

## ARTERITIS VIRAL EQUINA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ARTERITIS EQUINA)

---

### RESUMEN

La arteritis viral equina (AVE) es una enfermedad vírica y contagiosa de los équidos causada por el virus de la arteritis equina (VAE), un virus con ARN clasificado en el género Arterivirus, de la familia Arteriviridae. El virus de la arteritis equina se encuentra en poblaciones de caballos de muchos países de todo el mundo. Aunque en el pasado se describían muy raramente, los brotes confirmados de AVE parecen en aumento.

**Descripción de la enfermedad:** La mayoría de las infecciones contraídas de forma natural por el VAE son subclínicas. Cuando aparecen, los signos clínicos de la AVE varían en extensión y gravedad. La enfermedad se caracteriza principalmente por fiebre, depresión, anorexia, edema distal, en especial en las patas y en el escroto y prepucio de los sementales, conjuntivitis, una reacción cutánea de tipo urticario, abortos, y, en raras ocasiones, neumonía fulminante y enteritis o neumoenteritis en potros jóvenes. Excepto por la mortalidad en potros jóvenes, la frecuencia de casos con mortalidad en los brotes de AVE es muy baja. Por lo general, los caballos afectados se recuperan por completo desde el punto de vista clínico. En un porcentaje variable de sementales infectados se establece un estado de portador crónico, pero no en yeguas, caballos castrados ni potros sexualmente inmaduros.

**Identificación del agente:** Clínicamente la AVE no puede diferenciarse de otras enfermedades equinas de tipo respiratorio y sistémico. El diagnóstico de la infección por el VAE se basa en pruebas de laboratorio y en el aislamiento del virus, la detección del antígeno vírico o su ácido nucleico, o en la demostración de una respuesta de anticuerpos específicos. En los casos en que se sospeche de la enfermedad, puede intentarse la detección e identificación del ácido nucleico del VAE empleando distintas pruebas de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). La identidad de las cepas del VAE debe confirmarse mediante RT-PCR, pruebas de neutralización, o por métodos inmunocitoquímicos, fundamentalmente por inmunofluorescencia indirecta o por técnicas de avidina–biotina–peroxidasa.

Cuando la mortalidad se asocia a un brote sospechoso de AVE, debe comprobarse en una amplia variedad de tejidos si presentan signos histológicos de panvasculitis, que es especialmente notable en las arterias pequeñas de todo el cuerpo. Las lesiones vasculares características que se presentan en el animal maduro no son una propiedad destacable en los abortos relacionados con la AVE, cuyo diagnóstico se basa en el aislamiento del virus, la detección del ácido nucleico mediante RT-PCR o poniendo de manifiesto antígenos del VAE mediante examen inmunohistoquímico de distintos tejidos fetales y de la placenta.

**Pruebas serológicas:** Para la detección de anticuerpos contra el VAE se han utilizado varias pruebas serológicas, como la neutralización vírica (NV), la fijación del complemento (FC), la inmunofluorescencia indirecta, la inmunodifusión en gel de agar, el enzimoimmunoanálisis (ELISA), y el inmunoanálisis de microesferas fluorescentes (MIA). Las pruebas actualmente más utilizadas son la prueba de la NV potenciada con complemento y la técnica ELISA. La prueba de la NV es muy sensible y específica y de probado valor en el diagnóstico de la infección aguda y en estudios de seroprevalencia. Se han desarrollado varios métodos de ELISA, y aunque ninguno de ellos ha sido validado tan ampliamente como la prueba de la NV, algunos parecen mostrar una especificidad comparable y una sensibilidad casi equivalente. La prueba de la FC es menos sensible que cualquiera la NV y que el ELISA, pero puede utilizarse para diagnosticar una infección reciente.

**Requisitos para las vacunas:** Actualmente se dispone de dos vacunas comerciales contra la AVE derivadas de cultivo de tejidos. Una es una vacuna con virus vivo modificado (MLV) que se prepara a partir de un virus que se ha atenuado para los caballos mediante múltiples pases seriados en cultivos primarios de células renales de caballo y de conejo y en una línea de células dérmicas equinas. Se ha confirmado que es segura y protectora para caballos sementales y yeguas no preñadas. No se recomienda la vacunación de potros menores de 6 semanas de edad y de yeguas gestantes en los dos últimos meses de gestación. No existe evidencia de reversión del virus vacunal a virulento ni de recombinación con cepas naturales del VAE después de su utilización en el campo. La segunda vacuna es un producto inactivado y con adyuvante que se prepara con virus obtenido de cultivo celular equino que puede usarse tanto en caballos reproductores como en no reproductores. A falta de datos apropiados sobre seguridad, no se recomienda en la actualidad el uso de la vacuna en yeguas gestantes.

## A. INTRODUCCIÓN

### 1. Definición de la enfermedad y la etiología

La arteritis viral equina (AVE) es una enfermedad vírica contagiosa de los équidos causada por el virus de la arteritis equina (VAE), un virus con ARN monocatenario y con polaridad de mensajero, que es el miembro prototipo del género *Arterivirus*, de la familia *Arteriviridae*, orden *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). Hasta ahora solo se ha aislado un serotipo principal del virus. Algunas de las denominaciones descriptivas que se usaron en el pasado para referirse a una enfermedad clínicamente muy semejante a la AVE son linfangitis epizoótica de ojo rosado, fiebre tifoide y “rotlaufseuche”. El espectro de hospedadores naturales del VAE parece restringido a los équidos, aunque existe alguna evidencia muy escasa de que también puede incluir los camélidos del nuevo mundo, como las alpacas y las llamas (Weber *et al.*, 2006). Este virus no constituye un riesgo sanitario para los humanos (Timoney & McCollum, 1993).

Aunque la mayoría de los casos de infección aguda por el VAE son subclínicos, algunas cepas del virus originan enfermedad con una gravedad variable (Timoney & McCollum, 1993). Los casos típicos de AVE se pueden presentar combinados con todos los siguientes signos o cualquier combinación de los mismos: fiebre, depresión, anorexia, leucopenia, edema distal, especialmente en las patas, escroto y prepucio de los sementales, conjuntivitis, secreción oculares, edema supra y periorbital, rinitis, secreción nasal, reacción cutánea local o generalizada de tipo urticario, un periodo de subfertilidad temporal en sementales afectados de forma aguda, aborto, mortinatos y, raramente, neumonía, enteritis o neumo-enteritis fulminante en potros jóvenes. Independientemente de la gravedad de los signos clínicos, los caballos afectados casi siempre se recuperan por completo. La frecuencia de casos mortales en brotes de AVE es muy baja; en general, la mortalidad solo se presenta en potros muy jóvenes, sobre todo en aquellos con infección congénita del virus (Timoney & McCollum, 1993; Vaala *et al.*, 1992) y muy raramente en caballos adultos que por lo demás, están sanos.

Un porcentaje variable de sementales que resultan infectados de forma aguda más adelante se convierten en portadores crónicos en el tracto reproductor y excretan el virus con el semen en cada eyaculación (Timoney & McCollum, 1993). El estado de portador, que se ha observado que depende de los andrógenos, se ha hallado en el semental pero no en la yegua, el caballo castrado ni el potro sexualmente inmaduro (Timoney & McCollum, 1993). Aunque la disminución temporal de la concentración de testosterona en la sangre empleando un antagonista de la GnRH o mediante inmunización con GnRH parecería haber acelerado la resolución del estado de portador en algunos sementales, todavía no se establecido del todo cuál es la eficacia de ninguna de las estrategias de tratamiento. Se ha expresado preocupación por el hecho de que este tipo de enfoque terapéutico pudiera utilizarse para enmascarar a propósito la existencia del estado de portador.

Las lesiones macroscópicas y microscópicas descritas en los casos mortales de AVE reflejan la extensa lesión vascular que causa el virus (Del Piero, 2000). El VAE causa una vasculitis diseminada, principalmente de las arteriolas y vénulas más pequeñas. Ello da lugar a edema, congestión y hemorragias, sobre todo en el tejido subcutáneo de las extremidades y del abdomen, y un exceso de líquido peritoneal, pleural y pericárdico (Jones *et al.*, 1957). En casos mortales de AVE de potros jóvenes se ha descrito edema pulmonar, enfisema y neumonía intersticial, enteritis e infartos esplénicos (Del Piero, 2000). No suele haber lesiones macroscópicas en los casos de aborto, y en cuanto a las alteraciones microscópicas, si las hay, suelen observarse en la placenta, el hígado, el bazo y los pulmones del feto.

Los factores que se consideran importantes en la epidemiología de la AVE son la variación fenotípica entre cepas víricas, los mecanismos de transmisión durante las fases aguda y crónica de la infección, el estado de portador del semental, la naturaleza y duración de la inmunidad adquirida y las tendencias cambiantes en la industria equina. El VAE infecta a poblaciones de caballos de muchos países de todo el mundo (Timoney & McCollum, 1993). Ha habido un aumento de la incidencia de la AVE en los últimos años que se ha relacionado

con el aumento de la frecuencia de desplazamientos de caballos y con el empleo de semen que ha sido transportado (Balasuriya *et al.*, 1998). La transmisión del VAE puede tener lugar por vía respiratoria, venérea o congénita. La transmisión por vía respiratoria es más importante durante la fase aguda de la infección. El VAE también se puede transmitir por vía venérea desde el semental infectado de forma aguda a la yegua o al contrario, y por parte del semental portador.

El objetivo de los programas actuales de control de la AVE son prevenir la diseminación del VAE en poblaciones de reproductores, con el fin de minimizar el riesgo de brotes de abortos y de muertes en potros jóvenes, así como para establecer el estado de portador en potros y sementales (Timoney & McCollum, 1993). Estos programas se basan en unas prácticas de manejo adecuadas y un programa de vacunación contra la enfermedad dirigido de sementales reproductores y potros sexualmente inmaduros.

