Revista Veterinaria. 2023; 34(2): 134-141.
http://dx.doi.org/
Revisión bibliográfica
BY-NC

Revista
Veterinaria
Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE
ISSN: 1668-4834 / ISSN-e: 1669-6840

Parvovirus Equino-Hepatitis (EqPV-H): un nuevo virus contaminante de productos biológicos de origen veterinario

Ruiz, V.*; Alvarez, I.

Laboratorio de Virus Adventicios, Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) CICVyA, INTA Castelar, Nicolás Repetto y Los Reseros s/Nº. CP 1686. Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Buenos Aires, Argentina.
ruiz.vanesa@inta.gob.ar

Resumen
El Parvovirus Equino-Hepatitis (EqPV-H) es un nuevo integrante de la familia *Parvoviridae* descubierto hace apenas 5 años. Este virus fue identificado en el suero e hígado de un caballo muerto por hepatitis sérica equina, también conocida como enfermedad de Theiler. Esta enfermedad es una de las causas más comunes de hepatitis aguda y falla hepática en caballos y se ha descripto frecuentemente luego de la administración de algún producto biológico de origen equino. Numerosos reportes en los últimos años sugieren fuertemente que el EqPV-H es el agente etiológico de la enfermedad de Theiler. Comúnmente la infección es asintomática por lo que los caballos infectados pueden ser portadores sanos y servir como reservorios para la infección de otros caballos. La infección por EqPV-H fue detectada en América, Europa, Asia y Oceanía, con una prevalencia de ADN del 3,2-19,8% y una seroprevalencia de 15-34% en caballos clínicamente sanos, alcanzando valores del 90-100% en animales con enfermedad de Theiler. Se ha reportado también la presencia de ADN de EqPV-H en lotes de suero equino comercial, evidenciando el riesgo de transmisión por productos biológicos que utilicen este insumo en su proceso de manufactura. Recientemente, el Centro de Biológicos Veterinarios del Departamento de Agricultura de Estados Unidos ha establecido que todos los productos biológicos de plasma o suero equino con licencia comercial deben ser analizados y resultar negativos para EqPV-H. Probablemente, estas restricciones sanitarias comiencen a implementarse en otros países. Este artículo resume el conocimiento publicado hasta la fecha sobre el EqPV-H, objeto de una investigación en rápida evolución.

Palabras clave: Parvovirus Equino-Hepatitis, enfermedad de Theiler, productos biológicos, contaminación.

Equine Parvovirus-Hepatitis: A new adventitious agent in veterinary biological products

Abstract. Equine Parvovirus-Hepatitis (EqPV-H) is a new member of *Parvoviridae* family discovered 5 years ago. This virus was first identified in the serum and liver of a horse that died of equine serum hepatitis, also known as Theiler's disease. This disease is one of the most common causes of acute hepatitis and liver failure in horses and has been frequently described after the administration of a biological product of equine origin. Several reports in recent years strongly suggest that EqPV-H is the etiologic agent of Theiler's disease. The infection is usually asymptomatic, so infected horses can be healthy carriers and serve as reservoirs for infection to other horses. EqPV-H infection has been detected in America, Europe, Asia and Oceania, with a DNA prevalence of 3.2-19.8% and a seroprevalence of 15-34% in clinically healthy horses, reaching values of 90-100% in animals with Theiler's disease. EqPV-H DNA has also been detected in commercial equine serum pools, revealing the risk of transmission by biological products that use this serum in their manufacturing process. Recently, the Center for Veterinary Biologics of the United States Department of Agriculture requires that all commercially licensed equine serum or plasma biologicals be tested and confirmed negative for EqPV-H. These sanitary restrictions could also be implemented in other countries. This article summarizes the published knowledge to date on EqPV-H, a focus of rapidly evolving research.

Key words: Equine Parvovirus-Hepatitis, Theiler´s disease, biological products, contamination.

Recibido: 13 marzo 2023. **Aceptado:** 23 mayo 2023

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Theiler, también conocida como hepatitis sérica equina o enfermedad hepática aguda idiopática, es una enfermedad grave en caballos adultos, y a menudo potencialmente mortal, que fue descripta por primera vez en 1918 en Sudáfrica por Sir Arnold Theiler. Theiler observó síntomas de enfermedad hepática en animales que habían sido vacunados contra la Peste Equina Africana, utilizando una combinación de virus vivo y antisuero equino (Theiler 1918). Posteriormente, se reportaron varios brotes de enfermedad de Theiler en América del Norte y Europa (Madsen 1934, Shahan 1939, Thomsett 1971).

Esta enfermedad es una de las causas más comunes de hepatitis aguda y falla hepática en caballos y se ha descripto con mayor frecuencia luego de la administración de algún producto biológico producido a partir de sangre equina, tal como antitoxina tetánica (Thomsett 1971, Step et al. 1991, Messer y Johnson 1994, Guglick et al. 1995), antitoxina botulínica (Chandriani et al. 2013), plasma equino (Aleman et al. 2005), antisuero de *Streptococcus equi* (Panciera 1969) y, más recientemente, preparaciones de células madre alogénicas (Tomlinson et al. 2020). De estos productos biológicos de origen equino, la enfermedad se ha asociado más comúnmente con la antitoxina tetánica (TAT), posiblemente porque este producto es administrado con mayor frecuencia.

