

ABORTO POR VIRUS HERPES EQUINO^a

Hermelinda Rivera ^b Roberto Alvitres ^c, Alberto Manchego ^b, Nieves Sandoval ^b y Raul Rosadio ^b

ABSTRACT

An outbreak of abortion due to equine herpesvirus in 76 % (13/17) of thoroughbred mares between 8 and 11 months of gestations occurred in early January 1996, in an area located at 120 km northern Lima. Equine herpesvirus was isolated from extracts of liver, lung, thymus and placenta of an 8-month fetus in bovine turbinate cells. The cytopathogenic virus was identified as equine herpesvirus-1 by the fluorescent antibody test with polyclonal antibodies against the whole virus. Inclusion bodies were also seen in the nucleus of infected cells by hematoxilin-eosine stain. Neutralizing antibodies against equine herpesvirus were found in a pleural cavity of one of the fetus indicating prenatal infection and in the sera of aborted mares. Virus isolation and neutralizing antibodies against equine herpesvirus -1 in one fetal pleural fluid and in sera from aborted mares suggest that the outbreak of abortions reported herein was due to equine herpesvirus-1. Equine herpesvirus is a wide distributed agent and it may cause economic loses unless, the equine herds are routinely immunized.

Key words: Equine, virus, abortion.

RESUMEN

Se reporta un brote de aborto en 13 yeguas de carrera de un total de 17 preñadas (76 %), ocurridos al norte de Lima en el mes de Enero de 1996. Los abortos ocurrieron entre 8 a 11 meses de gestación en un período de 15 días aproximadamente. Una cepa del virus herpes equino-1 (VHE-1), fue aislado de tejidos de uno de los fetos abortados de 8 meses de gestación en cultivos celulares. El virus fue identificado mediante la prueba de inmunofluorescencia empleando un antisuero contra virus herpes equino-1 y la presencia del característico efecto citopático y corpúsculos de inclusión intranuclear en las células infectadas mediante la coloración hematoxilina-eosina. El aislamiento del virus herpes de los tejidos de un feto abortado, la presencia de anticuerpos contra el virus herpes equino-1 en el fluido torácico fetal, así como, los títulos de anticuerpos mayores a 1:256 en el suero de las yeguas abortadas sin historia de vacunación reciente y la ausencia de bacterias y otros agentes virales indican que el brote, en el que, el 76 % de las yeguas preñadas abortaron (13/17) fue debido al virus herpes equino-1. Sin duda, el virus herpes equino como causante de aborto puede causar pérdidas económicas si no se toman medidas de prevención mediante la inmunización.

Palabras claves: equino, virus, aborto.

a Proyecto de Investigación IVITA - parcialmente financiado por el IFS

b Universidad Nacional Mayor de San Marcos, FMV, IVITA. E.Mail: d170029@unmsm.edu.pe

c Práctica Privada

INTRODUCCION

El aborto en la yegua, es la pérdida del producto de la concepción en cualquier momento hasta antes de los 300 días de la gestación¹. La pérdida en los estadios tempranos se denomina reabsorción embrionaria y generalmente se debe a deficiencias que dependen de la yegua.

Los abortos pueden ser precedidos o concomitantes con signos clínicos en las yeguas pero, en la mayoría de los casos, se caracterizan por la expulsión del feto muerto sin evidenciar signos clínicos de enfermedad. Igual comportamiento de las yeguas pueden notarse en caso de los nacidos muertos, moribundo o vivos pero débiles.

El feto abortado generalmente muere horas o días antes de ser expulsado haciendo más difícil la tarea diagnóstica pues, la autólisis enmascara las lesiones que podrían ayudar en la identificación de la causa del aborto. Los fetos abortados pueden tener un tamaño y peso no acorde con la edad de gestación, sugiriendo la existencia de lesiones crónicas en la placenta o endometrio.

Las causas de las pérdidas fetales en equinos, como en otras especies de mamíferos son múltiples pero pueden ser consideradas de origen no infeccioso, infeccioso y genético^{2,3}.

