

ASPECTOS SEROEPIZOOTIOLÓGICOS Y PREVALENCIA DE RINONEUMONITIS EQUINA EN EL DEPARTAMENTO SAN CRISTOBAL, (PROVINCIA DE SANTA FE, ARGENTINA)¹

GOLLAN, A.¹, OCCHI, H.¹, LUCCA, E.³,

MARIÑO, B.² & PINOTTI, M.²

RESUMEN

Durante 1999 se estudiaron muestras de sueros de equinos de cría en San Cristóbal, provincia de Santa Fe utilizando pruebas de microneutralización, a fin de establecer la prevalencia de anticuerpos contra la rinoneumonitis equina. Sobre 215 sueros analizados, 69 resultaron positivos, lo que no sugiere diferencias significativas con los hallazgos de los años 1997-98 (32,09 % vs 36 % $p=0,315$) pero confirma la circulación y persistencia de este agente en la población equina de la zona .

Estos resultados sumados al alto grado de equinos susceptibles (67,9 %) constituye una situación epizootológica de alto riesgo por lo que se requiere la implementación de medidas de control.

Palabras clave: rinoneumonitis equina, seroneutralización, anticuerpos, prevalencia.

SUMMARY

Seroepizootiological aspects and antibody prevalence against rhinoneumonitis equine from San Cristobal departament of the Santa Fe province (Argentina).

During 1999, several samples of equine breeding sera were studied in San Cristobal, province of Santa Fe. A microseraneutralization test was conducted looking for the prevalence of antibodies against equine - rhinopneumonitis.

From 215 samples, 69 were positives showing no significative differences with the previous years, 1997 - 1998 (32,09 % vs 36 %; $p=0,315$). This appears to be consequence of constant circulation and persistence of the virus into regional population of horses. Such results, added to high degree of susceptibility existing on horses (67,9 %), might aid some epizootiological situation a high level of risk. Future measures control are requested.

Key words: equine rhinopneumonitis, seroneutralization, antibodies, prevalence.

1.- Proyecto subsidiado por CAI+D (UNL).

2.- Cátedra de Virología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Telefax: (03496) 426400. Email: agollan@fcv.unl.edu.ar

3.- Cátedra de Infectología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

Manuscrito recibido el 16 de marzo de 2004 y aceptado para su publicación el 22 de noviembre de 2004.

INTRODUCCIÓN

La Rinoneumonitis Equina es una enfermedad de tipo epizoótica y distribución mundial que causa procesos respiratorios y alteraciones reproductivas y nerviosas en los equinos afectados. Es producida por un virus integrante de la familia Herpesviridae, ADN, recubierto por una envoltura de naturaleza glicoproteica (Studdent, 1974). Este agente es capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos, detectables por diversas técnicas serológicas como la Sero-neutralización, Fijación de complemento, Inmunodifusión, Inmunofluorescencia indirecta, Hemaglutinación pasiva y Enzimo-inmunoensayo (Matsumura *et al.*, 1991; Berriós *et al.*, 1985, 86; Campbell & Studdent, 1983). Sin embargo, la condición propia de la familia Herpesviridae a la que pertenece el virus, es la de generar conjuntamente con una respuesta normal de anticuerpos específicos, un estado de latencia en la ruta ganglionar nerviosa con su potencial posibilidad de recurrencia, lo que ocasiona nuevos episodios de enfermedad con eliminación de virus y persistencia de anticuerpos humorales (Gibson & O'Neil, 1992).

Varios autores han demostrado que la mayoría de los equinos se primoinfectan en etapas tempranas de su vida y suelen reactivar la enfermedad durante el crecimiento y la vida deportiva (Matsumura *et al.*, 1994). También se han descrito las reexposiciones y reinfecciones naturales y posteriores a la infección primaria (Allen & Briñas, 1986) de las que generalmente resulta una enfermedad leve o inaparente (Doll & Bryans, 1985). Aspectos serológicos y virológicos relacionados a la diseminación de la enfermedad han sido motivo de publicaciones anteriores (Occhi *et al.*, 1998).

El objetivo del presente trabajo es com-

parar la prevalencia de anticuerpos en la población estudiada durante el año 1999 con la hallada durante los años 1997 y 1998 en la misma población.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

El muestreo se realizó en animales de campo del Departamento San Cristóbal, ubicado en la zona central de la Provincia de Santa Fe, República Argentina, entre los paralelos 29 y 31 de latitud sur y los meridianos 60 y 62 de longitud oeste, en una superficie de 14.850 km², que cuenta con más de 11.000 equinos, lo que constituye el 12% del total de la población equina en la Provincia.