Esta enfermedad también ha sido reportada en caballos sin antecedentes de administración de productos biológicos equinos, así como en animales que estuvieron en contacto con casos de enfermedad de Theiler. Estos hallazgos sugieren que se trata de una enfermedad infecciosa y contagiosa (Theiler 1918, Sturgeon 2017, Tomlinson et al. 2019a,b, Baird et al. 2020). Si bien se sospechaba una etiología viral, numerosos intentos fracasaron en aislar el agente causal de la enfermedad de Theiler, que se mantuvo desconocido hasta hace unos pocos años (Tomlinson et al. 2019c, Divers et al. 2022). Esta revisión bibliográfica explora el descubrimiento del Parvovirus Equino-Hepatitis (EqPV-H), presumiblemente el agente etiológico de la enfermedad de Theiler, aportando información sobre la biología del virus, la epidemiología de la infección, el curso de la enfermedad, y las vías de transmisión. Asimismo, plantea la necesidad de controlar los productos biológicos producidos a partir de suero y/o plasma equino con el objetivo de evitar la propagación del virus y de cumplir con normativas regulatorias vigentes en Estados Unidos requeridas para la comercialización de dichos productos, las cuales podrían llegar a implementarse también en otros países a la brevedad.

Intentos para identificar al agente etiológico de la enfermedad de Theiler. En los años 2012 y 2013 se identificaron 3 nuevos flavivirus asociados con enfermedad hepática en caballos. El primero de ellos fue el hepacivirus no-primate (NPHV, del inglés *nonprimate hapacivirus*), que fue luego denominado hepacivirus equino (EqHV) (Burbelo et al. 2012). Este virus pertenece al género *Hepacivirus* (Hepacivirus A), y se encuentra íntimamente relacionado con el virus de la Hepatitis C. El principal huésped natural de este virus es el caballo y varios estudios han demostrado que el EqHV es hepatotrópico (Reuter et al. 2014, Pfaender et al. 2015, Ramsay et al. 2015, Scheel et al. 2015). Los otros dos virus, pertenecientes al género *Pegivirus,* son el Virus asociado a la enfermedad de Theiler (TDAV, del inglés *Theiler disease-associated* virus), y el pegivirus equino (EPgV).

El TDAV fue identificado por Chandriani et al. (2013) en un brote de hepatitis sérica o enfermedad de Theiler, en caballos a los que se les había administrado antitoxina botulínica de origen equino. Mediante la técnica de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing,* NGS) o secuenciación masiva, este nuevo virus fue identificado en los casos índice, así como en la antitoxina que recibieron los caballos. Sin embargo, el TDAV parece ser un virus poco frecuente, ya que luego de su hallazgo inicial sólo se ha detectado en sueros equinos de origen comercial utilizados para la propagación de cultivos celulares (Postel et al. 2016), pero no en estudios epidemiológicos llevados a cabo en diferentes regiones y países (Lyons et al. 2014, Lu et al. 2018, 2020, Tang et al. 2018, Vengust et al. 2020).

El EPgV fue también descubierto por la técnica de secuenciación de nueva generación, en muestras de suero equino provenientes de un establecimiento de Alabama con alta prevalencia de hepatitis (Kapoor et al. 2013). Sin embargo, es muy poco frecuente el hallazgo de este virus en muestras de hígado, incluso cuando está presente en el suero, y hasta el momento no se ha podido demostrar una asociación entre la infección con EPgV y una enfermedad hepática (Kapoor et al. 2013, Ramsay et al. 2015, Tomlinson et al. 2019a,b).

Estudios recientes han reportado una fuerte evidencia de que la enfermedad de Theiler es causada por un nuevo parvovirus, el Parvovirus Equino-Hepatitis (EqPV-H, del inglés *Equine Parvovirus-Hepatitis*). El EqPV-H fue descubierto por el grupo de Divers et al. (2018) cuando analizaron las muestras de suero e hígado de un caballo que había muerto de hepatitis sérica, luego de la administración de antitoxina tetánica de origen equino. En este trabajo, los autores demostraron la presencia del nuevo parvovirus no solo en las muestras del caballo afectado sino también en la toxina que se le había administrado. Posteriormente inocularon a dos caballos con un lote de antitoxina tetánica positiva para EqPV-H por PCR. Ambos animales desarrollaron viremia, seroconversión y hepatitis aguda, confirmada por pruebas clínicas, bioquímicas e histopatológicas. Con las secuencias obtenidas, Divers et al. (2018) clasificaron el nuevo EqPV-H como perteneciente al género *Copiparvovirus.* En este mismo trabajo, los autores llevaron a cabo pruebas retrospectivas de las muestras del brote de hepatitis asociado a antitoxina botulínica donde se había descubierto el TDAV (Chandriani et al. 2013), y todas las muestras que habían dado positivo para TDAV contenían también EqPV-H. Los autores sugieren que debido a que el estudio anterior había analizado las muestras mediante metagenómica viral a partir de ARN, el EqPV-H no habría sido detectado ya que se trata de un virus con genoma ADN. El EqPV-H y EqHV se consideran actualmente los dos agentes virales clínicamente más relevantes asociados con la hepatitis equina.