El origen no infeccioso del aborto comprende factores relacionado con: la dieta, medicamentos, vacunaciones, deficiencias de progesterona, gonadotropina sérica, relación fetal-materno anormal, fallas inmunológicas, mellizos, insuficiencia placentaria, separación prematura de la placenta, diarrea fetal y toxicosis². Muchos de los factores no infecciosos predisponen a la yegua y al feto a infecciones bacterianas o micóticas oportunistas, constituyendo la causa más frecuente del aborto equino. La invasión de gérmenes bacterianos o micóticos producen inflamación en la placenta afectando la

transferencia de nutrientes y el intercambio gaseoso. Es importante conocer la historia clínica, así como la performance reproductiva de la yegua etc., que permita determinar la causa del estrés que propició la invasión bacteriana o micótica y por tanto el aborto.

El aborto de origen infeccioso puede ser debido a: Herpes Equino -1 o Rinoneumonitis Equina, Arteritis Viral Equina, *Campylobacter fetus*, *Leptospira sp*, *Corynebacterium sp*, *Salmonella equi Ehrlichia risticii*²⁻⁴.

El virus herpes equino-1 (VHE-1) es un virus altamente citolítico, miembro de la familia *Herpesviridae* cuya información genética está contenida en una molécula de ADN de doble cadena. Estudios moleculares actualmente sugieren la existencia de 4 serotipos de VHE: el VHE-1 (denominado previamente como VHE-1, subtipo 1) causante de aborto, problemas respiratorio y neurológico, el VHE-2 o citomegalovirus equino aislado de equinos clínicamente normales así como de procesos respiratorios leves, el VHE-3 causante de una enfermedad de tipo vesicular autolimitante y el VHE-4 (conocido previamente como VHE-1, subtipo 2) producto de la rinoneumonitis equina que afecta principalmente a los animales jóvenes⁵. De los 4 serotipos, el VHE-1 y 4 son los más importantes desde el punto de vista clínico aunque en los caballos adultos la infección por ambos serotipos es usualmente inaparente o subclínico, a menos que existan condiciones como el estrés que permiten la reactivación del virus provocando el aborto en de yeguas gestantes susceptibles^{3,6,7}.

A pesar de las diferencias a nivel molecular entre el VHE -1 y 4, ambos serotipos comparten determinantes antigénicos pues yeguas inmunizadas con vacuna a base de VHE-1 muestra protección cruzada contra el VHE-4.

El 95 % de los abortos causado por el VHE-1 ocurren durante los últimos 4 meses de

gestación y las yeguas no muestran signos clínicos de la enfermedad previo al aborto. En la mayoría de los casos, el aborto ocurre esporádicamente e involucra uno o dos yeguas, pero, un brote o aborto epizootico puede afectar al 100 % de las yeguas preñadas. Usualmente el brote se presenta cuando el nivel de anticuerpos contra el virus presentes en las yeguas se agotan, y éstas son expuestas al virus durante el primer tercio de la gestación^{2, 8}.

Luego de la infección con el VHE-1, los animales inducen una sólida respuesta inmune. Sin embargo, en algunos, el virus no es eliminado totalmente, manteniéndose en estado de latencia en ciertas células nerviosas del ganglio trigémino como un mecanismo de persistencia viral en la naturaleza. Cuando el animal es sometido a períodos de estrés como el transporte, preñez, tratamientos con corticoides etc., el virus se reactiva produciéndose reinfecciones de tipo subclínico en los adultos o infecciones agudas en los animales jóvenes⁹.

Historia clínica.

En Enero de 1996, se presentó un brote de abortos en yeguas pura sangre de carrera de un Haras ubicado a 120 km al norte de Lima. La zona es principalmente agrícola, en el verano la temperatura puede alcanzar hasta 32°C. El agua en los canales de regadío es propicio para la proliferación de abundantes mosquitos y zancudos.

