADN vírico. Se han descrito RT-PCR para el HVE-1 y el HVE-4. La qPCR descrita abajo se ha validado respecto a la ISO 17025 en el Laboratorio de Referencia de la OIE del Reino Unido y está diseñada para ser utilizada en un formato de 96 pocillos. Esta técnica se puede combinar fácilmente con métodos automáticos de extracción de ácido nucleico. Esta prueba múltiple amplifica secuencias de ADN vírico específicas del HVE-1 o del HVE-4 en muestras de tejido, hisopos nasales o lavados del tracto respiratorio de los caballos. No se ha validado para su uso con sangre completa ni capa leucocitaria. La región diana a amplificar en cada virus está en una zona específica de tipo conservada correspondiente al gen de la glucoproteína B (gB) en el caso del HVE-1, y en el ORF17 (que codifica UL43) en el caso del HVE-4. La discriminación entre el HVE-1 y el HVE-4 se consigue mediante la incorporación de sondas duales marcadas específicas de tipo. En este método se utilizan cebadores y sondas diseñados a nivel interno, basados en métodos publicados por Hussey *et al.* (2006) y Lawrence *et al.* (1994). Para establecer tal qPCR con fines de diagnóstico, se precisa una validación respecto a muestras que no se sepa si son positivas o negativas. Deberán determinarse la sensibilidad y la especificidad respecto a cada objetivo. En los Laboratorios de Referencia de la OIE puede solicitarse ayuda para el desarrollo de las pruebas e información acerca de las muestras que deben utilizarse.

Pueden emplearse otros protocolos validados siempre que se optimicen los tiempos y las temperaturas del programa del termociclador, como por ejemplo los métodos de Diallo *et al.* (2006; 2007) o de Allen (2007).

1.2.1. Protocolo analítico

i) Muestras adecuadas

Pueden utilizarse tejidos equinos postmórtem de animales neonatos o adultos o tejido fetal equino (que contengan pulmón, hígado, bazo o timo). También pueden analizarse tejidos de glándula suprarrenal o de placenta. En el caso de las muestras de tracto respiratorio, resultan adecuados los hisopos de nasofaringe o de la parte profunda de la nariz (que se enviarán en un medio de transporte de virus adecuado), el lavado traqueal (LT) o el lavado bronquio-alveolar (LBA). El ADN debe extraerse utilizando un kit adecuado o un sistema robótico.

ii) Cebadores y sondas

EHV 1 Directo: GGG-GTT-CTT-AAT-TGC-ATT-CAG-ACC

EHV 1 Inverso: GTA-GGT-GCG-GTT-AGA-TCT-CAC-AAG

EHV 4 Directo: TAG-CAA-ACA-CCC-ACT-AAT-AAT-AGC-AAG

EHV 4 Inverso: GCT-CAA-ATC-TCT-TTA-TTT-TAT-GTC-ATA-TGC

EHV1gB/sonda: {FAM}TCT-CCA-ACG-AAC-TCG-CCA-GGC-TGT-ACC{BHQ1}

EHV4 ORF17/sonda: {JOE}CGG-AAC-AGG-AAC-TCA-CTT-CAG-AGC-CAG-C{BHQ1}

iii) Patrones para la RT-PCR en tiempo real

Debe utilizarse una curva de patrones de ADN para cuantificar los niveles de ADN vírico, que incluya al menos cuatro patrones de ADN diana de HVE-1 y HVE-4 a concentraciones conocidas. Todos los patrones deben diluirse en ácido poliiinosínico-policidílico (PolyI/C) a 1ng/ml para estabilizar el ADN en la solución. Estos patrones se guardarán a -20°C y no se someterán a múltiples ciclos de congelación-descongelación. Pueden conseguirse los plásmidos correspondientes previa petición al Laboratorio de Referencia de la OIE del Reino Unido.

iv) Procedimiento analítico

Debido a la extrema sensibilidad de las pruebas basadas en la PCR, resulta fundamental eliminar todas las posibles fuentes de contaminación del ácido nucleico. Todos los equipos y reactivos deben ser de grado biología molecular/PCR y se debe garantizar que estén libres de ácidos nucleicos contaminantes, nucleasas u otras enzimas que puedan interferir.