Estudios subsiguientes aportaron más evidencia a favor de la asociación entre la enfermedad de Theiler y el EqPV-H. El grupo de Tomlinson et al. (2019a) reportó la detección de este virus en 18 casos consecutivos de enfermedad de Theiler que ocurrieron luego de la administración de un producto biológico de origen equino. También reportaron la infección por EqPV-H en 9 de 10 casos de enfermedad de Theiler en ausencia de la administración de un producto biológico equino (Tomlinson et al. 2019b). Asimismo, Baird et al. (2020) demostraron una alta frecuencia de detección de EqPV-H en muestras de caballos con enfermedad de Theiler en una granja de Canadá, con y sin antecedentes de administración de productos biológicos. Casi simultáneamente, se reportaron los primeros casos de enfermedad de Theiler asociada a EqPV-H en Europa (Vengust et al. 2020) y en Asia (Yoon et al. 2021a).

Dado que el EqPV-H es un virus equino emergente, existen pocos datos relacionados a la epidemiología, diversidad genética, modos de transmisión y características clínicas de esta infección. Esta información se encuentra revisada en los siguientes apartados.

Epidemiología del EqPV-H. La prevalencia de infección por EqPV-H en caballos clínicamente sanos, determinada mediante la detección del ADN viral, ha demostrado ser del 13-17% en Estados Unidos (Divers et al. 2018, Altan et al. 2019), 8,3-11,9% en China (Lu et al. 2018, 2020), 8,9% en Austria (Badenhorst et al. 2022), 5-19,8% en Alemania (Meister et al. 2019a, Reinecke et al. 2021), 4,6% en Francia (Fortier et al. 2021), 4-10% en Corea (Lee et al. 2021, Yoon et al. 2021b), 12,5% en Brasil (de Moraes et al. 2022) y 3,2% en Australia (Fortier et al. 2021) . Esta prevalencia es mucho mayor cuando se analizan animales con enfermedad de Theiler, alcanzando valores entre el 90-100% (Tomlinson et al. 2019a,b, Vengust et al. 2020), mientras que en animales que estuvieron en contacto con animales con enfermedad de Theiler, la prevalencia es del 54-61,8% (Tomlinson et al. 2019b, Baird et al. 2020). En todos estos estudios se analizó la presencia de genoma viral en el suero de los animales (viremia). Los reportes de seroprevalencia de esta enfermedad muestran valores del 15% en Estados Unidos (Divers et al. 2018), 30% en Austria (Badenhorst et al. 2022) y 34,7% en Alemania (Meister et al. 2019a).

Se ha reportado también la presencia de ADN de EqPV-H en lotes de suero equino comercial, provenientes de Nueva Zelanda, Italia, Alemania, Estados Unidos, Canadá y Méjico. El 61% de los lotes analizados resultaron positivos por PCR en tiempo real para EqPV-H y el 77,7% de los mismos presentaban anticuerpos específicos para el virus. Por el contrario, todos los lotes provenientes de Sudamérica (Chile y Brasil) resultaron negativos para EqPV-H (Meister et al. 2019b). Estos datos demuestran el riesgo potencial de transmisión del virus a través de productos a base de suero equino, utilizados tanto para aplicaciones médicas como de investigación.

Estructura del EqPV-H. Los Parvovirus son virus muy pequeños (aprox. 20 nm de diámetro) cuyo genoma está constituido por una única molécula de ADN, que pueden infectar a una amplia gama de huéspedes, incluidos los seres humanos y los animales domésticos y salvajes. Carecen de envoltura, lo que les confiere una gran resistencia en el medio ambiente (Cotmore et al. 2014).

El EqPV-H pertenece a la subfamilia *Parvovirinae* (parovovirus que infectan a vertebrados) y ha sido clasificado dentro del género *Copiparvovirus*, especie *Ungulate copiparvovirus* 6*,* cercanamente relacionado al parvovirus porcino (*Ungulate copiparvovirus* 4) y al parvovirus bovino (*Ungulate copiparvovirus* 1) (Pénzes et al. 2020, Jager et al. 2021).

El grupo de Divers demostró que el genoma viral se encuentra como episoma en el hígado de caballos infectados, y lograron secuenciarlo por la técnica de *primer walking.* El episoma completo de EqPV-H comprende 5308 nucleótidos (nt) y codifica 2 grandes marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*). El primer ORF (1-1779) codifica una proteína no estructural (NS), y el segundo ORF (1801-4722) codifica las proteínas estructurales (VP). Dos regiones intergénicas de 21 nt y 583 nt, respectivamente, conectan dichos ORFs (Divers et al. 2018).