## 2. Diagnóstico diferencial

La AVE no puede diferenciarse clínicamente de muchas otras enfermedades equinas respiratorias y sistémicas, entre las cuales las más frecuentes son las infecciones por influenza equina, herpesvirus equinos tipo 1 y tipo 4, la infección por los virus de la rinitis equina A y B, y las infecciones por adenovirus y estreptococos equinos, especialmente la púrpura hemorrágica. Esta enfermedad también tiene similitudes clínicas con la anemia infecciosa equina, la infección por el virus de la encefalitis equina, la peste equina africana, casos de infección por el virus Hendra, la infección por el virus Getah y la toxicosis causada por la planta *Berberoa incana* (Timoney & McCollum, 1993).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Pruebas de las que se dispone y sus finalidades

Método	Finalidad					
	Determinar la ausencia de infección en la población	Determinar la ausencia de infección en animales determinados	Determinar la eficiencia de las políticas de eliminación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales determinados o en poblaciones post-vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Aislamiento del virus	–	+++	–	+++	–	–
Reacción en cadena de la polimerasa	–	+++	–	+++	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
Inmunodifusión en gel de agar	–	–	–	–	–	–
Fijación del complemento	–	–	–	+++	–	–
Enzimo-inmunoanálisis	+	++	+	++	+++	+
Neutralización del virus	+	+++	+	+++	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad. Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido estandarizadas y validadas formalmente, su perfil sistemático y el hecho de que se hayan utilizado mucho sin resultados dudosos, las hace aceptables.

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

La detección e identificación del VAE a partir de muestras clínicas y de tejidos adecuados puede lograrse mediante el aislamiento del virus en cultivo celular y con la detección del ácido nucleico del virus empleando varios tipos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Ambos enfoques diagnósticos son adecuados para confirmar casos clínicos de AVE así como para establecer la ausencia de infección por el VAE en animales determinados. En este segundo contexto, se ha utilizado el aislamiento del virus y RT-PCR en estudios de vigilancia y en el proceso destinado a que pueda tener lugar el desplazamiento de animales. La detección de antígeno mediante el uso de distintas técnicas de inmunomarcaje también tiene aplicación diagnóstica cuando se examinan tejidos procedentes de casos sospechosos de aborto, muerte en potros jóvenes o caballos de más edad como consecuencia de la AVE.

El aislamiento del VAE puede intentarse en pocas líneas celulares, entre las cuales, la línea de células renales de conejo RK-13 (ATCC CCL37 o RK13-KY<sup>2</sup>) han mostrado ser óptimas, especialmente cuando se analiza semen de semental. En varios estudios comparativos exhaustivos se ha observado que el aislamiento del virus tiene una sensibilidad equivalente a la RT-PCR para la detección del VAE en muestras tanto del animal enfermo como tomadas post-mortem. Aunque muchos aislamientos del virus se llevan a cabo en fase inicial en cultivo celular, el aislamiento vírico no es una prueba de diagnóstico rápida, contrariamente a lo que puede decirse de las RT-PCR, que permiten obtener resultados el mismo día.

Para la detección del VAE se ha desarrollado una gran variedad de RT-PCR (de un solo paso, anidada y de tiempo real). Lamentablemente, en muy pocas se han validado la sensibilidad y la especificidad de forma adecuada, ni se han comparado estos parámetros con las que ofrece el aislamiento del virus. Es importante destacar que la elección de kits de reactivos tanto para ácido nucleico como para la extracción y amplificación en la prueba de la RT-PCR en tiempo real puede influir de forma importante en la sensibilidad y robustez diagnósticas generales de la prueba (Miszczak *et al.*, 2011).

La prueba de la inmunohistoquímica para el antígeno del VAE en cortes de tejido congelados o fijados se realiza mejor empleando un suero policlonal mono-específico contra el virus o un anticuerpo monoclonal (MAb) dirigido contra la proteína vírica de la nucleocápsida (N) altamente conservada.

De las pruebas serológicas evaluadas para la detección de anticuerpos contra el VAE, se ha comprobado que la neutralización del virus (NV) potenciada por el complemento es la más fiable para el diagnóstico de la infección aguda por el VAE y para estudios de serovigilancia. De entre las numerosas pruebas de enzimo-inmunoanálisis (ELISA) que se han desarrollado, solo unas pocas ofrecen una sensibilidad y una especificidad comparables, aunque no idénticas, a las de la NV. Una ventaja del ELISA específico del VAE es que permite obtener el resultado el mismo día, mientras que la NV requiere 72 horas. Ninguna de las pruebas de las que se dispone permite diferenciar de manera fiable los títulos de anticuerpos debidos a una infección natural de los debidos a la vacunación.

## 1. Identificación del agente

### 1.1. Cultivo *in vitro*

Cuando se sospecha la aparición de un brote de AVE o cuando se intenta confirmar un caso de una infección subclínica por el VAE, debe intentarse aislar el virus de hisopos nasofaríngeos o nasales profundos, de hisopos conjuntivales, muestras de sangre no coagulada, y semen de los sementales que sean posibles portadores del virus (Timoney & McCollum, 1993). Para aumentar la probabilidad de aislar el virus durante un brote, se deben obtener muestras representativas lo antes posible después de la aparición de la fiebre en los caballos afectados. Al intentar el aislamiento del virus a partir de células mononucleares periféricas (PBMC), la sangre debe recogerse con el anticoagulante citrato o ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Dado que la heparina puede inhibir el crecimiento del VAE en células de riñón de conejo (línea celular RK-13), su empleo como anticoagulante está contraindicado ya que puede interferir con el aislamiento del virus a partir de sangre completa. Cuando en casos de mortalidad de potros o animales mayores se sospeche que se trata de la AVE, se puede intentar el aislamiento del VAE de varios órganos, especialmente de las glándulas linfáticas asociadas al tracto alimentario y órganos relacionados, y también de los pulmones, el hígado y el bazo (McCollum *et al.*, 1971). En brotes de aborto relacionados con la AVE y/o en los casos de potros mortinatos los líquidos placentarios y fetales, así como gran variedad de tejidos fetales (especialmente los de pulmón), placentarios y linforeticulares pueden ser una fuente productiva de virus (Timoney & McCollum, 1993).

Los hisopos tomados para el aislamiento deben introducirse en un medio adecuado de transporte y, junto con líquidos o tejidos recogidos para el aislamiento del virus y/o para pruebas por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), deben enviarse al laboratorio

---

2 Disponible en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Arteritis viral equina, en EE.UU (para los datos de contacto, consúltese la página web de la OIE: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

refrigerados o congelados en un contenedor con aislamiento; lo ideal es realizar este envío en un plazo máximo de 24 horas. Si los hisopos van destinados al examen directo mediante RT-PCR, el palito del hisopo no debe ser de madera, porque podría contener sustancias, como conservantes, que podrían interferir con la PCR. Las muestras de sangre no coagulada deben transportarse refrigeradas pero no congeladas. Cuando sea posible, las muestras se enviarán a un laboratorio de probada competencia en pruebas relacionadas con esta infección.

Los hisopos nasofaríngeos en medio de transporte se procesan transfiriéndolos al recipiente cilíndrico de una jeringa de 10 ml, se inserta el émbolo de la jeringa y todo el líquido que pueda extraerse se recoge en un tubo estéril. Se pasa una alícuota del líquido por un prefiltro y a continuación se filtra por un filtro de membrana de 0,45 µm para jeringa, y se recoge de forma aséptica para inocularla posteriormente en un cultivo celular.

Pueden recolectarse capas leucocitarias a partir de sangre no coagulada centrifugando a 600 **g** durante 15 minutos, y la capa leucocitaria extraída después del plasma se retira cuidadosamente. A continuación, se extiende en forma de capa sobre una solución separadora de PBMC, Ficoll 1.077, y se centrifuga a 400 **g** durante 20 minutos. La interfase de PBMC (sin la mayor parte de los granulocitos) se lava dos veces con solución salina tamponada con fosfato (300 **g** durante 10 minutos) y se vuelve a suspender en 1 ml de medio mínimo esencial de Eagle (MEM) que contenga FCS al 2%. Se añade un volumen de 0,5 ml de la suspensión celular lavada a monocapas de células RK-13 en frascos de 25 cm<sup>2</sup> o placas multipocillo a las cuales se añade medio de mantenimiento.

Aunque se ha descrito que no siempre se logra en casos naturales de infección por VAE (Timoney & McCollum, 1993), el aislamiento del virus se debe intentar a partir de muestras clínicas o de tejidos obtenidos durante la necropsia utilizando cultivos celulares de riñón de conejo, caballo o mono (Timoney *et al.*, 2004; Timoney & McCollum, 1993). Se pueden usar líneas celulares seleccionadas como RK-13 (ATCC CCL-37), LLC-MK2 (ATCC CCL-7) y cultivos primarios de riñón de caballo o conejo, aunque el sistema de elección son las células RK-13 (Timoney *et al.*, 2004). Con el paso de los años, la experiencia nos ha enseñado que los aislamientos primarios del VAE a partir de semen puede provocar más dificultades que los procedentes de otras muestras clínicas o los de tejidos infectados, salvo que se utilice un sistema adecuado de cultivo celular. El aislamiento primario del VAE en células RK-13 a partir del semen parece influenciado por varios factores. Se obtienen aislamientos más frecuentes cuando se utilizan monocapas confluentes de 3–5 días de edad, un inóculo grande en comparación con el área que presenta la superficie celular en los frascos o placas multipocillo inoculados y, sobre todo, cuando se incorpora carboximetil celulosa al medio (viscosidad del medio, 400–800 cps). Debe advertirse que la mayoría de las células RK-13, incluyendo la ATCC CCL-37, están contaminadas con el virus de la diarrea vírica bovina, cuya presencia parece aumentar la sensibilidad de este sistema celular para el aislamiento primario del VAE, especialmente el obtenido de semen. En el caso de muestras de infectividad vírica baja, las tasas de aislamiento del VAE pueden aumentar cuando se utilizan células RK-13<sup>3</sup> con una historia de elevado número de pases (Timoney *et al.*, 2004).