Deben prepararse reacciones con kits de mezcla primaria para PCR. Las reacciones y la obtención de datos se llevan a cabo en un termociclador en tiempo real y en unas condiciones que se optimizan para cada máquina. La cantidad de ADN vírico de cada muestra puede cuantificarse respecto a patrones de ADN conocidos, pero en cada ejecución deberá incluirse también un control positivo y uno negativo adecuados: agua como control sin molde, tampón que se haya sometido al método de extracción de la muestra (control de extracción negativo) y HVE-1 y HVE-4 como controles de extracción positivos. Para asegurar la calidad continua de la prueba, debe registrarse en cada ejecución el ciclo umbral (Ct) de un patrón conocido de bajo número de copias (por ejemplo, 100 copias), que se controlará periódicamente.

1.3. Aislamiento del virus

Para un aislamiento primario eficaz del HVE-1/4 de los caballos con enfermedad respiratoria, se deben utilizar cultivos celulares de origen equino. Tanto el HVE-1 como el HVE-4 se pueden aislar de muestras nasofaríngeas utilizando células primarias de riñón fetal equino o fibroblastos equinos derivados de tejido dérmico (E-Derm) o pulmonar. Como se indicará después, el HVE-1 también puede aislarse en otros tipos celulares. El hisopo nasofaríngeo y sus 3 ml de medio para el transporte se pasan al cuerpo de una jeringa estéril de 10 ml. Utilizando el émbolo de la jeringa, el líquido se pasa del hisopo a un tubo estéril. Una parte del líquido se puede filtrar luego a través de una unidad de filtración compuesta por una jeringa estéril con un filtro de 0,45 µm y recogerse en un segundo tubo estéril si se espera una intensa contaminación bacteriana, pero ello también puede disminuir el título del virus. En recipientes para cultivos de tejidos, se inoculan monocapas celulares de preparación reciente con 0,5 ml del extracto de hisopo nasofaríngeo filtrado, así como del no filtrado. También pueden utilizarse monocapas celulares en placas con varios pocillos incubadas en un entorno de 5% CO₂. Mediante incubación a 37°C, se permite que el virus se una a la monocapa inoculada. Se deben incubar en paralelo monocapas de células control no inoculadas.

Al final del período de unión, se retira el exceso de inóculo y se lavan las monocapas dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar el anticuerpo neutralizante que pueda estar presente en las secreciones nasofaríngeas. Los recipientes se incuban a 37°C después de añadir medio de mantenimiento suplementado (MEM que contenga un 2% de suero fetal bovino [FCS] y el doble de la concentración estándar de antibióticos/antifúngicos [penicilina, estreptomina, gentamicina y anfotericina B]). El uso de muestras como control positivo del virus para validar el procedimiento del aislamiento corre el riesgo de provocar una eventual contaminación de las muestras a diagnosticar. Se puede reducir el riesgo tomando precauciones rutinarias y utilizando buenas técnicas de laboratorio, incluyendo el uso de cabinas de bioseguridad, inoculando los controles positivos después de las muestras a diagnosticar, descontaminando las superficies de la cabina durante la adsorción del inóculo y utilizando un control positivo de título relativamente bajo. Los recipientes inoculados deben examinarse a diario al microscopio para observar la aparición del efecto citopático (ECP) característico de los herpesvirus (redondeamiento focalizado, aumento de la refractabilidad, y separación de las células). Los cultivos que después de 1 semana no muestren evidencia de ECP deben pasarse a nuevas monocapas celulares recién preparadas, utilizando como inóculo pequeñas alícuotas tanto del medio como de las células. Los pases posteriores no suelen ser productivos.

Muestras de tejido: Para el aislamiento del HEV-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 HVE-1 y el HVE-4 (que puede causar casos esporádicos de abortos). Para el aislamiento del virus se utilizan homogenados tisulares de hígado, pulmón, timo y bazo (de fetos abortados) o de tejido del SNC (en los casos de enfermedad neurológica) combinados a una concentración de en torno al 10% (p/v). Estos se preparan cortando primero, con unas tijeras de disección, pequeños fragmentos del tejido en cubos de 1 mm en una placa Petri estéril, y macerando luego los trozos de tejido en un medio de cultivo sin suero y con antibióticos por medio de homogeneizador o un triturador mecánico de tejidos. Después de centrifugar a 1.200 **g** durante 10 minutos, se extrae el sobrenadante y se inoculan por duplicado 0,5 ml en monocapas celulares contenidas en frascos de cultivo tisular. Después de incubar las células inoculadas a 37°C durante 1,5–2 horas, se eliminan los inóculos y se lavan las monocapas dos veces con PBS o medio de mantenimiento. Después de añadir 5 ml de medio de mantenimiento suplementado, los recipientes se incuban a 37°C durante 1 semana o hasta que se observe el ECP.