Los estudios filogenéticos se basan en la secuencia de la proteína no estructural NS1, ya que es mucho más conservada que la proteína de la cápside VP1. Hasta el momento, se ha encontrado muy poca diversidad genética entre las variantes identificadas en todo el mundo, reportándose una identidad de secuencia nucleotídica del 94-99% (Divers et al. 2018, Lu et al. 2018, 2020, Meister et al. 2019a, 2019b, Baird et al. 2020, Lee et al. 2021, Yoon et al. 2021a, Badenhorst et al. 2022, de Moraes et al. 2022). Sin embargo, el grupo de Lu et al. (2020) reportaron eventos de recombinación natural en dos cepas chinas identificadas en caballos de carrera de la provincia de Guangdong. Curiosamente, los eventos recombinantes en EqPV-H ocurrieron entre cepas chinas y una cepa estadounidense. Teniendo en cuenta que estos caballos no habían sido tratados con ningún producto de origen equino, los autores sugieren que las frecuentes carreras internacionales de caballos podrían crear oportunidades para el contacto cercano y la transmisión viral entre caballos de diferentes países, y así favorecer un evento de recombinación natural. De manera análoga, Yoon et al. (2021b) identificaron una secuencia recombinante entre una cepa coreana y una china. Considerando la ubicación geográfica y la relación internacional entre China y Corea, los autores proponen que sería factible un evento de recombinación entre dichas cepas en Corea, o bien la transmisión de la cepa recombinante desde China.

Fisiopatología de la infección por EqPV-H. Luego de una infección experimental con EqPV-H, la detección de ADN viral en el suero de los caballos inoculados (viremia) suele ocurrir entre las semanas 2 a 22, dependiendo del inóculo utilizado y la vía de administración. El grupo de Tomlinson et al. (2020) infectaron experimentalmente a 10 caballos sanos por diferentes vías (intravenosa, intraarticular, intranasal u oral) utilizando suero equino conteniendo entre 5×10^6 y 2×10^7 equivalentes genómicos (EG) de EqPV-H. En estos animales, la viremia se detectó en promedio a las 2,3 semanas post-inoculación (pi). En

otro estudio, dos caballos sanos inoculados con toxina antitetánica positiva para EqPV-H por PCR, evidenciaron una viremia más tardía detectándose a las 6,8 semanas pi (Divers et al. 2018). Recientemente, se demostró la infección experimental en caballos inoculados por vía nasal, y en este caso la viremia se detectó luego de las 12 semanas de inoculación en 5 de los 10 animales infectados (Tomlinson y Van de Walle 2022).

Aproximadamente luego de 4 semanas de detectada la viremia se produce la seroconversión, que suele coincidir con el pico de viremia. La mayoría de los animales infectados experimentalmente desarrollan una hepatitis subclínica, determinada por tener al menos 2 enzimas hepáticas por encima del intervalo de referencia. Esta evidencia bioquímica de hepatitis suele ocurrir en la semana del pico de viremia o la semana posterior, y dentro de una semana de la seroconversión (Divers et al. 2018, Tomlinson et al. 2020). En los casos de enfermedad clínica, los signos aparecen entre la semana 4 a 12 luego de la administración del producto biológico, y éstos suelen ser ictericia, falta de apetito, letargo y en algunos casos signos neurológicos como ceguera, obnubilación, presión en la cabeza y ataxia (Chandriani et al. 2013, Divers et al. 2018, Tomlinson et al. 2019a,b, 2020, Baird et al. 2020, Kopper et al. 2020, Vengust et al. 2020). La viremia decae gradualmente luego de la hepatitis aguda, y en algunos animales puede llegar a hacerse indetectable, aunque en la mayoría de ellos el ADN viral persiste en bajos niveles por varias semanas, aún en presencia de altos niveles de anticuerpos (Divers et al. 2018, Tomlinson et al. 2020).

La infección persistente también ha sido reportada en infecciones naturales, observándose una viremia crónica de hasta 5 años en caballos sin signos bioquímicos o patológicos de enfermedad hepática (Reinecke et al. 2021). Por otro lado, al analizar una cohorte de 100 caballos clínicamente normales para determinar la prevalencia de infección por este nuevo virus, se encontró un 13% de animales virémicos y 15% de animales seropositivos para EqPV-H, sugiriendo que la mayoría de los caballos que se infectan naturalmente con EqPV-H no desarrollan la enfermedad clínica (Divers et al. 2018). Por el contrario, algunos animales desarrollan una enfermedad grave y a menudo mortal luego de la infección por EqPV-H (Divers et al. 2018, Tomlinson et al. 2019a), Vengust et al. 2020), desconociéndose aún las causas de estas diferencias en el curso de la infección.