Se comprueba a diario si los cultivos inoculados presentan efecto citopático (ECP), que normalmente aparece a los 2–6 días. En ausencia de ECP visible, los sobrenadantes de cultivo deben volver a inocularse en monocapas celulares confluentes después de 4–7 días. Mientras que la inmensa mayoría de los aislamientos del VAE se logran en el primer pase por cultivo celular, una pequeña parte de los mismos solo se hace evidente en el segundo pase o en pases ulteriores *in vitro* (Timoney & McCollum, 1993). La identidad de las cepas de VAE se puede confirmar por RT-PCT estándar o en tiempo real (Balasuriya *et al.*, 1998), en una prueba de neutralización unidireccional, o por un método inmunocitoquímico (Little *et al.*, 1995), por inmunofluorescencia indirecta (Crawford & Henson, 1973) o por la técnica de la avidina–biotina–peroxidasa (ABC) (Little *et al.*, 1995). Se ha utilizado un antisuero policlonal de conejo para identificar el VAE en cultivos celulares infectados. También se han desarrollado anticuerpos monoclonales (MAb de ratón contra la proteína de la nucleocápsida (N) y la glicoproteína principal de envoltura (GP5) del VAE, así como un antisuero monoespecífico de conejo contra la proteína (M) de la envoltura no glicosilada (Balasuriya *et al.*, 1998), que permiten detectar varias cepas del virus en células RK-13 en un plazo de apenas 12–24 tras la infección (Balasuriya *et al.*, 1998; Little *et al.*, 1995).

## 1.2. Aislamiento del virus en el semen

Existen muchos indicios de que los sementales excretan constantemente a corto y largo plazo el VAE en el semen, pero no en secreciones respiratorias ni en la orina; tampoco se ha puesto de manifiesto

---

3 Dicha línea celular (RK-13) puede obtenerse del Laboratorio de Referencia de la OIE para la Arteritis viral equina, en EE.UU (para los datos de contacto, consúltese la página web de la OIE: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

el virus en la capa leucocitaria de la sangre (células mononucleares periféricas de la sangre) de dichos animales (Timoney *et al.*, 1987; Timoney & McCollum, 1993). La sangre de los sementales debe analizarse primero mediante la NV, mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) validado adecuadamente o mediante otros procedimientos de pruebas serológicas. Se debe tratar de aislar el virus del semen de los sementales seropositivos para anticuerpos anti VAE (por ejemplo, con un título de NV  $\geq 1/4$ ) que no tengan antecedentes de vacunación contra la AVE, asegurándose también de que sean seronegativos (título de NV  $< 1/4$ ) en el momento de la vacunación inicial. También se recomienda el aislamiento del virus en el caso de semen enviado, cuando no se dispone del estatus serológico ni del posible historial de vacunaciones del semental donante. A ser posible, el aislamiento del virus a partir del semen debe intentarse con dos muestras, que se pueden recoger el mismo día, en días consecutivos o a intervalos de días o semanas. No hay indicios de que el resultado del aislamiento del virus de un semental particular esté influenciado por la frecuencia del muestreo, el intervalo entre las tomas de muestras ni la época del año. El aislamiento del VAE debe realizarse con preferencia en una porción del eyaculado completo recogido mediante una vagina artificial o mediante un condón y un maniquí. Cuando no es posible obtener semen de este modo, un método alternativo menos deseable es tomar una muestra en el momento en que el semental se baja de la yegua tras el apareamiento. Se debe tener cuidado en no usar antisépticos ni desinfectantes en la limpieza de los genitales externos del semental antes de la recogida. Las muestras deben contener la fracción de la eyaculación rica en esperma con la que se asocia el VAE, ya que el virus no se presenta en la fracción pre-espermática del semen (Timoney *et al.*, 1987; Timoney & McCollum, 1993). Inmediatamente después de la recogida, el semen debe refrigerarse sobre hielo picado o bloques de congelador para trasladarlo al laboratorio sin demora. Cuando se pueda producir alguna demora en la entrega del semen al laboratorio para su análisis, se puede congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o menos, durante un breve periodo de tiempo. No se ha detectado que la congelación de las muestras disminuya el aislamiento del VAE del semen de un semental portador. En situaciones en las que no sea factible determinar el estatus de portador del semental mediante el aislamiento vírico o por RT-PCR, podrá comprobarse mediante su apareamiento con dos yeguas seronegativas, en las cuales se comprobará si han seroconvertido frente al virus como muy tarde 28 días después de la monta (Timoney & McCollum, 1993).

No es posible determinar de manera fiable si es portador un semental tratado con antagonista de la GnRH o inmunizado con GnRH con el fin de modificar su actividad o comportamiento reproductor, ya que ello puede interrumpir temporalmente la eliminación del VAE.

#### 1.2.1. Procedimiento analítico

- i) Cuando las muestras de semen llegan al laboratorio, debe comprobarse si están congeladas, refrigeradas o a temperatura ambiente. Debe examinarse cada muestra para asegurarse de que contiene la fracción de la eyaculación rica en esperma. Algunos sementales pueden producir volúmenes grandes de plasma seminal antes de eyacular las fracciones del semen espermática y en gel. A menudo, esta fracción pre-espermática contiene muy poco esperma y puede ser negativa para el VAE aunque el semental sea portador del VAE (Timoney *et al.*, 1987). Para optimizar la detección del virus, deben transferirse 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra de semen a un porta, que se cubrirá con un cubreobjetos y se examinará al microscopio a 100x para determinar su contenido espermático. Los eyaculados con una media inferior a cinco espermatozoides por cada diez campos examinados debe considerarse que tienen un valor diagnóstico cuestionable. No obstante, vale la pena destacar que los sementales que en ocasiones son oligospermicos pueden ser positivos para el VAE incluso con un recuento espermático bajo. Por otra parte, si dan un resultado negativo para el virus, en el informe analítico de este tipo de semental deberá incluirse la observación de que no puede garantizarse la ausencia del VAE en base al bajo recuento espermático de la muestra enviada. Además, las muestras de eyaculado deben inspeccionarse visualmente, y debe registrarse su color y la posible presencia de contaminación por partículas macroscópicas. Si el espécimen de semen está contaminado con sangre, lo cual puede deberse a traumatismos en los genitales externos del semental durante la recogida, deberá pedirse otra muestra, ya que el análisis de tales muestras de un semental seropositivo puede comprometer la fiabilidad del resultado del aislamiento vírico debido a la presencia de anticuerpos contra el VAE en el suero. De manera muy infrecuente, un eyaculado puede tener un color amarillento debido a la contaminación por orina. Este tipo de muestras pueden ser positivas para el virus de la rinitis equina tipo A.
- ii) Aunque ya no se considere como un paso esencial, el pre-tratamiento del semen antes de su inoculación en cultivo celular mediante sonicación a corto plazo (en tres ciclos de 15 segundos) facilita el que la mezcla y la dispersión de la muestra sean eficaces.
- iii) Después de eliminar el medio de cultivo se inoculan monocapas confluentes de células RK-13 de 3–5 días, dispuestas en frascos de cultivo de tejidos de 25  $\text{cm}^2$  o en placas multipocillo, con diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ – $10^{-3}$ ) del plasma seminal en un

medio de mantenimiento para cultivo de tejidos que contenga suero fetal bovino al 2% y antibióticos. Se utiliza un inóculo de 1 ml en frascos de 25 cm<sup>2</sup> y se inoculan al menos dos frascos por cada dilución de plasma seminal. Cuando se utilizan placas con pocillos múltiples, se prorratea el tamaño del inóculo y el número de pocillos inoculados por dilución de la muestra. En cada prueba se deben incluir diluciones apropiadas de una muestra control de semen positivo para el virus o de un virus utilizado como control de título conocido diluido en el medio de cultivo.

- iv) Los frascos se cierran, se vuelven a colocar las cubiertas sobre las placas multipocillo y se rotan cuidadosamente para dispersar el inóculo sobre las monocapas celulares.
- v) Los cultivos inoculados se incuban a continuación durante 1 hora a 37°C en un incubador aeróbico o en un incubador con humedad y una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, dependiendo de si se emplean frascos o placas multipocillo.
- vi) Sin extraer el inóculo ni lavar la monocapa celular, se recubre esta última con medio que contiene carboximetil celulosa al 0,75% y antibióticos.
- vii) Los frascos o las placas se incuban de nuevo a 37°C y se analizan microscópicamente para comprobar si presentan ECP vírico, que por lo general se aprecia a los 2–6 días.
- viii) En ausencia de ECP visible, pasados 5 a 7 días los sobrenadantes de cultivo se vuelven a inocular en cultivos monocapas de células confluentes RK-13 de 3–5 días de edad. Después de eliminar el medio con el que se cubren, las monocapas se tiñen con una solución de cristal violeta tamponada con formalina al 0,1%<sup>4</sup>.

La identidad de cualquier cepa vírica aislada debe confirmarse por RT-PCR estándar o en tiempo real (Balasuriya *et al.*, 1998; 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003), por NV, inmunofluorescencia (Crawford & Henson, 1973), o por la técnica ABC, utilizando un antisuero monoespecífico anti-VAE o MAb frente a las proteínas estructurales N o GP5 del virus (Balasuriya *et al.*, 1998; Del, se prueban diluciones Piero, 2000; Little *et al.*, 1995).