Muestras de sangre: Tanto el HVE-1 como el HVE-4, aunque este último con menor frecuencia, pueden aislarse a partir del CMSP (células mononucleares de sangre periférica). Se pueden preparar capas de células leucocitarias de sangre no coagulada mediante centrifugación a 600 **g** durante 15 minutos, y se toma la capa de células leucocitarias tras descartar cuidadosamente el plasma. Después se deposita la capa leucocitaria sobre una solución de separación de CMSP (Ficoll: densidad

de 1,077 g/ml, a la venta) y se centrifuga a 400 **g** durante 20 minutos. La interfaz de CMSP (sin la mayor parte de los granulocitos) se lava dos veces en PBS (300 **g** durante 10 minutos) y se resuspende en 1 ml de MEM que contenga un 2% de suero fetal bovino. Como método alternativo, más rápido, pueden obtenerse CMSP centrifugando directamente el plasma. Se añade una alícuota de la suspensión celular lavada a cada una de las monocapas duplicadas de fibroblastos equinos, células equinas fetales o monocapas de células RK-3 en recipientes de 25 cm² con 8–10 ml de medio fresco de mantenimiento añadido. Los recipientes se incuban a 37°C durante 1 semana, eliminando o no el inóculo. Si antes de la incubación no se eliminan las CMSP, puede ser difícil detectar el ECP en presencia del inóculo masivo de leucocitos, cada recipiente con células se congela y descongela después de 7 días de incubación y se centrifugan los contenidos a 300 **g** durante 10 minutos. Finalmente, se transfieren 0,5 ml del extracto acelular del sobrenadante del medio de cultivo de cada recipiente a monocapas celulares recientes que sean subconfluentes. Estas se incuban y observan para comprobar si presentan ECP durante al menos 5–6 días. También en este caso, las muestras que no presenten signos de ECP vírico tras 1 semana de incubación deben pasarse una segunda vez antes de ser desechadas como negativas

La identidad del virus se puede confirmar mediante PCR o mediante inmunofluorescencia con antisueros específicos. Las cepas víricas de cultivos positivos deben enviarse a un Laboratorio de Referencia de la OIE para mantener un archivo geográficamente diverso. En algunos laboratorios se puede llevar a cabo una mayor caracterización de la cepa con fines de vigilancia o de detección del marcador neurológico.

1.4. Detección del virus mediante inmunofluorescencia directa

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

Con este fin, en EE.UU. se suministra a los laboratorios de diagnóstico veterinario un antisuero policlonal potente contra el HVE-1, preparado en cerdo y conjugado con ITCF, a través de los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA). El antisuero presenta reacciones cruzadas con el HVE-4 y, por tanto, no es útil para la serotipificación; aun así, el virus puede tipificarse mediante PCR a partir de cualquier muestra que sea positiva para el virus.

Se congelan muestras provenientes de una disección reciente de tejido fetal (en piezas de 5 × 5 mm) (pulmón, hígado, timo y bazo), se seccionan en un criostato a –20°C, se montan en portas para microscopía y se fijan con acetona al 100%. Después de secarlos, los cortes se incuban a 37°C durante 30 minutos en una atmósfera húmeda con una dilución apropiada de anticuerpo de cerdo conjugado frente al HVE-1. El exceso de los anticuerpos no reaccionantes se elimina con dos lavados en PBS y, a continuación, los cortes de tejido se cubren con un medio de montaje acuoso y un cubreobjetos, y se observan para comprobar si hay células fluorescentes, que indicarán la presencia de antígeno del HVE. Cada prueba debe incluir un control positivo y uno negativo, que consistirán en cortes de tejidos fetales infectados y no infectados por el HVE-1, respectivamente.