El Haras cuenta con una población de 60 caballos de carrera, de los cuales 30 son yeguas y el resto son portillos y potros. Los animales del haras en mención son de crianza extensiva con pasto cultivados, heno de alfalfa y cebada.

De las 30 yeguas, 17 estuvieron preñadas en el último tercio de la gestación, de éstas, 12 abortaron fetos de 8 a 11 meses de gestación en un periodo de 15 días y otra

yegua eliminó un feto momificado un mes después del brote (13/17). Los animales no presentaron signos respiratorios previos ni durante el brote, pero en una yegua se observó fiebre ligera (38.8°C), marcada somnolencia, otra presentó laminitis severa luego del aborto y otra murió posiblemente por toxemia. No se presentaron retención de placenta, pero 5 de 11 yeguas presentaron metritis posterior al aborto.

La necropsia fue posible sólo en dos de los fetos abortados de 8 y 11 meses de gestación. Los fetos no presentaron anomalías físicas externas. Los órganos internos fueron de tamaño normal pero con marcada autolisis. La cavidad torácica presentó abundante fluido de color amarillento. En las placentas se observaron edema, congestión y hemorragia..

Se colectaron asépticamente muestras de hígado, pulmón, timo, placenta y fluido torácico para el estudio virológico y bacteriológico; así mismo pedazos de los mismos tejidos fueron fijados en formol al 10% para el estudio histopatológico. Se tomaron igualmente muestras de sangre de cada una de las yeguas abortadas para el estudio serológico. Se tomó además muestra de cebada entera y molida para el descarte micológico.

MATERIALES Y METODOS

Estudio serológico.

Las muestras de suero obtenidas de las yeguas abortadas fueron inactivadas a 37 °C por 30' antes de ser procesadas para la detección de anticuerpos contra el VHE-1 y AVE, mediante la prueba de virus-neutralización en cultivos celulares según el protocolo del Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la

Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Brevemente, la muestra de los sueros y el fluido torácico de uno de los fetos fueron diluidas en una microplaca de 96 hoyos para cultivos celulares, de modo que se obtenga diluciones dobles Ejem: 1:2., 1:4., etc. hasta 1:256, luego cada una de las diluciones fueron enfrentadas con 200 DI50CC/0.025ul del VHE-1 (Cepa de laboratorio) y AVE (Cepa Bucyrus). La mezcla suero-virus fueron incubadas en estufa a 37°C por 1 hora después del cual se añadió a toda la microplaca el sistema indicador que fue una suspensión de células de cornete nasal bovino preparadas y cultivadas en el Laboratorio. Las microplacas fueron incubadas en estufa a 37°C con CO₂ por 3 a 5 días consecutivos antes de realizar la lectura.

Aislamiento viral.

Muestras de hígado, pulmón, timo y placenta fueron mezclados y triturados para convertirlos en una suspensión al 10 % P/V en el medio mínimo esencial con antibióticos (100µg de estreptomycin, 100 µg de penicilina, 50µg de gentamicina y 12.5 µg de fungizona). La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 10' y el sobrenadante fue inoculado en monocapas de células primarias de cornete nasal bovino e incubada por 5 días en estufa a 37°C. Las monocapas fueron observadas diariamente en busca de lesión celular o efecto citopático.

Luego del segundo pasaje ciego, algunas de las monocapas de células fueron también procesadas para la detección de antígeno viral mediante la técnica de inmunofluorescencia empleando un conjugado policlonal anti-herpes virus equino y la coloración con hematoxilina -eosina para la observación de corpúsculos de inclusión intranuclear.

Aislamiento de bacterias.

Las muestras de tejidos del feto abortado, así como la muestra de cebada, fueron trabajadas según los procedimientos para cultivos bacterianos y micóticos.

Estudio histopatológico.

Las muestras de hígado, pulmón, timo y placenta fijadas en formol al 10% fueron procesadas y coloreadas con hematoxilina-eosina para la observación histológica.