En la prueba de neutralización unidireccional, diluciones decimales seriadas de la cepa vírica aislada se exponen a un antisuero neutralizante con MAb o monoespecífico preparado contra la cepa Bucyrus que es prototipo del VAE (ATCC VR 796) y también a un suero negativo para anticuerpos neutralizantes del virus. Como controles de la prueba se realizan las titulaciones correspondientes al virus prototipo Bucyrus con los mismos reactivos que contienen el anticuerpo de referencia. La prueba se realiza en frascos de 25 cm<sup>2</sup> para cultivo de tejidos o en placas multipocillo. Se inactivan durante 30 minutos cantidades apropiadas de reactivos positivos y negativos a anticuerpos frente al VAE en un baño a 56°C y se diluyen 1/4 en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2; a continuación, se distribuyen 0,3 ml del reactivo de anticuerpos diluido en cinco tubos para cepa problema. Se realizan diluciones decimales seriadas (10–1–10–5) de cada cepa vírica en MEM de Eagle que contenga suero fetal bovino al 10%, antibióticos y complemento de cobaya recién diluido al 10%. Luego se añaden 0,3 ml de cada dilución de virus a los tubos que contienen reactivos con y sin anticuerpos. Se agitan los tubos y la mezcla de virus y anticuerpos se incuba durante 1 hora a 37°C. Después, las mezclas se inoculan en cultivos confluentes en monocapa de células RK-13 de 3–5 días, en frascos de 25 cm<sup>2</sup> o en placas multipocillo, utilizando dos frascos o pocillos por cada dilución de virus. Cada frasco se inocula con 0,25 ml de la mezcla de virus y anticuerpos; cuando se utilizan placas multipocillo se prorratea el tamaño del inóculo. Los frascos o placas inoculadas se incuban 2 horas a 37°C, moviéndolas con cuidado cuando ha pasado la primera hora para dispersar el inóculo sobre la monocapa celular. Sin extraer el inóculo ni lavar las monocapas celulares, estas se recubren con medio que contiene carboximetil celulosa al 0,75% y se incuban 4–5 días a 37°C en una incubadora aerobia o en una incubadora con humedad y una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>. Después de eliminar el medio, las monocapas se tiñen con una solución de cristal violeta tamponada con formalina al 0,1%. Se cuentan las placas o calvas producidas, y se determina el título de infectividad del virus tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos anti-VAE utilizando el método de Spearman–Kärber. La confirmación de la identidad de una cepa se basa una reducción del recuento de placas de al menos 102 logs del virus en presencia del suero positivo para anticuerpos contra la cepa Bucyrus del VAE.

La inmensa mayoría de las cepas de VAE de sementales portadores se logra aislar en el primer pase en cultivo celular empleando el procedimiento analítico descrito (Timoney & McCollum, 1993). La existencia de citotoxicidad no vírica o de contaminación bacteriana en las muestras no es un problema importante cuando se trata de aislar este virus del semen de sementales. Si se observa citotoxicidad no vírica, normalmente aparece en las monocapas inoculadas con la dilución 10–1 del plasma seminal y de manera mucho menos frecuente, con la dilución 10–2. Para superar este problema se ha empleado con cierto éxito un tratamiento del plasma seminal con polietilenglicol (peso molecular de 6000) (Fukunaga *et al.*, 2000). El método descrito implica añadir polietilenglicol a las diluciones 10–1–

10–3 del plasma seminal hasta una concentración final del 10% para cada dilución. Las mezclas se mantienen una noche a 4°C con movimiento suave y después se centrifugan a 2.000 *g* durante 30 minutos, eliminándose el sobrenadante. Los precipitados se resuspenden en el medio de mantenimiento de los cultivos a la décima parte del volumen de las diluciones originales y las mezclas se homogenizan. A continuación, se centrifugan a 2.000 *g* durante 30 minutos y los sobrenadantes se toman y se usan para inoculación. No hay evidencias que indiquen que el pretratamiento del plasma seminal de este modo reduzca la sensibilidad del procedimiento para aislar el virus (Fukunaga *et al.*, 2000). Si la contaminación bacteriana de una muestra presenta algún problema, es preferible requerir la repetición de la recogida del semen del mismo semental. Si eso no es posible, puede intentarse el control de la contaminación mediante el pretratamiento de la muestra con un antibiótico que contenga medio de transporte para el virus, conservándolo toda la noche a 4°C y realizando a continuación la ultra-centrifugación o resuspensión del precipitado antes de diluir e inocular el espécimen en cultivo celular.

Se ha documentado la imposibilidad de aislar el VAE a partir de sementales cuyo semen era positivo para ácido nucleico del virus mediante según la RT-PCR. Al menos en un caso, la imposibilidad de detectar virus infeccioso puede muy bien haberse debido a un nivel muy alto de actividad neutralizante en el plasma seminal del semental, lo cual refuerza la utilidad de la RT-PCR como prueba complementaria al aislamiento vírico para la detección del VAE.

### 1.3. Detección del antígeno

Cuando se asocia mortalidad a un brote sospechoso de AVE, debe examinarse una amplia variedad de tejidos para comprobar si presentan signos histológicos de panvasculitis, que es especialmente destacada en las arterias y vénulas pequeñas de todo el organismo, sobre todo en el ciego, el colon, el bazo, glándulas linfáticas asociadas y la corteza suprarrenal (Crawford & Henson, 1973; Del Piero, 2000; Jones *et al.*, 1957). La presencia de una arteritis necrotizante diseminada que afecta a las células del endotelio y mediales de los vasos afectados se considera un rasgo patognomónico de la AVE. Sin embargo, las lesiones vasculares características presentes en el animal adulto no son un rasgo predominante en muchos casos de aborto relacionado con el VAE.

El antígeno VAE puede identificarse en distintos tejidos de animales afectados por la AVE, tanto en presencia como en ausencia de lesiones (Del Piero, 2000). Se han detectado antígenos en pulmón, corazón, hígado y bazo, así como en placentas de fetos abortados (Del Piero, 2000). También se ha estudiado el examen inmunohistoquímico de biopsias de piel como mecanismo de confirmación de la infección aguda por el VAE. Aunque tiene cierta utilidad, no es del todo fiable para el diagnóstico de esta enfermedad. El antígeno vírico se puede detectar en el citoplasma de células infectadas mediante inmunofluorescencia empleando suero anti-VAE policlonal equino conjugado (Crawford & Henson, 1973), o mediante la técnica ABC, empleando MAb de ratón contra las proteínas GP5 o N del virus (Del Piero, 2000).

### 1.4. Métodos moleculares

La RT-PCR estándar en dos pasos, la RT-PCR de un solo paso, la RT-PCR anidada y la RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) son cada vez más aceptadas y utilizadas como alternativa o como prueba complementaria al aislamiento vírico en cultivo celular para la detección del VAE en el material de diagnóstico. Las pruebas basadas en la RT-PCR proporcionan un medio de identificación del ARN específico del virus en muestras clínicas; en concreto, filtrados de hisopos nasofaríngeos o nasales, capas leucocitarias, semen fresco y extendido, orina, y muestras de tejido obtenidas post mórtem (Balasuriya *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003). Se han elaborado y evaluado la RT-PCR estándar, la RT-PCR anidada (RT-nPCR) y una rRT-PCR de TaqMan® en un solo tubo para la detección de distintas cepas del virus en líquido de cultivo de tejidos, semen y secreciones nasales (Balasuriya *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003). Estas pruebas van dirigidas a seis marcos abiertos de lectura (ORF) diferentes en el genoma del VAE (los ORF 1b, 3–7). Sin embargo, existe una variación considerable en la sensibilidad y especificidad de las RT-PCR que incorporan diferentes pares de cebadores dirigidos a varios ORF. Se han obtenido resultados comparables a los del aislamiento vírico con algunas –pero no con todas– la RT-PCR estándar de un paso, la RT-PCR en dos pasos, la RT-nPCR o la rRT-PCR TaqMan® en un solo tubo (Balasuriya *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011). Si las comparamos con el tradicional aislamiento vírico, estas pruebas basadas en la RT-PCR son frecuentemente más sensibles y considerablemente más rápidas de realizar, pues la mayor parte requieren menos de 24 horas para su realización. Además, las RT-PCR tienen la ventaja de no requerir virus viables para su realización. La rRT-PCR en un solo tubo para el VAE constituye un método simple, rápido y fiable para la detección e identificación del ácido nucleico del virus en el semen y el líquido de cultivo de tejido equino (Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011). No obstante, existen indicios de que el tipo de kit comercial utilizado para la

extracción del ácido nucleico y también para la amplificación puede influir en gran medida en la sensibilidad y robustez diagnósticas generales de la prueba (Miszcak *et al.*, 2011). Esto se puso de manifiesto empleando un método de extracción de ácido nucleico basado en perlas magnéticas, junto con kits comerciales de RT-PCR específicos. La rRT-PCR en un solo tubo tiene las siguientes ventajas importantes respecto a la RT-PCR estándar en dos pasos: 1) se elimina la posibilidad de la contaminación cruzada entre muestras por productos previamente amplificados, puesto que el tubo que contiene la muestra nunca se abre; y 2) disminuye la posibilidad de falsos positivos porque el producto de la rRT-PCR se detecta con una sonda específica de secuencia. Sin embargo, debido a la gran sensibilidad de la RT-PCR, y en ausencia de precauciones adecuadas en el laboratorio, es posible la contaminación cruzada entre las muestras, provocando de este modo falsos positivos. Por ejemplo, la RT-nPCR, a la vez que proporciona una mayor sensibilidad para la detección del VAE, también aumenta la posibilidad de falsos positivos (6). El riesgo de contaminación es mayor cuando se utiliza la prueba RT-nPCR porque el segundo paso de amplificación por PCR incluye el producto de la primera RT-PCR. A fin de minimizar el riesgo de contaminación cruzada, debe tenerse sumo cuidado, sobre todo durante los pasos de extracción de ARN y la preparación de la reacción. Deben incluirse en cada prueba RT-PCR moldes positivos y negativos de control y cuando resulte adecuado, ácido nucleico extraído del líquido de cultivo de tejido de células sanas. Así pues, en la mayoría de circunstancias, la utilización de la RT-PCR de un paso o la rRT-PCR en tubo único puede ayudar a evitar los problemas relativos a la contaminación cruzada.