1.5. Detección del virus mediante tinción con inmunoperoxidasa

Se han desarrollado métodos inmunohistoquímicos de tinción enzimática (IH) (por ejemplo, con peroxidasa), que constituyen procedimientos para detectar antígeno del HVE-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 HVE-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 HVE-1 o HVE-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 HVE-1. Este método de tinción no es específico de tipo y, por lo tanto, para discriminar entre el HVE-1 y el HVE-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 HVE.

1.6. Histopatología

Debe realizarse un examen histopatológico de los cortes de placenta y pulmón, hígado, glándulas suprarrenales y timo de fetos abortados y 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 herpesvirus. La lesión microscópica característica que se asocia a la neuropatía por el HVE-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).

2. Pruebas serológicas

Tanto el HVE-1 como el HVE-4 son endémicos en la mayor parte del mundo y su seroprevalencia es alta, aunque para el diagnóstico de la RE puede resultar útil el empleo de pruebas serológicas en muestras de suero pareadas. El diagnóstico se basa en la detección de incrementos notables (del cuádruple o más) en los títulos de anticuerpos en los sueros pareados tomados durante las fases aguda y de convalecencia de la enfermedad. Los resultados de las pruebas realizadas con sueros de una toma individual suelen ser imposibles de interpretar con una cierta seguridad. La muestra de suero inicial (fase aguda) debe tomarse lo antes posible después de la aparición de los signos clínicos, y la segunda muestra de suero (fase de convalecencia) debe tomarse entre 2 y 4 semanas después.

Los sueros de la “fase aguda” de las yeguas después de los abortos o de los caballos con enfermedad neurológica debida al HVE-1, pueden contener ya títulos máximos de anticuerpo contra el HVE-1, sin que haya un aumento detectable en el título de los sueros recogidos con posterioridad. En estos casos, las pruebas serológicas en muestras pareadas de otros miembros de un grupo sin sintomatología clínica pueden proporcionar información útil para el diagnóstico retrospectivo de la RE dentro del rebaño.

Finalmente, la detección serológica de anticuerpos contra el HVE-1 en sangre procedente de corazón, o de cordón umbilical o de otros líquidos de los fetos equinos puede tener valor diagnóstico en los casos de aborto, sobre todo cuando el feto es virológicamente negativo. El ácido nucleico de los HVE-1/4 puede identificarse a partir de estos tejidos mediante PCR.

La concentración sérica de los anticuerpos anti-HVE-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.*, 1995). No hay reactivos o técnicas internacionalmente estandarizadas para realizar ninguna de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a los HVE-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 HVE-1 y el HVE-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 HVE-1 o el HVE-4 a lo largo de la enfermedad es una confirmación serológica de infección reciente con uno de los virus.

La prueba de la microneutralización se utiliza mucho y es sensible para detección de anticuerpos contra los HVE-1/4, y por tanto se describe aquí.

2.1. Prueba de la neutralización del virus

Esta prueba se suele realizar en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (grado de cultivo de tejidos) utilizando una dosis constante de virus y diluciones a la mitad de sueros equinos problema. Se requieren al menos dos pocillos duplicados por cada dilución de cada suero. A lo largo del proceso se utiliza MEM sin suero como diluyente. Las reservas de virus de título conocido se diluyen inmediatamente antes de su uso hasta que contengan 100 DICT₅₀ (dosis infectiva en un 50% de los cultivos de tejidos) en 25 µl. Se dispersan monocapas de células E-Derm o RK-13 con EDTA/tripsina y se resuspenden a una concentración de 5×10^5 células/ml. Adviértase que las células RK-13 se pueden utilizar con HVE-1 pero no dan un ECP claro con el HVE-4. En cada ensayo se deben incluir controles positivos y negativos para la viabilidad celular, la infectividad vírica y la prueba de citotoxicidad del suero. Los títulos finales de anticuerpos mediante la neutralización vírica (NV) se calculan determinando el inverso de la dilución más alta de suero que protege al 100% la monocapa celular de la destrucción por el virus en los dos pocillos duplicados.

Puede observarse toxicidad sérica en muestras de caballos vacunados reiteradamente con una vacuna comercial preparada con HVE-1 cultivado en células RK-13. Ello puede originar dificultades en la interpretación de los resultados de la prueba a diluciones séricas bajas. El problema puede resolverse empleando células E-derm u otra línea celular que no derive de riñón de conejo.