Se ha demostrado que el EqPV-H es hepatotrópico, ya que se ha detectado el genoma viral por la técnica de hibridación *in-situ* en hepatocitos de animales infectados, así como su asociación con la necrosis de hepatocitos e infiltrado linfático (Divers et al. 2018, Tomlinson et al. 2019a, 2020, Baird et al. 2020, Vengust et al. 2020). Asimismo, el hígado fue el órgano con mayor nivel de carga viral en ensayos de infección experimental con EqPV-H, aunque el genoma viral también fue detectado en otros órganos y fluidos como el corazón, bazo, colon, yeyuno, médula ósea, riñón, pulmón, nódulos linfáticos, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo (Tomlinson et al. 2020). En un estudio reciente, el ADN viral se encontró no solo en los hepatocitos sino también en las células epiteliales del conducto biliar y en las células de Kupffer, provenientes de un caso clínico de EqPV-H (Yoon et al. 2021a).

El riesgo de infección activa por EqPV-H parecería aumentar con la edad de los animales, siendo mayor en caballos de edad avanzada (Meister et al. 2019a, Badenhorst et al. 2022). Del mismo modo, los caballos con un historial reproductivo prolongado mostraron tener una prevalencia de infección ligeramente mayor (Meister et al. 2019a).

Hasta el momento no hay evidencia que el EqPV-H esté asociado con otras enfermedades hepáticas diferentes a la enfermedad de Theiler (Zehetner et al. 2021).

TRANSMISIÓN

Transmisión horizontal iatrogénica. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado la infección de caballos mediante la administración de antitoxina tetánica conteniendo EqPV-H (Divers et al. 2018, Tomlinson et al. 2019a, Baird et al. 2020, Kopper et al. 2020, Vengust et al. 2020). El EqPV-H también puede transmitirse a caballos sanos mediante la administración alogénica de células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stromal Cells*) derivadas de médula ósea, especialmente si se usa suero equino en la preparación o cultivo de estas células (Tomlinson et al. 2019a, 2020).

Transmisión horizontal no-iatrogénica. Existe también evidencia de infección por EqPV-H en caballos que estuvieron en contacto con casos de hepatitis sérica y que no fueron tratados con hemoderivados equinos, desconociéndose el modo de transmisión. La detección de ADN de EqPV-H en estos casos demostró ser entre 47 y 54% (Tomlinson et al. 2019b, Baird et al. 2020).

Otro virus equino de transmisión sanguínea, como la anemia infecciosa equina, se transmiten iatrogénicamente mediante el uso de equipo médico contaminado (agujas, equipo dental, etc.) o mecánicamente por los tábanos y la mosca de los establos (Hawkins et al. 1973). Teniendo en cuenta que los insectos que pican están activos en los meses más cálidos y tienden a estar ausentes en el invierno, esto podría ser la razón por la cual los casos de enfermedad de Theiler no asociados a la administración de productos biológicos suelen ocurrir a fines del verano y el otoño (Tomlinson et al. 2019b). A este respecto, existe un único reporte donde se estudió la trasmisión del EqPV-H por insectos. En dicho trabajo se utilizaron moscas de la subfamilia Tabanidae, que son las que transmiten un mayor volumen de sangre por mordida (Foil et al. 1987), las cuales se alimentaron de un caballo inoculado previamente con 5×10^6 EG de EqPV-H. Al analizar por PCR cuantitativa (qPCR) el abdomen o un pool de 8 cabezas de los tábanos, los mismos resultaron positivos para EqPV-H, indicando que los tábanos alimentados de un caballo positivo para EqPV-H podrían ser vectores mecánicos de este virus y transmitirlo a caballos receptores. Sin embargo, en este mismo estudio no fue posible demostrar la transmisión viral a caballos negativos aún con 30 picaduras de tábanos. Teniendo en cuenta las limitaciones del estudio, los autores concluyen que la transmisión mecánica de EqPV-H a través de tábanos no puede descartarse, pero sugieren que este método de propagación probablemente sea ineficiente y requiera una gran cantidad de picaduras