La selección de los cebadores es crucial para la sensibilidad de la prueba RT-PCR, siendo preferible utilizar los cebadores (y la sonda en el caso de la prueba rRT-PCR) diseñados preferentemente a partir de la región más conservada del genoma o genomas del VAE. El análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos ha puesto de manifiesto que el ORF 1b (codifica la polimerasa vírica), el ORF 6 (Proteína M) y el 7 (proteína N) están más conservados que el resto de los ORF entre las cepas del VAE analizadas hasta ahora y procedentes de América del Norte y de Europa (Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Miszcak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003). El gen más conservado entre las diferentes cepas del VAE es el ORF7, y con los cebadores específicos para la ORF7 (así como la sonda para la rRT-PCR) se ha detectado una variedad de cepas del virus de origen norteamericano y europeo (Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007). Es más, el uso de muchos pares de cebadores específicos de los ORF 1b ([directo: 5'-GAT-GTC-TAT-GCT-CCA-TCA-TT-3' e inverso: 5'-GGC-GTA-GGC-TCC-AAT-TGA-A-3']) y/o [directo: 5'-CCT-GAG-ACA-CTG-AGT-CGC-GT-3' e inverso 5'-CCT-GAT-GCC-ACA-TGG-AAT-GA-3']) (Gilbert *et al.*, 1997), el ORF 6 ([directo: 5'-CTG-AGG-TAT-GGG-AGC-CAT-AG-3' e inverso: 5'-GCA-GCC-AAA-AGC-ACA-AAA-GC-3']) (51) y el ORF 7 ([directo 5'-ATG-GCG-TCA-AGA-CGA-TCA-CG-3' e inverso 5'-AGA-ATA-TCC-ACG-TCT-TAC-GGC-3']) aumenta de forma significativa la posibilidad de detectar las cepas del VAE norteamericano y europeo mediante la RT-PCR. Los dos pares de cebadores específicos del ORF 1b son adecuados para su uso en una rRT-PCR (Gilbert *et al.*, 1997). Si bien se ha encontrado que la RT-PCR es muy sensible para la detección del ácido nucleico del virus en semen fresco, existen pruebas de que no es tan fiable cuando se aplica con semen conservado mediante congelación o de muy baja infectividad vírica (Zhang *et al.*, 2004).

Además de las citadas pruebas RT-PCR, se han descrito dos rRT-PCR TaqMan® en un solo tubo y basadas en el uso de sondas fluorogénicas para la detección del ácido nucleico del VAE (Balasuriya *et al.*, 2002); cebadores ([directo: 5'-GGC-GAC-AGC-CTA-CAA-GCT-ACA-3', inverso: 5'-CGG-CAT-CTG-CAG-TGA-GTG-A-3']) y sonda [5'FAM-TTG-CGG-ACC-CGC-ATC-TGA-CCA-A-TAMRA-3'] (Westcott *et al.*, 2003); cebadores [directo: 5'-GTA-CAC-CGC-AGT-TGG-TAA-CA-3', inverso: 5'-ACT-TCA-ACA-TGA-CGC-CAC-AC-3'] y sonda [5'FAM-TGG-TTC-ACT-CAC-TGC-AGA-TGC-CGG-TAMRA-3']). No obstante, debe advertirse que la variación genómica dentro de las cepas naturales del VAE puede disminuir la sensibilidad de las pruebas RT-PCR y rRT-PCR, incluso en el caso de que los cebadores y las sondas se hayan desarrollado a partir de la región más conservada del genoma del VAE (ORF 7 [Lu *et al.*, 2007]). En estudios filogenéticos de cepas del VAE de ciertas regiones/países se ha confirmado la existencia de agrupaciones de cepas más estrechamente emparentadas entre ellas que con cepas víricas de puntos geográficos muy alejados (Mankoc *et al.*, 2007). En estas circunstancias, para la detección de estas cepas del VAE genómicamente bien diferenciadas puede ser más adecuado utilizar cebadores validados que los ya recomendados.

Al no existir un consenso generalizado respecto a un juego de cebadores universalmente admitido para la detección del VAE, y puesto que no se puede determinar la infectividad real de una muestra con ninguna de las pruebas RT-PCR, se aconseja el uso conjunto del aislamiento del virus junto con las pruebas RT-PCR o rRT-PCR para identificarlo en muestras tomadas en animales enfermos o post mortem, y cuando esté indicado, para el análisis genómico o fenotípico de cepas víricas.

Se han clasificado cepas del VAE aisladas de diferentes regiones del mundo en grupos filogenéticos mediante el análisis de secuencias de los genes de las proteínas de envoltura GP3, GP5 y M (los ORF 3, 5 y 6 respectivamente) y del gen de la proteína de la nucleocápsida (N) (ORF 7 [Balasuriya *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010]). Se ha observado que el gen de la proteína GP5 es el más útil y fiable para

ese propósito (8, 54, 65). Las relaciones entre las cepas observadas mediante la secuenciación de nucleótidos constituyen un instrumento molecular epidemiológico de utilidad para llegar al origen de brotes de AVE (Balasuriya *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010).

## 2. Pruebas serológicas

Se ha estudiado la capacidad de varias pruebas serológicas de detectar anticuerpos contra el VAE, como la neutralización (microneutralización [Senne *et al.*, 1985], y reducción de placas o calvas [McCullum, 1970]), la prueba de la fijación del complemento (FC) (Fukunaga & McCollum, 1977), la inmunofluorescencia indirecta (Crawford & Henson, 1973), la inmunodifusión en gel de agar (Crawford & Henson, 1973), el ELISA (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000) y el inmunoanálisis de microesferas fluorescentes (MIA) (Go *et al.*, 2008).

Es importante destacar que hasta ahora solo se ha reconocido un serotipo principal del VAE, representado por la cepa prototipo Bucyrus (ATCC VR 796) (McCullum, 1970; Timoney & McCollum, 1993). Mediante protocolos convencionales de inmunización se han preparado en caballos y en conejos antisueros anti-VAE no purificado. Además, se han desarrollado en ratón anticuerpos monoclonales y en conejo anticuerpos monoespecíficos contra la proteína de la nucleocápsida (N), la glicoproteína principal de la envoltura (GP5) y la proteína de la envoltura no glicosilada (M) del VAE (Balasuriya *et al.*, 1997).

### 2.1. Prueba de la microneutralización potenciada con complemento

La microneutralización potenciada con complemento es actualmente la prueba más utilizada a nivel internacional para el diagnóstico de la infección por el VAE, para llevar a cabo estudios de seroprevalencia y para analizar caballos y determinar si pueden ser desplazados. También se ha utilizado para analizar sangre de corazón fetal como medio de diagnóstico retrospectivo de casos de abortos relacionados con la AVE. Los anticuerpos neutralizantes contra el VAE persisten varios años tras la infección natural o la vacunación con la vacuna viva modificada contra el VAE (Timoney & McCollum, 1993).

### 2.2. Prueba de la neutralización del virus

La NV se utiliza para fines de diagnóstico para confirmar la infección en casos/brotes sospechosos de AVE y para determinar en caballos, como por ejemplo sementales, si presentan infección por el VAE. El procedimiento analítico de la NV de uso más difundido es el desarrollado por los Laboratorios del Servicio Nacional Veterinario del Departamento de Agricultura de los EE. UU. (Senne *et al.*, 1985). Es importante obtener una muestra de sangre estéril para evitar que la contaminación bacteriana interfiera en el resultado de la prueba. Se recomienda realizar la prueba en células RK-13 utilizando como virus de referencia la cepa aprobada CVL-Bucyrus (Weybridge)<sup>5</sup> (Edwards *et al.*, 1999). La historia completa de pases de la cepa CVL (Weybridge) no está documentada aunque deriva originalmente de la cepa Bucyrus prototipo del virus. Se cultivan stocks del virus de referencia en la línea celular RK-13, se clarifican eliminando los detritos celulares mediante centrifugación a velocidad baja y se guardan en alícuotas a -70°C. Se descongelan varias alícuotas congeladas y se determina la infectividad del virus stock mediante titulación en células RK-13. La sensibilidad de la prueba de la NV para detectar anticuerpos anti-VAE está muy influenciada por varios factores, especialmente por el origen y la historia de pases de la cepa vírica utilizada (Edwards *et al.*, 1999). La cepa CVL-Bucyrus (Weybridge) y la cepa vacunal MLV muy atenuada del VAE son de sensibilidad semejante para detectar sueros positivos de título bajo, especialmente en caballos vacunados contra AVE. Se continúan realizando esfuerzos para lograr una mayor uniformidad en el protocolo de la prueba y los resultados serológicos entre los laboratorios que utilizan la prueba NV u otras pruebas serológicas comparables para esta infección. Se dispone de Sueros Estándar Aprobados por la OIE para el VAE6, que pueden facilitar la estandarización, a nivel internacional, de la prueba de la microneutralización y del ELISA.

#### 2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Los sueros se inactivan mediante un baño de 30 minutos en agua a 56°C (sueros control, solamente una vez)

---

5 Puede obtenerse el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Arteritis viral equina, en el Reino Unido (para los datos de contacto, consúltese la página web de la OIE <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

6 Puede obtenerse el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Arteritis viral equina, en EE.UU., (para los datos de contacto, consúltese la página web de la OIE: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

- ii) En placas de microtitulación para cultivo celular con 96 pocillos de fondo plano, se realizan diluciones a la mitad seriadas del suero problema inactivado (volúmenes de 25 µl) con medio de cultivo libre de suero, comenzando con la dilución a 1/2 y utilizando filas duplicadas de pocillos para cada suero problema. La mayoría de los sueros se analizan inicialmente a dilución 1/4 y 1/8 (dilución final del suero, después de añadir a cada pocillo un volumen igual de la dilución apropiada del stock de virus). Las muestras positivas a la dilución 1/8 se pueden volver a comprobar, si se desea, y titularse por determinación por punto final. Deben incluirse en cada prueba controles individuales de suero, así como controles negativos y positivos de título conocido alto y bajo.
- iii) Se prepara una dilución del stock de virus que contenga de 100 a 300 DICT<sub>50</sub> (dosis infectiva en el 50% del cultivo de tejidos) por 25 µl utilizando como diluyente medio de cultivo celular sin suero que contenga antibióticos y complemento fresco de cobaya o de conejo a una concentración final del 10%.
- iv) A cada pocillo con 25 µl de cada dilución de suero se añaden 25 µl de la dilución apropiada del stock de virus, excepto en los pocillos de suero control respecto a la toxicidad y en los pocillos control respecto a células de cada placa.
- v) Se incluye una titulación por retroceso de la dilución de trabajo del stock de virus, utilizando cuatro pocillos por cada dilución decimal, para confirmar la validez de los resultados de la prueba.
- vi) Se cubren las placas y se agitan suavemente para facilitar la mezcla suero/virus.
- vii) Las placas se incuban durante 1 hora a 37°C en una atmósfera húmeda enriquecida con un 0,5% de CO<sub>2</sub>.
- viii) Se prepara una suspensión de células RK-13 de cultivos de 3–5 días cuya concentración asegure la formación de monocapas confluentes en los pocillos de las placas de microtitulación en un plazo máximo de 18–24 horas tras la siembra.
- ix) A cada pocillo se añaden 100 µl de la suspensión celular, se cubren las placas con sus tapas o se sellan con cinta aislante y se agitan suavemente.
- x) Se incuban las placas a 37°C en una atmósfera húmeda de 0,5% de CO<sub>2</sub> en aire.
- xi) Se comprueba microscópicamente si las placas presentan ECP no vírico a las 12–18 horas, y si presentan ECP vírico a las 48–72 horas tras la incubación. La validez de la prueba se confirma estableciendo que la dilución de trabajo del stock de virus contenía de 30–300 DICT<sub>50</sub> y que los sueros control positivos están dentro de un intervalo de  $\pm 0,3$  unidades logarítmicas decimales respecto a títulos predeterminados.