2.1.1. Procedimiento analítico

Un procedimiento adecuado para la prueba es el siguiente:

- i) Se inactivan los sueros problema y control durante 30 minutos en un baño con agua a 56°C.
- ii) Se añaden 25 µl de MEM sin suero a todos los pocillos de las placas problema de microtitulación.
- iii) Se pipetea 25 µl de cada suero problema en pocillos duplicados de las filas A y B de la placa. La primera fila sirve como control de la citotoxicidad del suero y la segunda, como la primera dilución del ensayo. Se hacen diluciones seriadas a la mitad de cada suero empezando con la fila B y siguiendo hacia abajo en la placa, por mezcla y transferencia secuencial de 25 µl a cada fila subsiguiente de pocillos. En cada placa se pueden analizar seis sueros.
- iv) Se añaden a cada pocillo 25 µl de la reserva de virus HVE-1 o HVE-2 convenientemente diluido (100 DICT₅₀/pocillo) excepto a los de la fila A, que son los pocillos de suero control para analizar la citotoxicidad del suero en las células indicadoras. Adviértase que las diluciones finales de suero, después de la adición del virus, van de 1/4 a 1/256.
- v) Se debe incluir una placa control con la titulación de suero positivo y negativo de caballo de título conocido, el control de células (sin virus), el control de virus (sin suero) y una titulación de virus para calcular la cantidad real de virus utilizado en la prueba.
- vi) Se incuban las placas 1 hora a 37°C en atmósfera con un 5% de CO₂.
- vii) Se añaden a cada pocillo 50 µl de la suspensión de células E-Derm o RK-13 preparadas (5 × 10⁵ células/ml) en MEM/10% de FCS.
- viii) Se incuban las placas 4–5 días a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
- ix) Se examinan las placas al microscopio para comprobar si hay ECP y se anotan los resultados en una hoja de trabajo. Alternativamente, las monocapas celulares se pueden analizar en cuanto al ECP después de fijar y teñir del modo siguiente: después de quitar el líquido del cultivo, se sumergen las placas durante 15 minutos en una solución que contenga 2 mg/ml de cristal violeta, 10% de formalina, 45% de metanol, y 45% de agua. Luego, se lavan las placas vigorosamente bajo un chorro de agua del grifo.
- x) Los pocillos que contienen monocapas intactas se tiñen de azul, mientras que las monocapas destruidas por el virus no se tiñen. Se comprueba que los pocillos del control de células, del control positivo de suero y del control de citotoxicidad del suero, se tiñen de azul, que los pocillos del control de virus y del control negativo de suero no se tiñen, y que la cantidad real de virus añadida a cada pocillo está entre 10^{1.5} y 10^{2.5} DICT₅₀. Los pocillos se consideran positivos si permanece intacto el 100% de la monocapa celular. La mayor dilución de suero que origina una neutralización completa del virus (no existe ECP) en los dos pocillos duplicados es el título final de dicho suero.
- xi) Se calcula el título de neutralización para cada suero analizado, y se comparan los títulos del suero de la fase aguda y de la fase convaleciente de cada animal para determinar si se han producido aumentos del cuádruple o superiores.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Se dispone de vacunas vivas atenuadas y de vacunas inactivadas para caballos como productos comerciales autorizados y preparados para la utilización durante la reducción del impacto de los casos de enfermedad causada por la infección con los HVE-1/4. Estos productos contienen distintas permutaciones de los HVE-1 y HVE-4 y algunos también incluyen virus de la influenza equina.

La experiencia clínica ha demostrado que la vacunación puede resultar útil para reducir los signos clínicos de la enfermedad respiratoria y la incidencia de abortos, aunque no todas las vacunas protegen contra la enfermedad neurológica. Los respectivos fabricantes recomiendan administrar múltiples dosis anuales de cada una de las vacunas contra RE actualmente en el mercado. Los programas vacunales varían en función de la vacuna.