El cálculo de la cantidad de muestras a extraer se realizó de acuerdo a un diseño de estudio poblacional, muestreo simple al azar, utilizando el programa EPI-INFO. V6 con un intervalo de confianza del 95 %.

De acuerdo a ello, durante el transcurso del año 1999, se extrajeron muestras de sangre a 215 animales de campo, adultos, empleados habitualmente en tareas rurales, de diferentes razas, en la zona descripta. Los equinos muestreados no mostraban signos clínicos de la enfermedad y no registraban antecedentes vacunales.

Los sueros se obtuvieron libres de hemólisis y en condiciones de asepsia, inactivándose por 30 minutos a 56°C y almacenados a -20°C hasta ser procesados.

MICTOSERONEUTRALIZACIÓN

- Células

Como revelador biológico en las pruebas se utilizaron células de bovino susceptibles pertenecientes a la Línea Establecida Madin Derby Bovine Kidney (MDBK), en rango de

pasajes 30-35, certificadas como libres de virus adventicios y cultivadas en Minimum Essential Medium (MEM) adicionado con 7% de Suero Fetal Bovino y 1% de Antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina/fungizona).

- Antígeno viral

Se utilizó la cepa de Referencia de Rinoneumonitis Equina V 144/64, subcultivada en células MDBK y previa y simultáneamente titulada para lograr una cantidad de 100 Dosis Infecciosas Cultivo de Tejidos 50% (DICT 50%) por mililitro.

Se prepararon stocks de la misma a fin de enfrentar a todos los sueros con idéntica carga viral, efectuándose las diluciones logarítmicas de la Cepa V144/64 en Medio MEM sin el agregado de suero desde 10^{-1} a 10^{-10} . Se sembraron en 8 réplicas cada una de las diluciones en policubetas para microcultivos celulares a razón de 0,05 ml., agregándoseles iguales volúmenes de suspensión de la línea celular en concentración de 1×10^6 células / ml. Las cubetas selladas con film se incubaron por 7 días en estufa con CO_2 y humedad controlada, efectuándose una lectura diaria por el término de 7 días. El cálculo de resultados se hizo por el Método de Reed y Muench (1937).

- Sueros

Las diluciones de los sueros problema se hicieron en MEM sin aditivos abarcando el rango 1/2 a 1/8 y en una primera etapa se efectuó un análisis tamiz de los sueros a fin de establecer positividad. Se unieron vol / vol. con el virus titulado conteniendo 100 DICT 50% en la dilución 10^{-5} , se incubaron por 60 minutos a 37°C , a fin de favorecer la unión antígeno-anticuerpo. Se destaca la ampliación del rango de diluciones estudiadas en el presente muestreo (partiendo desde 1/2).

La prueba de microseroneutralización se desarrolló en policubetas de 96 pocillos sembrándose 50 microlitros de cada dilución del suero/ virus por duplicado y sobre ellas se agregaron 50 microlitros de la suspensión de células MDBK, conteniendo entre 800.000 y 1.000.000 de células / ml., resuspendidas en medio de crecimiento (MEM + suero fetal y antibióticos).

Las cubetas se sellaron e incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 y humedad controlada, realizándose observaciones diarias por el término de 7 días. Paralelamente a los sueros problema, se sembraron controles y sueros de referencia positivos y negativos al virus de la Rinoneumonitis Equina. Para el Control de Células Normales se sembraron varios pocillos con la suspensión celular madre. Cada vez que se montó la prueba y en cada policubeta, se efectuó una retitulación viral conjunta a fin de corroborar la presencia de las DICT 50% por mililitro de suspensión.

Transcurridos 7 días de observaciones diarias, se efectuó la lectura final y se calcularon los resultados, estableciendo como punto final la última dilución sérica que neutralizó completamente la acción del virus, expresándose el resultado como la recíproca de la dilución que observó esta condición.

Todos los sueros que resultaron positivos en alguna de las diluciones probadas se diluyeron nuevamente hasta 1/256 a fin de conocer hasta donde se extendía su positividad. El procedimiento utilizado para su seroneutralización fue idéntico al ya descrito.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para la comparación de las prevalencias se utilizó el método de homogeneidad no paramétrico chí cuadrado.

Cuadro 1: Distribución porcentual de los títulos obtenidos por microseroneutralización 3n 1999 (n = 215).