Una solución de suero se considera positiva si hay una reducción del 75% o superior en la cantidad de ECP vírico en los pocillos del suero problema en comparación con el que se presenta en los pocillos control con la dilución más baja de virus. A continuación se calculan los puntos finales de titulación por el método de Spearman–Kärber. Un título de  $\frac{1}{4}$  o superior se considera positivo. Un suero negativo debe mostrar solo trazas (menos del 25%) o ninguna neutralización vírica a la dilución más baja analizada. A veces, los títulos de anticuerpos pueden ser difíciles de definir si se observa una neutralización parcial en varias diluciones del suero. No es infrecuente encontrarse con que los sueros causen cambios tóxicos a las diluciones más bajas. En tales casos puede ser imposible establecer si la muestra es negativa o positiva con bajo título. El problema puede resolverse volviendo a analizar la muestra tóxica en placas de microtitulación con monocapas confluentes de células RK-13 sembradas el día anterior. Además, la toxicidad del suero puede reducirse o eliminarse en algunos casos si la muestra se adsorbe a una suspensión concentrada de células RK-13 antes de la prueba o mediante la sustitución de complemento de cobaya por el de conejo en el disolvente del virus. Parece ser que hay más de un tipo de citotoxicidad en los sueros. En la evaluación de sueros que originan citotoxicidad no vírica se debe tener en cuenta el estado de vacunación contra herpesvirus equinos. Se ha demostrado que una de las vacunas contra los herpesvirus equinos disponible actualmente en Europa puede estimular a los anticuerpos contra células de riñón de conejo utilizadas en la fabricación de vacunas. Estas, a su vez, pueden producir citotoxicidad, normalmente en diluciones de suero de 1/4 y/o 1/8, aunque a veces a diluciones superiores, y causar dificultades en la interpretación de los resultados de la prueba (Newton *et al.*, 2004).

### 2.3. Enzimoimmunoanálisis

Para detectar anticuerpos anti-VAE se han desarrollado varios ELISA directos o indirectos (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000). Estos se basan en la utilización de antígenos víricos derivados de virus purificados o recombinantes. La utilidad de las pruebas iniciales estaba limitada por la frecuencia falsos positivos, que se asociaban con la presencia de anticuerpos contra varios antígenos de los cultivos de tejidos en los sueros de caballos que habían sido vacunados

con antígenos derivados de cultivos de tejidos. El descubrimiento del importante papel de la proteína GP5 en la estimulación de la respuesta inmunitaria humoral contra el VAE condujo al desarrollo de varios ELISA que emplean una porción de ella, o la proteína recombinante completa producida en un sistema de expresión bacteriano o de baculovirus (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha utilizado un péptido sintético conjugado con ovoalbúmina que presenta los aminoácidos 81–106 de la proteína GP5 (Nugent *et al.*, 2000). Algunas de estas pruebas parecen presentar una sensibilidad y especificidad casi idénticas a las de la prueba NV y pueden detectar anticuerpos anti-VAE antes de que se pueda obtener una reacción positiva en la NV. Sin embargo, en algunas de estas pruebas pueden producirse falsos negativos. El análisis al azar de una batería de péptidos fágicos con sueros policlonales de caballos infectados por el VAE permitió la identificación de ligandos, que se purificaron y emplearon como antígenos en un ELISA para el VAE. Sin embargo, no se encontró correlación entre los valores de absorbancia obtenidos con esta prueba y los títulos de anticuerpos neutralizantes, lo que indica que los anticuerpos detectados estaban dirigidos fundamentalmente contra epítomos no superficiales del virus. Un ELISA basado en el uso combinado de las proteínas estructurales GP5, M o N del VAE, expresadas por baculovirus recombinantes, detectó con éxito los anticuerpos en caballos infectados natural o experimentalmente, pero no en animales vacunados contra la AVE (Hedges *et al.*, 1998). Respecto a cualquier ELISA para VAE basado en la proteína GP5 es muy importante considerar el hecho de que la sensibilidad de la prueba varía en función de la secuencia del dominio o región superficial de esta proteína vírica que se utilice en el análisis. Entre cepas del VAE se ha encontrado una considerable variación en la secuencia de aminoácidos de este dominio. Para aumentar la sensibilidad de un ELISA basado en GP5, puede ser necesario incluir varias secuencias del dominio superficial que representen cepas conocidas del VAE fenotípicamente distintas en vez de depender de una única secuencia superficial. Otros dos ELISA de descripción más reciente parecen ofrecer un diagnóstico más prometedor y fiable de las infecciones por el VAE (Cho *et al.*, 2000; Nugent *et al.*, 2000). Se ha descrito un ELISA bloqueante que utiliza MAbs producidos contra la proteína GP5 con una sensibilidad del 99,4% y una especificidad del 97,7% en comparación con la prueba NV (Cho *et al.*, 2000). Otra prueba, que es un ELISA con un péptido sintético de GP5 conjugado a ovoalbúmina, tiene una sensibilidad y especificidad del 96,75% y 95,6%, respectivamente, utilizando una referencia de 400 sueros positivos por NV y 400 muestras negativas por NV (Nugent *et al.*, 2000). De los ELISA desarrollados (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000), pocos se han validado exhaustivamente como la prueba de la NV, si es que alguno se ha llegado a validar, aunque algunos parecen ofrecer una sensibilidad y especificidad casi comparables (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000). Es importante destacar que, a diferencia de la NV, una reacción positiva en el ELISA no necesariamente refleja el estado inmunitario protector de un caballo determinado contra el VAE, ya que intervienen anticuerpos tanto no neutralizantes como neutralizantes.

#### 2.4. Prueba de la fijación del complemento

La prueba de la FC se ha utilizado en el pasado para el diagnóstico de infección reciente por el VAE, basada en el hecho de que los anticuerpos que fijan el complemento tienen una vida relativamente corta (Fukunaga & McCollum, 1977). Esta prueba se ha reemplazado en gran medida por la de la NV y distintos ELISA para llevar a cabo estudios de serovigilancia y para determinar si los caballos pueden ser desplazados.

#### 2.5. Inmunoanálisis de microesfera fluorescente

Se ha desarrollado esta técnica para detectar anticuerpos equinos contra las principales proteínas estructurales del VAE (Go *et al.*, 2008). Se basó en clonar y expresar la longitud total de determinadas proteínas principales (GP5, M, N), así como secuencias parciales de cada proteína estructural, e incluirlas en pruebas separadas. Los distintos inmunoanálisis se analizaron con un instrumento Luminex. Una prueba basada en la proteína GP5 parcial aportó los mejores resultados, con valores de sensibilidad y de especificidad del 92,6% y del 93,0%, respectivamente, respecto a la prueba de la NV.

### C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

#### 1. Antecedentes

Se han desarrollado contra el VAE varias vacunas experimentales y comerciales. En la actualidad hay dos vacunas disponibles comercialmente y ambas derivan de cultivos celulares. La primera es una vacuna con virus vivo modificado (MLV) y la segunda, una vacuna adyuvantada inactivada. La vacuna MLV está a la venta en EE.UU. y en Canadá. También se ha utilizado bajo control ministerial en Argentina y en Nueva Zelanda. La vacuna inactivada se ha autorizado para su uso comercial en algunos países europeos, como Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Irlanda, Suecia y el Reino Unido. Las indicaciones de uso de estas vacunas son la

prevención de botes de AVE, incluido el aborto en yeguas gestantes y el establecimiento del estado de portador en el semental. Dado que el semental portador se considera el principal reservorio del VAE, la reducción en la población portadora con el tiempo daría lugar a un mayor control de la AVE y terminaría por contribuir a erradicar la enfermedad en ciertos países. La vacuna MLV se prepara con virus atenuado para caballos después de múltiples pases en cultivos primarios de células de caballo y de conejo y en una línea de células dérmicas equinas (Doll *et al.*, 1968; McCollum, 1970). Esta vacuna está autorizada para uso en sementales, yeguas no gestantes y caballos no reproductores. Aunque los caballos no reproductores se pueden vacunar en cualquier época, los sementales y las yeguas deben vacunarse como muy tarde 3 semanas antes de la reproducción. No se recomienda utilizar la vacuna en yeguas gestantes, especialmente en los últimos 2 meses de la gestación, ni en potros menores de 6 semanas a menos que exista un riesgo importante de exposición a la infección natural.

La segunda vacuna comercializada contra la AVE es un producto inactivado que se prepara con virus cultivado en cultivo de células de caballo, que se filtra, se inactiva químicamente y se combina a continuación con un adyuvante metabolizable. La vacuna está autorizada para su aplicación en caballos reproductores y no reproductores. A falta de datos apropiados sobre su seguridad, no se recomienda en la actualidad para utilización en yeguas gestantes.

En Japón se ha desarrollado otra vacuna inactivada contra la AVE, que se guarda almacenada para su distribución en caso de que se produzca un brote de AVE en ese país. Es una vacuna acuosa inactivada con formalina que se ha demostrado que es segura y eficaz en caballos reproductores y no reproductores. Para una inmunización óptima con esta vacuna, los caballos necesitan una fase inicial de dos inyecciones a intervalos de 4 semanas, con una dosis de refuerzo administrada cada 6–12 meses. Como la vacuna no está comercializada actualmente, no se suministran detalles acerca de su producción.