Las indicaciones que se indican en la ficha técnica de las distintas vacunas disponibles contra la RE señalan la prevención de la enfermedad respiratoria relacionada con el herpesvirus, una ayuda a la prevención del aborto o

ambas. Solo cuatro vacunas han cumplido los requisitos exigidos para demostrar eficacia en cuanto a protección frente al aborto inducido por herpesvirus como resultado de vacunaciones y experimentos de desafío eficaces en yeguas gestantes. No se ha demostrado de forma concluyente la capacidad de ninguna de las vacunas para evitar la aparición de la enfermedad neurológica que a veces se asocia con la infección por HVE-1.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices indicadas tanto aquí como en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden precisar una suplementación en función de los requisitos nacionales y regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

El inóculo primario de virus (MSV) o las vacunas contra la RE se deben preparar a partir de cepas del HVE-1 y/o el HVE-4 que hayan sido identificadas de modo positivo e inequívoco mediante pruebas serológicas y genéticas. El inóculo de virus debe propagarse en una línea celular aprobada para la producción de vacunas equinas por una agencia de control apropiada. Tanto para las preparaciones de inóculo primario de virus como de las reservas de células que se empleen en la producción de vacunas se debe llevar un historial completo de la fuente original (en el que se especifique el número de cepa y el lugar y el año de aislamiento), el historial de pases, el medio utilizado para la propagación, etc.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Se debe demostrar que las reservas almacenadas permanentemente, tanto de MSV como del inóculo primario de células (MCS), usados en la producción de vacunas, son puros, seguros, y en el caso de MSV, también inmunogénicos.

En general, los países más altos permitidos para la producción de vacunas son el quinto para el MSV y el vigésimo para MCS. Los resultados de todas las pruebas de control de calidad sobre los inóculos primarios deben guardarse y constituyen parte de la documentación permanente de la autorización.

2.1.2. Criterios de calidad

Las pruebas de pureza del inóculo primario incluyen procedimientos obligatorios que demuestren que las reservas de inóculo de virus y de células están libres de bacterias, hongos, micoplasmas y virus indeseables. Se deben realizar pruebas especiales para confirmar la ausencia del virus de la arteritis equina, del virus de la anemia infecciosa equina, del virus de la gripe equina, de los herpesvirus equinos 2 y 5, de los virus A y B de la rinitis equina, de los alfavirus de la encefalomiелitis equina, del virus de la diarrea bovina vírica (BVDV – un contaminante frecuente del suero bovino) y del parvovirus porcino (PPV – un contaminante potencial de la tripsina de cerdo). La comprobación de la pureza también debería incluir la exclusión de la presencia del HVE-1 en el MSV del HVE-4 y viceversa.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Las pruebas de inmunogenicidad de las reservas de MSV HVE-1/4 deben realizarse con caballos vacunados con una vacuna de prueba experimental preparada a partir del pase más alto del MSV permitido para la producción de vacunas. La prueba de inmunogenicidad del MSV consiste en la vacunación de caballos con títulos bajos de anticuerpos contra el HVE-1/4 con la dosis de la vacuna estudiada que se vaya a recomendar en la ficha técnica del producto final. Deben obtenerse muestras de suero por segunda vez y analizarse para comprobar si presentan aumentos significativos en el título de anticuerpos neutralizantes contra el virus 21 días después de la última dosis.

Las muestras de cada lote de MSV que se usen para la preparación de vacunas vivas atenuadas contra la RE deben comprobarse su inocuidad en caballos susceptibles al virus virulento natural, incluyendo las yeguas gestantes que se encuentren en los 4 últimos meses de gestación. La inocuidad de la vacuna debe demostrarse mediante un “ensayo de inocuidad de campo” en caballos de diferentes edades de tres áreas geográficas distintas. Debería realizarse por veterinarios independientes utilizando un lote de vacuna pre-autorizado. La inocuidad de las vacunas con HVE-1 que indican una eficacia contra el aborto debe comprobarse en un número significativo de yeguas gestantes en gestación avanzada siguiendo la cronología de la vacunación indicada por el fabricante del producto final de la vacuna.

2.2. Método de producción

2.2.1. Procedimiento

Debe reunirse, aprobarse y cumplirse un Diseño de Producción autorizado por la agencia apropiada que reúna un protocolo detallado de los métodos de producción que se siguen en la preparación de las vacunas contra la RE. Los detalles de los métodos de producción de vacunas contra la RE varían según el tipo (vivas o inactivadas) y la composición (HVE-1 solo, HVE-1 y HVE-4, HVE-4 y virus de la gripe equina, etc.) de cada producto individual, y también según el fabricante.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Tanto las células, como los virus, el medio de cultivo, y los aditivos del medio de origen animal que se utilizan para preparar la producción de los lotes de vacuna deben proceder de reservas que superen las pruebas prescritas en cuanto a esterilidad sobre bacterias, hongos y micoplasmas; ausencia de tumorigenicidad; y ausencia de virus indeseables.