RESULTADOS	TITULO	N*	% SOBRE EL TOTAL
POSITIVOS	½	22	10,2
	¼	15	6,97
	1/8	12	5,58
	1/16	6	2,79
	1/32	10	4,65
	1/64	0	0
	1/128	3	1,39
	1/256	1	0,46
	SUBTOTAL	69	32,09
NEGATIVOS	SUBTOTAL	146	67,91
	TOTAL	215	100

N = número de muestras.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el muestreo de 1999 se resumen en el cuadro 1. Puede observarse que los mayores porcentajes entre los positivos corresponden a títulos bajos (entre ½ y 1/32 inclusive), representan el 30,19%, mientras que los títulos considerados altos (1/64 a 1/256) alcanzan el 1,85%. No existen diferencias significativas para la prevalencia general de anticuerpos para la hallado durante el año 1999 (32%) y los años 1997/98 (36%) (Occhi *et al.*, 1998).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La mayoría de las muestras estudiadas resultaron negativas (67,9 %) lo que indica una amplia población de animales susceptibles a la primoinfección. Los anticuerpos encontrados indican una circulación viral natural, en virtud de la certeza de que los animales no habían sido inmunizados.

Dentro de la distribución de los títulos de anticuerpos, el mayor porcentaje de las muestras positivas se encontró dentro de la zona de bajo título (17,2 % para los títulos 1/2 y 1/4) lo que indicaría la presencia de anticuerpos residuales debido a primoinfecciones a temprana edad (Berríos *et al.*, 1985).

Los porcentajes restantes debido a títulos intermedios (1/8; 1/16 y 1/32) y altos (1/128 y 1/256) indican que también las primoinfecciones, reactivaciones o reinfecciones ocurren en etapas posteriores de la vida del equino.

Los resultados obtenidos del muestreo del año 1999, nuevamente corroboran la circulación del virus de la Rinoneumonitis Equina en la población de animales descriptos, en forma endémica. Por otro lado el mayor porcentaje de muestras sin anticuerpos o negativas indica una mayoría de animales susceptibles. Ambas razones constituyen un riesgo para el agravamiento de la situación epizootológica de esta enfermedad con el

consiguiente impacto a nivel reproductivo y productivo por lo que se impone la implementación de medidas de control a fin evitar, al menos, una mayor diseminación de la misma aún sin dejar de considerar que la difusión de resultados anteriores pueda haber obrado como un llamado de atención en profesionales de la zona ya que no se observa un aumento de la prevalencia durante el año 1999 respecto de años anteriores.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, G. & J. BRYANS.** 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine Herpesvirus 1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*. 2: 78-144.
- BERRIOS, P.; L. IBARRA; S. CELEDÓN & N. CARVAJAL.** 1985. Rinoneumonitis equina: respuesta inmune humoral en equinos vacunados con virus vivo modificado. *Arch. Med. Vet.* 17: 91-97.
- BERRIOS, P.; L. IBARRA & S. RIQUELME.** 1986. Aplicación de la prueba de hemoaglutinación pasiva para el estudio de la Rinoneumonitis equina.- II-Estudio serológico en Equinos. *Rev. Latin. Amer. de Microbiol.* 28: 339-343.
- CAMPBELL, T. & M. STUDDERT.** 1983. Equine Herpesvirus Type 1. Review. *Veterinary Bulletin*. Febrero. 53. Nº 2.
- DOLL, E. & J. T. BRYANS.** 1985. Epizootiology of equine viral rhinopneumonitis. *J-Am. Vet. Med. Assoc.* 142: 31-37.
- GIBSON, J. & T. O'NEIL.** 1992. Serological responses of specific pathogen free foals to equine herpesvirus 1: primary and secondary infection and reactivation. *Veterinary Microbiology*. 32: 199-214.
- MATSUMURA, T.; T. SUGIURA; H. IMA-GAWA; Y. FUKUNAGA & M. KAMADA.** 1991. Epizootiological Aspects of Type 1 and Type 4 Equine Herpesvirus Infections among horse populations. J.R. Association-Equine Research Institute. Japan.
- MATSUMURA, T.; S. YOKOTA & H. IMA-GAWA.** 1994. Sero and molecular epizootiological studies on equine Herpesvirus Type 1 (HEV) infection among race horses: an occurrence of respiratory disease with nervous disorders. Equine Research Institute. Japan Racing Association. *J. Equine Sci.* 5: 59-67.
- OCCHI, H.; A. GOLLÁN; E. LUCCA & D. SANTILLÁN.** 1998. Detección de anticuerpos contra el virus de la Rinoneumonitis equina en la zona centro-norte de la provincia de Santa Fe. VIII Congreso Argentino de Microbiología. Abstract. Nº G.3. p.225.
- REED, L. & MUENCH, M.** 1937. A single method of estimating fifty percent end points. *Am. J. HYG.* 27: 493-497.
- STUDDENT, M.** 1974. Comparative aspects of equine Herpesviruses. *Cornell Vet.* 64: 94 - 122.
- SHIMIZU, T.; R. ISHIZAKI & M. MATU-MOTO.** 1963. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in Japan. *Japan Exp.* 33: 133-147.