## 2. Resumen de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

### 2.1. Características del inóculo

Las vacunas comerciales, tanto basadas en MLV como inactivadas, derivan de la cepa prototipo Bucyrus del VAE (ATCC VR 796), una variante derivada experimentalmente de una cepa aislada en pulmón fetal que se obtuvo durante un brote extenso de enfermedad respiratoria y abortos que tuvo lugar cerca de Bucyrus, Ohio, EE.UU., en 1953 (Doll *et al.*, 1957). Las pruebas apuntan a la existencia de un único serotipo principal de virus, y la variación entre cepas no se considera importante en relación con la eficacia de las vacunas (McCollum, 1970; Timoney & McCollum, 1993).

#### 2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

En el caso de la vacuna con MLV, el virus prototipo (ATCC VR 796) se atenuó por pases seriados en cultivos primarios de riñón de caballo (HK-131), riñón de conejo (RK-111), y una línea celular diploide de la dermis de caballo, ATCC CCL57 (ECID-24) (Doll *et al.*, 1968; McCollum, 1970). Las indicaciones de empleo de esta vacuna señalan que el virus es seguro e inmunogénico entre los pases 80 y 111 en células primarias de riñón de conejo (Doll *et al.*, 1968; McCollum, 1970).

La vacuna inactivada y con adyuvante se prepara a partir de una cepa prototipo Bucyrus del VAE no atenuada (ATCC VR 796) que se ha purificado en placas al cuarto pase seriado en línea celular diploide de la dermis de caballo (ECID-24). Después de crecer en cultivo celular, el virus se purifica por filtración antes de ser inactivado químicamente y de añadir el adyuvante.

El virus de las vacunas que contengan MLV o inactivadas debe crecer en un sistema estable de cultivos celulares, como las células de dermis de caballo, con un medio apropiado que se suplementa con suero bovino estéril o con albúmina sérica bovina como sustituto del suero bovino en el medio de cultivo. Las monocapas celulares deben lavarse antes de la inoculación del virus para eliminar las trazas del suero bovino. En 2–3 días debe obtenerse un crecimiento vírico extenso que se manifiesta por la aparición de alteraciones citopáticas en el 80–100% de las células. Se mantienen lotes del virus del inóculo primario para cada vacuna en nitrógeno líquido o su equivalente.

#### 2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Las pruebas de esterilidad, pureza y ausencia de agentes extraños en las vacunas se encuentran en el Capítulo 1.1.9. *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.*

### 2.1.3. Validación como cepa vacunal

Tanto en el caso de las vacunas con MLV como en el de las inactivadas, las respectivas cepas víricas deben cultivarse en un sistema de cultivo celular apropiado que se haya aprobado oficialmente para producción de vacuna y que se haya confirmado que está libre de bacterias, hongos, micoplasmas y virus ajenos (Moore, 1986). La identidad del virus vacunal en el inóculo primario debe confirmarse mediante la neutralización con un suero homólogo anti-VAE. Se ha documentado científicamente la neutralización incompleta del VAE con antisueros homólogos de caballo o de conejo (Moore, 1986; Senne *et al.*, 1985) y constituye un problema para determinar si el inóculo primario contiene virus ajenos y para confirmar la identidad del virus vacunal. El problema se ha evitado rebajando el título de infectividad del inóculo primario por debajo del requerido para la producción de inóculo vírico antes de realizar la prueba de neutralización en el virus diluido. Se comprueba si las mezclas de virus y suero contienen virus vivos residuales por pases seriados en cultivo celular. No debe encontrarse evidencia de virus citopáticos, virus hemoadsorbentes ni cepas no citopáticas del virus de la diarrea bovina al intentar aislar los virus en cultivo celular. Si se utilizan células de origen equino, debe comprobarse que están libres del virus de la anemia infecciosa equina. Para determinar la presencia de agentes accidentales, ahora es más habitual utilizar tecnologías convencionales, como PCR y ELISA de captura de antígeno, que el aislamiento del virus.

## 2.2. Método de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

Tanto la vacuna con MLV como la inactivada se producen mediante el cultivo de los inóculos víricos respectivos en un sistema celular de dermis de caballo. Antes de la inoculación con el virus de siembra las monocapas celulares deben lavarse para eliminar restos de suero bovino del medio de cultivo. Los cultivos inoculados deben mantenerse en un medio de mantenimiento adecuado. La recogida de los cultivos infectados debe efectuarse cuando el ECP característico afecta a casi toda la monocapa celular. Se recoge el sobrenadante y las células, y se clarifica la preparación mediante filtración de los restos celulares y el material no deseado. En el caso de la vacuna inactivada, el virus purificado se inactiva después químicamente y se añade un adyuvante metabolizable. Los conservantes que se añaden a las vacunas con MLV e inactivadas son neomicina, polimicina B y anfotericina B.

### 2.2.2. Requisitos para los ingredientes

En el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias* se indican cuáles son los productos de origen biológico de riesgo insignificante.

### 2.2.3. Controles durante el proceso

Tanto las vacunas con el MLV como las inactivadas deben producirse en una línea celular estable cuya identidad y ausencia de bacterias, hongos, micoplasmas y otros agentes contaminantes se haya determinado y confirmado. Además de la prueba previa realizada en el virus del inóculo primario para cada vacuna y línea celular, en la que se determina la presencia de sustancias contaminantes accidentales, debe comprobarse si los cultivos celulares infectados con los respectivos virus vacunales presentan signos macroscópicos de crecimiento microbiano u otra contaminación extraña durante el periodo de incubación. Si no se puede determinar con seguridad el crecimiento en un recipiente por inspección visual, se deben realizar subcultivos, examen microscópico, o ambas cosas.

### 2.2.4. Pruebas en lotes del producto final

#### i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se presentan en el capítulo 1.1.9. Tanto en el caso de las vacunas con MLV como en el de las vacunas inactivadas, cada lote de producción de vacuna debe ser sometido a pruebas de contaminación por bacterias, hongos o micoplasmas.

#### ii) Inocuidad

Debe comprobarse la seguridad de la vacuna mediante la inoculación intramuscular de al menos dos caballos seronegativos para anticuerpos neutralizantes contra el VAE, cada uno con una dosis de virus liofilizado (Moore, 1986). Ninguno de los caballos debe presentar ningún signo clínico de enfermedad distinto de una pirexia leve durante un periodo de observación de 2 semanas. Es posible que aparezcan reacciones locales

transitorias en menos de un 10% de los caballos inoculados con cualquiera de las vacunas. Además, deben obtenerse hisopos nasofaríngeos a diario de cada caballo para intentar el aislamiento del virus; también se debe determinar diariamente la fórmula leucocitaria y la temperatura corporal. Después de la vacunación no deben aparecer signos febriles ni hematológicos significativos (Timoney & McCollum, 1993). Ocasionalmente, se puede observar en el caballo vacunado una excreción limitada de virus vacunal por el tracto respiratorio y por el semen que no supera los 7 días de duración. Tras la vacunación del semental no hay evidencias de la persistencia del virus de la vacuna en el tracto reproductivo (Timoney & McCollum, 1993).

Para asegurar una inactivación completa del virus vacunal, en cada serie de lotes de vacuna inactivada debe comprobarse si contiene virus viables, mediante tres pases seriados en células de la dermis del caballo y por inmunofluorescencia directa marcando con el conjugado específico para el VAE antes de añadir el adyuvante. Esto debe ir seguido de pruebas de inocuidad en cobayas y ratones.

iii) Potencia del lote

La potencia de la vacuna en los contenedores o recipientes finales se determina mediante pruebas de infectividad en las que se averigua si se forman placas en monocapas cultivadas de células de la dermis del caballo y por una prueba de exposición a la vacuna (Moore, 1986). La vacuna debe comprobarse en cultivo celular por triplicado, calcularse el título infectivo medio, y determinarse el contenido en dosis teniendo en cuenta que cada dosis de vacuna debe contener un mínimo de  $3 \times 10^4$  unidades formadoras de placas del VAE atenuado. La potencia in vivo de la vacuna con el MLV o inactivada se estima mediante una única prueba de exposición a la vacuna en 17–20 caballos vacunados y en 5–7 caballos control o en dos pruebas cada una de las cuales comprende diez vacunados y cinco controles no vacunados. La concentración de antígeno vírico en la vacuna inactivada es superior a mil veces la concentración del antígeno vírico presente en la vacuna con el MLV.

## 2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

### 2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de la vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación de la vacuna y al departamento de control de calidad. Esta información debe facilitarse para tres lotes consecutivos con un volumen no inferior a 1/3 del volumen del lote industrial habitual.

### 2.3.2. Requisitos de seguridad

El fabricante de la vacuna con MLV recomienda la administración de una dosis única de vacuna por vía intramuscular en el caso de la vacunación primaria, seguida de una revacunación anual. La pauta vacunal recomendada para la vacuna inactivada, que también debe administrarse por vía intramuscular, es un ciclo primario de dos vacunaciones aplicadas con una diferencia de 3–6 semanas, seguido de una revacunación cada 6 meses.

i) Seguridad en animales de destino y no de destino

La vacuna con MLV se considera segura en sementales y yeguas no gestantes. No hay indicios de que el virus vacunal pueda establecer el estado de portador en el semental vacunado. La vacuna con el MLV no se recomienda en yeguas gestantes ni en potros de menos de 6 semanas de edad. Aunque en yeguas gestantes que se encuentren en los dos primeros trimestres de la gestación está contraindicada por el fabricante, esta vacuna se ha utilizado en estos casos sin observar consecuencias negativas. Existe riesgo de aborto en yeguas vacunadas dentro de los dos últimos meses de la gestación. La vacuna inactivada es segura tanto en animales no reproductores como en reproductores. A falta de datos adecuados sobre seguridad, actualmente esta vacuna no se recomienda para su uso en yeguas gestantes.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas vivas atenuadas y consideraciones medioambientales

Ni en los estudios experimentales ni en los de campo llevados a cabo desde que la vacuna con el MLV se empezó a comercializar en 1985 se ha observado reversión a la virulencia ni recombinación con cepas naturales del VAE (Timoney & McCollum, 1993).

iii) Precauciones

El fabricante de vacunas tanto con MLV como inactivadas aporta información suficiente en los respectivos prospectos de las vacunas sobre el empleo recomendado de cada una, incluidas ciertas contraindicaciones en el caso de la vacuna con MLV. Ninguna de ambas vacunas resulta perjudicial para el personal que las administra.