2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Las muestras de cada lote de vacuna completo se analizan para detectar la contaminación por bacterias, hongos y micoplasmas. También se requieren procedimientos para establecer que las vacunas están libres de virus indeseables; tales pruebas deben incluir la inoculación de cultivos celulares que permitan la detección de los virus equinos más comunes, así como las técnicas para la detección del BVDV y el PPV en los ingredientes de origen animal que se utilizan en la producción del lote de la vacuna.

ii) Identidad

Las pruebas de identidad deben demostrar que no hay ninguna otra cepa vacunal cuando se propagan varias cepas en un laboratorio empleado para la producción de múltiples vacunas.

iii) Inocuidad

Las pruebas de inocuidad deben consistir en detectar posibles reacciones adversas anómalas, ya sean locales o sistémicas, frente a la vacuna en las especies de destino y por cualquier vía de administración. Las pruebas para asegurar la inocuidad de cada lote de vacuna contra la RE deben demostrar la inactivación completa del virus (en el caso de las vacunas inactivadas) así como un nivel residual del agente inactivador de los virus que no exceda el límite máximo permitido (por ejemplo, 0,2% en el caso del formaldehído).

iv) Potencia del lote

La potencia del lote se examina en el producto formulado final. El control de los lotes en cuanto a la potencia antigénica solo se puede ensayar midiendo la capacidad de diluciones de la vacuna para proteger a los hámsteres de las inoculaciones con una dosis letal del virus HVE-1 adaptado al hámster. Aunque las pruebas de potencia en los lotes de vacunas contra la RE también se pueden realizar vacunando caballos susceptibles y comprobando después si hay seroconversión, la nueva disponibilidad de MAb específicos para el tipo vírico ha permitido la elaboración de inmunoanálisis *in vitro* para la potencia antigénica que son menos costosos y más rápidos. El fundamento de esos ensayos *in vitro* para la potencia de vacunas contra la RE es la determinación, mediante el uso del MAb específico, de la presencia en cada lote de vacuna de al menos la cantidad mínima de antígeno que se correlaciona con el debido nivel de protección (o de tasa de seroconversión) en una prueba estandarizada de potencia en los animales.

2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de producción

Para el registro de vacunas, deben facilitarse a las autoridades todos los datos relevantes relativos a la producción de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 y C.2.2). Deberá proporcionarse esta información sobre tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2 Requisitos de inocuidad

La inocuidad de la vacuna debe evaluarse en animales vacunados empleando distintas pruebas (véase el apartado 2.2.4.iii).

2.3.3 Requisitos de eficacia

La eficacia (protección) de la vacuna se estima en animales vacunados evaluando directamente su resistencia ante la exposición al agente patógeno vivo.

2.3.4 Duración de la inmunidad

Como parte del proceso de licencia o autorización de la comercialización, es posible que se exija al fabricante que demuestre la duración de la inmunidad (DOI) de una vacuna determinada, ya sea mediante exposición o con otra prueba al final del periodo de protección indicado.

No se requieren pruebas para establecer la duración de la inmunidad frente a HVE-1/4 mediante inmunización con cada lote de vacunas. Los resultados de muchas observaciones indican que la inmunidad inducida por las vacunas frente a HVE-1/4 no dura más que unos cuantos meses; estas observaciones se reflejan en la frecuencia de las revacunaciones que se recomienda en los prospectos de las vacunas contra la RE.

2.3.5 Estabilidad

Como parte del proceso de licencia o autorización de la comercialización, es posible que se exija al fabricante que demuestre la estabilidad de todas las propiedades de la vacuna al final del periodo de validez indicado. Deberá indicarse la temperatura de conservación y deberán mostrarse advertencias en caso de que el producto pueda resultar dañado por la congelación o por permanecer a temperatura ambiente.

Antes de alcanzar una conclusión sobre la estabilidad de la vacuna, se deben ensayar al menos tres lotes de vacuna respecto a la caducidad. Cuando se mantienen a 4°C, los productos de las vacunas inactivadas suelen conservar su potencia antigénica original durante al menos 1 año. Las preparaciones liofilizadas de las vacunas vivas son también estables después de la conservación a 4°C durante 1 año. Después de la reconstitución, las vacunas con virus vivos son inestables y no se pueden conservar sin pérdida de potencia.