(Tomlinson et al. 2020). El mismo grupo analizó otras vías de transmisión horizontal, y observaron que los caballos infectados experimentalmente con EqPV-H son capaces de diseminar el virus en el ambiente mediante secreciones nasales y orales y en las heces. Dicha diseminación viral fue intermitente y generalmente de bajo título. Teniendo en cuenta estos resultados, los autores evaluaron la posible transmisión del virus por vía nasal u oral. Para ello, inocularon dos caballos sanos por vía intranasal con suero conteniendo 1×10^6 EG de EqPV-H. Luego de 8 semanas de seguimiento, ninguno de los animales presentó viremia detectable, por lo que los mismos animales fueron inoculados por vía oral. Uno de estos animales se volvió virémico luego de 4 semanas de la última inoculación, por lo que los autores concluyen que el virus puede transmitirse por vía oral (Tomlinson et al. 2020). Sin embargo, un trabajo posterior del mismo grupo logró demostrar la transmisión experimental por vía nasal pero no observaron evidencias de transmisión oral (Tomlinson y Van de Walle 2022). En este estudio 11 animales fueron inoculados con 5×10^6 EG de EqPV-H por vía oral y monitoreados durante 8 semanas. Es este tiempo, ninguno de ellos seroconvirtió ni presentó viremia detectable. Los mismos animales fueron luego inoculados por vía intranasal, y en este caso 5 de los animales se volvieron virémicos entre las semanas 6-12 y otros 5 animales presentaron viremia más tardía, incluso en la semana 22 post-inoculación. Esto demuestra que en la transmisión por vía nasal existe una fase prolongada de eclipse hasta la aparición de la viremia detectable, y por ello los autores sugieren que, en su trabajo anterior, donde reportaron la transmisión por vía oral, la infección había sido en realidad consecuencia de la inoculación intranasal del mismo animal ocurrida 12 semanas antes. Es importante tener en cuenta que la dosis utilizada en las inoculaciones experimentales por vía intranasal se encuentra dentro de los valores más altos reportados en excreciones nasales, siendo de menor valor en la mayoría de los casos (Tomlinson et al. 2020). Por lo tanto, se desconoce aún la dosis mínima requerida para que los animales se infecten naturalmente por esta vía.

Posteriormente a los estudios de infección experimental reportados por el grupo de Tomlinson, diferentes autores reportaron las primeras evidencias de excreción nasal y oral de EqPV-H en infecciones naturales (Pusterla et al. 2021, Yoon et al. 2021a), así como la excreción viral en heces, habiéndose detectado el material genético en el 1% de hisopados nasales (Pusterla et al. 2021) y 5,3% de las muestras de heces (Yoon et al. 2021b). Sin embargo, la excreción natural del ADN viral no implica su infectividad, por lo que si bien estas secreciones podrían estar involucradas en la transmisión horizontal se necesitan más datos para determinar la correlación entre la excreción viral y la transmisión natural.

Transmisión vertical. Con el objetivo de analizar la posible transmisión vertical, se analizaron por qPCR muestras de suero tomadas antes del calostrado, de 15 potros nacidos de yeguas positivas para EqPV-H. Ninguno de los potros resultó positivo para EqPV-H, indicando que no hubo transmisión *in útero* (Tomlinson et al. 2020). Si bien hasta el momento no fue posible demostrar la transmisión mecánica por tábanos ni la transmisión vertical del EqPV-H, se requieren estudios adicionales para confirmar si estos resultados reflejan realmente la ausencia de transmisión por estas vías, o una transmisión ineficiente.

Transmisión entre especies. La infección por EqPV-H ha sido recientemente descripta en otra especie del género Equus. Reinecke et al. (2021) detectaron anticuerpos específicos y ADN de EqPV-H en el suero de cuatro burros provenientes de Bulgaria y uno de Italia, aunque con una prevalencia muy baja (0,8%). En el mismo estudio se analizaron muestras séricas de cebras y mulas, pero no fue posible detectar el material genético de EqPV-H en estas especies. Será necesario examinar una gran población de équidos que no sean caballos para conocer fehacientemente la especificidad de especie de este nuevo parvovirus.

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Si un caballo adulto muestra signos de insuficiencia hepática aguda y, según la anamnesis, se le administró un producto biológico equino alrededor de 4 a 10 semanas antes, se debe considerar el EqPV-H como un posible diagnóstico diferencial. El diagnóstico definitivo de EqPV-H se logra mediante la técnica de PCR a partir de una muestra de suero o tejido hepático. El examen histopatológico de una biopsia hepática puede ser útil para identificar o excluir causas adicionales de hepatitis (Mittel et al. 2021, Gerhard 2022).

No existe un tratamiento específico para la infección por EqPV-H. Los caballos asintomáticos no requieren ningún tratamiento, aunque el monitoreo de la bioquímica sérica puede ser útil para controlar el aumento en la actividad de las enzimas hepáticas. El tratamiento de los caballos clínicamente afectados se basa principalmente en la atención de apoyo y el tratamiento de la disfunción hepática. Es posible que se requiera la derivación a un centro de cuidados intensivos para los caballos gravemente enfermos (Mittel et al. 2021, Gerhard 2022).

EqPV-H en productos biológicos. Los principales productos biológicos obtenidos a partir de los caballos son la sangre y el plasma, que se utilizan para la producción de sueros hiperinmunes y/o inmunoglobulinas purificadas (homólogos y heterólogos, como por ejemplo antitoxinas, antiofídicos, anti-COVID), producción de hormonas (como la Gonadotrofina coriónica equina o PMSG), y producción de suero equino (fetal o de animales adultos) como complemento en medios de cultivo celular para el crecimiento de virus, producción de vacunas, criopreservación, etc. Varios de estos productos están autorizados para su uso en salud, tanto para diferentes especies animales como para humanos (Zylberman et al. 2020, Manteca Vilanova et al. 2021, Li et al. 2023).