**2.3.3. Requisitos de eficacia**

Se ha comprobado la eficacia de la vacunación (estudios de exposición) tanto de vacunas con MLV como de vacunas inactivadas. Estos estudios han consistido en la exposición, por vía respiratoria, de un grupo de caballos vacunados por primera vez 4 semanas después de la inmunización primaria, con la cepa virulenta prototipo Bucyrus del VAE. El nivel de inmunidad protectora generado por la vacunación se evaluó en base a la imposibilidad de causar signos clínicos de la AVE en los caballos expuestos o a una reducción considerable de la gravedad de la enfermedad en comparación con la observada en los controles no vacunados. La eficacia de la vacunación en la prevención del establecimiento del estado de portador en sementales no vacunados se evaluó de forma similar.

**2.3.4. Duración de la inmunidad**

Entre 1 y 2 meses después a la vacunación con MLV, en la mayoría de los caballos deben aparecer títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VEA (Timoney & McCollum, 1993). Las respuestas a la vacunación primaria de las que se tiene noticia han sido variables según dos estudios. De acuerdo con un estudio sobre la vacunación de sementales, hubo un rápido descenso en el título de anticuerpos y un número significativo de animales revirtieron a la seronegatividad a los 1–3 meses post-vacunación. Por otra parte, otros estudios se han caracterizado por una respuesta excelente y duradera, con persistencia de altos niveles de neutralización vírica durante al menos uno o dos años. La revacunación con esta vacuna ocasiona una respuesta anamnésica excelente, desarrollándose elevados niveles de anticuerpos que permanecen relativamente estables durante varios años (Timoney & McCollum, 1993).

Varios estudios experimentales han mostrado que la mayoría de los caballos vacunados con una vacuna inactivada desarrollan títulos de anticuerpos neutralizantes anti-VAE bajos o moderados hacia el día 14 después de la segunda vacunación. No existe información publicada sobre la duración de la inmunidad debida a esta vacuna.

**2.3.5. Stability**

La vacuna liofilizada con el MLV se puede mantener a 2–7°C por lo menos durante 3–4 años sin pérdida de infectividad, con tal de que se mantenga en la oscuridad. La infectividad se conserva mucho más tiempo si la vacuna se congela a –20°C o a temperatura inferior. Sin embargo, una vez rehidratada, debe utilizarse en 1 hora o destruirse. La vacuna inactivada se conserva como suspensión líquida a 2–8°C, sin pérdida de potencia durante al menos 1 año, con tal de que esté protegida de la luz.

## BIBLIOGRAFÍA

BALASURIYA U.B.R., EVERMANN J.F., HEDGES J.F., MCKEIRNAN A.J., MITTEN J.Q., BEYER J.C., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (1998). Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus isolated from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 1586–1589.

BALASURIYA U.B.R., LEUTENEGGER C.M., TOPOL J.B., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (2002). Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods*, **101**, 21–28.

BALASURIYA U.B.R., PATTON J.F., ROSSITO P.V., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & MACLACHLAN N.J. (1997). Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: Identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain. *Virology*, **232**, 114–128.

CAVANAGH D. (1997). *Nidovirales*: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch. Virol.*, **142**, 629–633.

- CHO H.J., ENTZ S.C., DEREGT D., JORDAN L.T., TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (2000). Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody-based blocking ELISA. *Can. J. Vet. Res.*, **64**, 38–43.
- CRAWFORD T.B. & HENSON J.B. (1973). Immunofluorescent, light microscopic and immunologic studies of equine viral arteritis. Proceedings of the Third International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1972. Karger, Basel, Switzerland, 282–302.
- DEL PIERO F. (2000). Equine viral arteritis. *Vet. Pathol.*, **37**, 287–296.
- DOLL E.R., BRYANS J.T., MCCOLLUM W.H. & CROWE M.E.W. (1957). Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion of mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.*, **47**, 3-41.
- DOLL E.R., BRYANS J.T., WILSON J.C. & MCCOLLUM W.H. (1968). Immunisation against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet.*, **48**, 497–524.
- EDWARDS S., CASTILLO-OLIVARES J., CULLINANE A., LABLE J., LENIHAN P., MUMFORD J.A., PATON D.J., PEARSON J.E., SINCLAIR R., WESTCOTT D.G.F., WOOD J.L.N., ZIENTARA S. & NELLY M. (1999). International harmonisation of laboratory diagnostic tests for equine viral arteritis. Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, UAE, 1998, 359–362.
- FUKUNAGA Y. & MCCOLLUM W.H. (1977). Complement fixation reactions in equine viral arteritis. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 2043–2046.
- FUKUNAGA Y., WADA R., SUGITA S., FUJITA Y., NAMBO Y., IMAGAWA H., KANEMARU T., KAMADA M., KOMATSU N. & AKASHI H. (2000). *In vitro* detection of equine arteritis virus from seminal plasma for identification of carrier stallions. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 643–646.
- GILBERT S.A., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & DEREGT D. (1997). Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions using a sensitive nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2181–2183.
- GO Y.Y., WONG S. BRANSCUM A., DEMAREST V.L., SHUCK K.M., VICKERS M.L., ZHANG J., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2008). Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies specific to equine arteritis virus and comparison with the virus neutralization test. *Clin. Vaccine Immunol.*, **15**, 76–87.
- HEDGES J.F., BALASURIYA U.B.R., SHABBI A., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H., YILMA T. & MACLACHLAN N.J. (1998). Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbant assays utilizing G<sub>L</sub>, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. *J. Virol. Methods*, **76**, 127–137.
- JONES T.C., DOLL E.R. & BRYANS J.T. (1957). The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet.*, **47**, 52–68.
- KONDO T., FUKUNAGA Y., SEKIGUCHI K., SUGIURA T. & IMAGAWA H. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of equine arteritis virus in racehorses. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 1043–1045.
- LITTLE T.V., DEREGT D., MCCOLLUM W.H., & TIMONEY P.J. (1995). Evaluation of an immunocytochemical method for rapid detection and identification of equine arteritis virus in natural cases of infection. Proceedings of the Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, Japan, 1994, 27–31.
- LU Z., BRANSCUM A., SHUCK K.M., ZHANG J., DUBOVI E., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2007). Detection of equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.*
- MANKOC S., HOSTNIK P., GROM J., TOPLAK I., KLOBUCAR I., KOSEC M. & BARLIC-MAGANJA D. (2007). Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: a novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR-ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *J. Virol. Methods*, **146**, 341–354.
- MCCOLLUM W.H. (1970). Vaccination for equine viral arteritis. Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1969, Karger, Basle, Switzerland, 143–151.
- MCCOLLUM W.H., PRICKETT M.E. & BRYANS J.T. (1971). Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 459–464.

MISZCZAK F., SHUCK K.M., LU Z., GO Y.Y., ZHANG J., SELLS S., VABRET A., PRONOST S., FORTIER G., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2011). Evaluation of two magnetic-bead-based viral nucleic acid purification kits and three real-time reverse transcription-PCR reagent systems in two TaqMan assays for equine arteritis virus detection in semen. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3694–3696.

MOORE B.O. (1986). Development and evaluation of three equine vaccines. *Irish Vet. J.*, **40**, 105–107.

NEWTON J.R., GERAGHTY R.J., CASTILLO-OLIVARES J., CARDWELL M. & MUMFORD J.A. (2004). Evidence that use of an inactivated equine herpesvirus vaccine induces serum cytotoxicity affecting the equine arteritis virus neutralisation test. *Vaccine*, **22**, 4117–4123.

NUGENT J., SINCLAIR R., DEVRIES A.A.F., EBERHARDT R.Y., CASTILLO-OLIVARES J., DAVIS POYNTER N., ROTTIER P.J.M. & MUMFORD J.A. (2000). Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (G<sub>L</sub>) of equine arteritis virus. *J. Virol. Methods*, **90**, 167–183.

SENNE D.A., PEARSON J.E. & CABREY E.A. (1985). Equine viral arteritis: A standard procedure for the virus neutralisation test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **89**, 29–34.

TIMONEY P.J., BRUSER C.A., MCCOLLUM W.H., HOLYOAK G.R. & LITTLE T.V. (2004). Comparative sensitivity of LLC-MK<sub>2</sub>, RK-13, vero and equine dermis cell lines for primary isolation and propagation of equine arteritis virus. *In: Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Cluck Equine Research Center, 20–21 October 2004, Lexington, Kentucky, USA, pp 26–27.

TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H., MURPHY T.W., ROBERTS A.W., WILLARD J.G. & CARSWELL G.D. (1987). The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **35**, 95–102.

TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (1993). Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, **9**, 295–309.

VAALA W.E., HAMIR A.N., DUBOVI E.J., TIMONEY P.J. & RUIZ B. (1992). Fatal congenitally acquired equine arteritis virus infection in a neonatal foal. *Equine Vet. J.*, **24**, 155–158.

WEBER H., BECKMANN K. & HAAS L. (2006). Fallbericht. Equines arteritisvirus (EAV) als aborterreger bei alpacas? *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **113**, 162–163.

WESTCOTT D.G., KING D.P., DREW T.W., NOWOTNY N., KINDERMANN J., HANNANT D., BELAK S. & PATON D.J. (2003). Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet. Res.*, **34**, 165–176.

ZHANG J., SHUCK K.M., MCCOLLUM W.H. & TIMONEY P.J. (2004). Comparison of virus isolation in cell culture and RT-PCR assays for detection of equine arteritis virus in cryopreserved semen. *Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Gluck Equine Research Center, 20–21 October, 2004, Lexington, Kentucky, USA, 41–42.

ZHANG J., TIMONEY P.J., SHUCK K.M., SEOUL G., GO Y.Y., LU Z., POWELL D.G., MEADE B.J. & BALASURIYA U.B.R. (2010). Molecular epidemiology and genetic characterization of equine arteritis virus isolates associated with the 2006–2007 multi-state disease occurrence in the USA. *J. Gen. Virol.*, **91**, 2286–2301.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Arteritis viral equina (consúltese la lista más actualizada en la tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o la página web de la OIE:

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

Para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Arteritis viral equina, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2013.