Nota: las vacunas actuales se autorizan para la prevención de enfermedad respiratoria o como ayuda a la prevención del aborto. A no ser que se esté investigando la capacidad de la vacuna de prevenir enfermedad neurológica, el virus que se emplee en las pruebas de desafío no podrá pertenecer a una cepa con antecedentes de inducción de enfermedad neurológica.

BIBLIOGRAFÍA

ALLEN G.P. (2007). Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 69–72.

ALLEN G.P. & BRYANS J.T. (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.

ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. *Equine Infect. Dis.*, **8**, 129–146.

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.

BRYANS J.T. & ALLEN G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. *In: Herpesvirus Diseases of Animals*, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.

CRABB B.S., MACPHERSON C.M., REUBEL G.H., BROWNING G.F., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch. Virol.*, **140**, 245–258.

CRABB B.S. & STUDDERT M.J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus Res.*, **45**, 153–190.

DIALLO I.S., HEWITSON G., WRIGHT L., RODWELL B.J. & CORNEY B.G. (2006). Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **131**, 92–98.

DIALLO I.S., HEWITSON G., WRIGHT L.L., KELLY M.A., RODWELL B.J. & CORNEY B.G. (2007). Multiplex real-time PCR for detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet. Microbiol.*, **123**, 93–103.

FRITSCHKE A.K. & BORCHERS K. (2011). Detection of neuropathogenic strains of equid herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Vet. Microbiol.*, **147**, 176-180.

GUNN H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.*, **44**, 37–40.

GOODMAN L.B., LOREGIAN A., PERKINS G.A., NUGENT J., BUCKLES E.L., MERCORELLI B., KYDD J.H., PALÙ G., SMITH K.C., OSTERRIEDER N. & DAVIS-POYNTER N. (2007). A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog.*, **3** (11), e160.

HARTLEY C.A., WILKS C.R., STUDDERT M.J. & GILKERSON J.R. (2005). Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am. J. Vet. Res.*, **66** (5), 921–928.

HUSSEY S.B., CLARK R., LUNN K.F., BREATHNACH C., SOBOLL G., WHALLEY J.M. & LUNN D.P. (2006). Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**, 335–342.

LAWRENCE G.L., GILKERSON J., LOVE D.N., SABINE M. & WHALLEY J.M. (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.

NUGENT J., BIRCH-MACHIN I., SMITH K.C., MUMFORD J.A., SWANN Z., NEWTON J.R., BOWDEN R.J., ALLEN G.P. & DAVIS-POYNTER N. (2006). Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.*, **80**, 4047–4060.

O'KEEFE J.S., JULIAN A., MORIARTY K., MURRAY A. & WILKS C.R. (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. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 93–96.

SCHULTHEISS P.C., COLLINS J.K. & 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.

SMITH K.L., LI Y., BREHENY P., COOK R.F., HENNEY P.J., SELLS S., PRONOST S., LU Z., CROSSLEY B.M., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B. (2012). Development and validation of a new and improved allelic discrimination real-time PCR assay for the detection of equine herpesvirus-1 (EHV-1) and differentiation of A2254 from G2254 strains in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 1981–1988.

TELFORD E.A.R., WATSON M.S., MCBRIDE K. & DAVISON A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316.

TELFORD E.A.R., WATSON M.S., PERRY J., CULLINANE A.A. & DAVISON A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1197–1203.

THOMSON G.R., MUMFORD J.A., CAMPBELL J., GRIFFITHS L. & CLAPHAM P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, **8**, 58–65.

VAN MAANEN C., VREESWIJK J., MOONEN P., BRINKHOF J. DE BOER-LUIJTZE E. & TERPSTRA 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.

VARRASSO A., DYNON K., FICORILLI N., HARTLEY C.A., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, **79**, 563–569.

WHITWELL K.E., GOWER S.M. & SMITH K.C. (1992). An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques. *Equine Vet. J.*, **24**, 10–12.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Rinoneumonía equina (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la rinoneumonía equina y para enviar cepas que deban caracterizarse en mayor grado.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.