Todos los productos biológicos son susceptibles de contaminación por agentes extraños, y los virus son motivo de especial preocupación, ya que son generalmente más difíciles de detectar que otros contaminantes como bacterias u hongos (Garnick 1998, Merten 2002, Barone et al. 2020). Actualmente, la seguridad viral de los productos biológicos se basa en tres pilares: la selección de materias

primas apropiadas con un bajo riesgo de contener virus adventicios; controles de bancos de células y materiales biológicos utilizados en el proceso para garantizar que estén libres de virus detectables; y finalmente, la incorporación de etapas para eliminar e inactivar posibles contaminantes virales endógenos y adventicios no detectados durante la elaboración del biofármaco (European Medicines Agency. ICH Topic Q5A(R1), 1997, Plavsic 2016).

La selección de los equinos donantes de material biológico es el primer paso para cumplir con la seguridad viral de estos productos. Por lo tanto, es imprescindible realizar un correcto control de las infecciones virales que pueden comprometer la calidad final del material obtenido del donante.

A pesar de que la investigación sobre EqPV-H todavía está en sus inicios, la relevancia de este virus es cada vez más evidente. La presencia de EqPV-H en productos biológicos autorizados plantea un riesgo recientemente identificado e inaceptable, que requiere la adopción de medidas reglamentarias. Es por ello que, en el año 2019, el Centro de Biológicos Veterinarios (CVB), perteneciente al APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha tomado medidas para garantizar que todos los productos biológicos derivados de plasma o suero equino con licencia comercial resulten negativos para EqPV-H. Por lo tanto, todos los caballos utilizados como animales donantes para la elaboración de productos biológicos, así como los productos finales obtenidos, deben testearse anualmente y resultar negativos para este virus mediante PCR en tiempo real (qPCR) (Rippke Byron, 2019). Estas restricciones sanitarias, muy probablemente se comiencen a implementar en otros países a la brevedad.

En Argentina no existen hasta el momento reportes sobre la presencia de EqPV-H en planteles equinos locales, ni en sueros equinos comerciales de origen nacional. Brasil fue el único país de Sudamérica donde se ha reportado la circulación de este virus, detectándose el ADN de EqPV-H en el 12,5% de los caballos analizados (de Moraes et al. 2022). Por tal motivo, sería de vital importancia conocer el estado de la infección por EqPV-H en caballos de Argentina, con el objetivo de controlar una posible diseminación de la infección y contribuir al control de los productos biológicos de origen equino que se producen en el país, de manera de poder asegurar la calidad de los mismos cumpliendo con normativas vigentes de seguridad que posibiliten su uso y exportación. A este respecto, el laboratorio de Virus Adventicios del Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) del INTA Castelar, en colaboración con el APHIS (USDA, USA), se encuentra en el proceso de estandarización y validación de una qPCR para detectar el ADN del EqPV-H en muestras de suero y plasma, según el protocolo ya desarrollado por APHIS.

CONCLUSIONES

La contaminación viral de productos biofarmacéuticos es un riesgo con consecuencias muy severas. Por ello, la industria biotecnológica debe pasar por estrictos controles que garanticen la seguridad de sus productos.

El EqPV-H es un nuevo agente viral detectado en equinos lo que ha evidenciado el potencial riesgo de transmisión a través de productos biológicos obtenidos de estos animales, sobre todo considerando que la mayoría de los caballos infectados no presentan signos clínicos. Resulta entonces imprescindible disponer de métodos diagnósticos confiables que permitan conocer la situación sanitaria de los equinos en relación al EqPV-H, de manera de poder garantizar la seguridad y calidad de los productos biológicos derivados de ellos, contribuyendo a la industria biotecnológica nacional e internacional.

ORCID

Ruiz, V. https://orcid.org/0000-0002-5000-2819
Alvarez, I. https://orcid.org/0000-0001-5194-670X

REFERENCIAS

1. Aleman M, Nieto JE, Carr EA, Carlson GP. Serum Hepatitis Associated with Commercial Plasma Transfusion in Horses. *J Vet Intern Med.* 2005; 19: 120-122.
2. Altan E, Li Y, Sabino-Santos G, Sawaswong V, Barnum S, Pusterla N, et al. Viruses in Horses with Neurologic and Respiratory Diseases. *Viruses* 2019; 11: 1-12.
3. Badenhorst M, de Heus P, Auer A, Tegtmeyer B, Stang A, Dimmel K, et al. Active equine parvovirus-hepatitis infection is most frequently detected in Austrian horses of advanced age. *Equine Vet. J.* 2022; 54: 379-389.
4. Baird J, Tegtmeyer B, Arroyo L, Stang A, Brüggemann Y, Hazlett M, et al. The association of Equine Parvovirus-Hepatitis (EqPV-H) with cases of non-biologic-associated Theiler's dise*ase on a farm* in Ontario, Canada. *Vet. Microbiol.* 2020; 242: 108575.
5. Barone PW, Wiebe ME, Leung JC, Hussein ITM, Keumurian FJ, Bouressa J, et al. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38: 563-572.
6. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N, et al. Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *J. Virol.* 2012; 86: 6171-6178.
7. Chandriani S, Skewes-Cox P, Zhong W, Ganem DE, Divers TJ, Van Blaricum AJ, et al. Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110: E1407-E1415.
8. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini J A, Mukha DV, Pintel D J, Qiu J, et al. The family Parvoviridae. *Arch. Virol.* 2014; 159: 1239-1247.
9. de Moraes MVD S, Salgado CRS, Godoi TLOS, de Almeida FQ, Chalhoub FLL, de Filippis AMB, et al. Equine parvovirus-hepatitis is detected in South America, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2022; 69: 3022-3027.