RESULTADOS

El resultado serológico se presenta en Cuadro 1. El análisis bacteriológico de las muestras de tejidos de los fetos abortados determinó la presencia de escasas colonias de *Escherichia coli*, hallazgo que no fue considerado como posible agente causal del aborto, sino más bien una contaminación posterior a la toma de muestra.

Las muestras de cebada fueron igualmente negativas a la presencia de hongos.

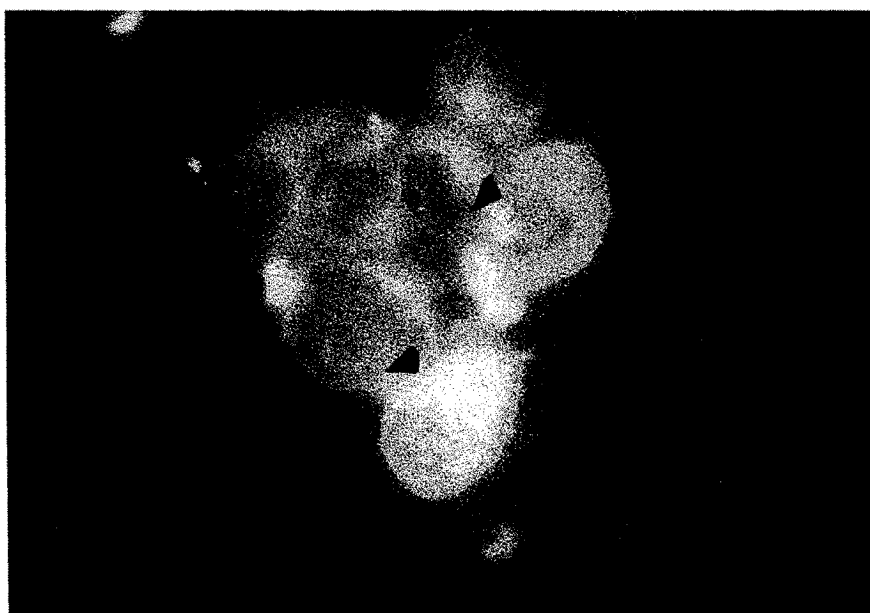
Cuadro 1. Detección de anticuerpos contra virus herpes equino-1 y arteritis viral equina en muestras de suero de yeguas abortadas y el fluido torácico fetal mediante la prueba de virus-neutralización.

No Yegua	Anticuerpos neutralizantes contra:	
	VHE-1	AVE
1	1: 256	< a 1: 2
2	1: 64	< a 1: 2
3	1: 256	< a 1: 2
4	1: 64	< a 1: 2
5	1: 256	< a 1: 2
Feto	1: 16	< a 1: 2

Aislamiento viral.

Lesión celular o efecto citopático característico de un virus herpes fue observado en cultivo celular al quinto día, haciéndose más

evidente a partir del segundo pasaje. La detección de antígeno viral en el núcleo de las células infectadas mediante la técnica de inmunofluorescencia identificó al VHE-1 (Fotomicrografía 1).



Fotomicrografía 1. Cultivo celular inoculado con suspensión de tejidos del feto equino abortado mostrando dos células infectadas con virus. Inmunofluorescencia (100X).

La coloración de hematoxilina-eosina efectuada en estas células permitió observar la presencia de corpúsculos de inclusión intranuclear y áreas picnóticas (Fotomicrografía 2).

Histopatología.

La autólisis observada en los fetos

dificultó la observación de lesiones macroscópicas y microscópicas en los tejidos fetales obtenidos; sin embargo, en el hígado se observó severa congestión, la placenta presentó edema, congestión, severa hemorragia y descamación de las células de los microcotiledones.



Fotomicrografía 2. Cultivo celular mostrando un corpúsculo de inclusión intranuclear. HE (100X).

DISCUSION

La presencia de anticuerpos contra el VHE-1 en el fluido torácico de uno de los fetos abortados indica una infección prenatal via placenta. El feto de 8 meses es inmunológicamente competente y capaz de reaccionar frente al estímulo viral¹, por lo tanto, el hallazgo de anticuerpos en sus fluidos es determinante para el diagnóstico.

El aislamiento del virus herpes de las muestras de tejidos de un feto abortado indica sin duda, que el brote, en donde el 76 % de las yeguas abortaron (13/17), fue causado por el VHE y dado que, los animales del haras no mostraron signos respiratorios antes ni durante el brote, el virus involucrado sería el VHE-1, el serotipo abortigénico.

En el Perú, el VHE-1 fue aislado de tejidos de un feto equino abortado al final de la

gestación¹⁰. En aquella ocasión, el feto necropsiado presentó lesiones macro y microscópicas compatibles con el virus herpes equino, desde entonces se conoce que el virus se encuentra en la población equina principalmente en forma subclínica en los animales adultos pero son reservorios y fuente del virus para los animales jóvenes causando en éstos severos problemas respiratorios.

Los altos títulos de anticuerpos (>1:256) presentes en las yeguas abortadas indican un estímulo reciente con virus de campo, puesto que dichas yeguas no habían sido inmunizadas en los últimos dos años. La historia clínica de las yeguas indican que no hubo exposición con otros equinos fuera del haras, lo que hace suponer una reactivación del virus debido al estrés de la preñez y que al encontrar el virus una población susceptible se habría difundido rápidamente causando el

aborto epizootico y los anticuerpos resultante del estímulo viral no habrían sido capaces de evitar la invasión fetal.

En el presente brote, los 2 fetos necropsiados no mostraron lesiones macro ni microscópicas que caracterizan al herpes equino, excepto la placenta de ambos fetos que estuvieron congestionados posiblemente la placentitis severa propició la muerte de los fetos antes que estos desarrollen las lesiones consistentes en petequias, hemorragia, focos necróticos en el hígado y edema que se describen para estos casos².

El VHE-1 es uno de los patógenos de importancia, por su asociación con los abortos y problemas respiratorios, por lo que las yeguas adultas deben ser inmunizadas, así como los potrillos mayores de dos meses, debido a que, en estos últimos, los anticuerpos pasivos se han agotado y/o no son suficientes para protegerlos del virus de campo.

Agradecimiento.

Los autores agradecen a las Dras: Sonia Calle y Laura Urteaga por el trabajo de descarte bacteriológico.

LITERATURA CITADA

1. Tizard I. Inmunología Veterinaria. 2da ed. Editorial Inter Americana- Mexico, D.F. 1988; 193-207.
2. Kirkbride C. Laboratory diagnosis of livestock abortion. In Kirkbride C. 3th ed. Iowa: State University Press. 1990;260.
3. Weiblen R, Rabuske M, Rebelato M. et al. Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. Brazilian J Med Biol Res. 1994; 27: 1317-1320.
4. Poonocha K, Donahue J. Abortion in a mare associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. J Vet Diagn Invest. 1995; 7: 563-564.
5. Ellis J, Boddan J, Kanara E et al. Cellular and antibody responses to equine herpesviruses 1 and 4 following vaccination of horses with modified-live and inactivated viruses. JAVMA. 1995; 206(6): 823-832.
6. Hamir A, Vaala W. Disseminated equine herpesvirus-1 infection in a two year old filly. J Vet Diagn Invest. 1994; 6: 493-496.
7. Kirisawa R, Endo A, Iwai H and Kawakami Y. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and 4 by polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 1993; 36:57-67.
8. Fu Z, Robinson A, Horner G. et al. Respiratory disease in foals and the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection. N Z Vet J. 1986; 34:152-155.
9. Smith J, DeBowes R and Cox J. Central nervous system disease in adult horses. Part III. Differential diagnosis and comparison of common disorders. Continuing Education. Article #6. 1987, 9 (10): 1042-1052.
10. Hermelinda Rivera, Hugo Samamé y Ramiro Oballe. Aislamiento y caracterización de un virus aislado de feto equino abortado. Rev. Vet. Zootec. 1975;(126): 10-13.