10. Divers TJ, Tennant BC, Kumar A, McDonough S, Cullen JM, Bhuva N, et al. A new parvovirus associated with serum hepatitis in horses following inoculation of a common equine biological. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24: 303-310.
11. Divers TJ, Tomlinson JE, Tennant BC. The history of Theiler's disease and the search for its aetiology. *Vet. J.* 2022; 287: 105878.
12. European Medicines Agency. ICH Topic Q5A(R1). Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. 1997. Disponible en: http://www.emea.eu.int.
13. Foil LD, Adams WV, McManus JM, Issel CJ. Bloodmeal residues on mouthparts of Tabanus fuscicostatus (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *J. Med. Entomol.* 1987; 24: 613-616.
14. Fortier C, Hage C, Hue E, Sutton G, Marcillaud-Pitel C, Jeffers K, et al. Hepatitis viruses: prevalence of equine parvovirus-hepatitis virus and equine hepacivirus in France and Australia. *Equine Vet. J.* 2021; 53: 68-68.
15. Garnick RL. Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture. *Dev. Biol. Stand.* 1998; 93: 21-29.
16. Gerhard, C. Equine parvovirus – an update on the aetiology of acute serum hepatitis. *Laboklin*, 2022; 4-7.
17. Guglick MA, MacAllister CG, Ely RW, Edwards WC. Hepatic disease associated with administration of tetanus antitoxin in eight horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995; 206: 1737-1740.
18. Hawkins JA, Adams WV, Cook L, Wilson BH, Roth EE. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus hine*) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission in equine infectious anemia to ponies in Louisiana. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34: 1583-1586.
19. Jager MC, Tomlinson JE, Lopez-Astacio RA, Parrish CR, Van de Walle GR. Small but mighty: old and new parvoviruses of veterinary significance. *Virol. J.* 2021; 18: 1-29.
20. Kapoor A, Simmonds P, Cullen JM, Scheel TKH, Medina JL, Giannitti F, et al. Identification of a Pegivirus (GB Virus-Like Virus) That Infects Horses. *J. Virol.* 2013; 87: 7185-7190.
21. Kopper JJ, Schott HC, Divers TJ, Mullaney T, Huang L, Noland E, et al. Theiler's disease associated with administration of tetanus antitoxin contaminated with nonprimate (equine) hepacivirus and equine parvovirus-hepatitis virus. *Equine Vet. Educ.* 2020; 32, e5-e9.
22. Lee SK, Park D, Lee I. Molecular prevalence of equine parvovirus-hepatitis in the sera of clinically healthy horses in south korea. *Vet. Sci.* 2021; 8: 1-12.
23. Li E, Han Q, Bi J, Wei S, Wang S, Zhang Y, et al. Therapeutic equine hyperimmune antibodies with high and broad-spectrum neutralizing activity protect rodents against SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1066730
24. Lu G, Sun L, Ou J, Xu H, Wu L, Li S. Identification and genetic characterization of a novel parvovirus associated with serum hepatitis in horses in China. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7: 1-7.
25. Lu G, Wu L, Ou J, Li S. Equine Parvovirus-Hepatitis in China: Characterization of Its Genetic Diversity and Evidence for Natural Recombination Events Between the Chinese and American Strains. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 1-8.
26. Lyons S, Kapoor A, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, Corcoran B, et al. Viraemic frequencies and seroprevalence of non-primate hepacivirus and equine pegiviruses in horses and other mammalian species. *J. Gen. Virol.* 2014; 95: 1701-1711.
27. Madsen D. Equine encephalomyelitis. *Utah Acad Sci Arts Lett.* 1934; 11: 95-99.
28. Manteca Vilanova X, Beaver B, Uldahl M, Turner PV. Recommendations for Ensuring Good Welfare of Horses Used for Industrial Blood, Serum, or Urine Production. *Animals* 2021; 11: 1466
29. Meister TL, Tegtmeyer B, Brüggemann Y, Sieme H, Feige K, Todt D, et al. Characterization of equine parvovirus in thoroughbred breeding horses from Germany. *Viruses* 2019a; 11(965): 1-11.
30. Meister TL, Tegtmeyer B, Postel A, Cavalleri JM, Todt D, Stang A, et al. Equine Parvovirus-Hepatitis Frequently Detectable in Commercial Equine Serum Pools. *Viruses* 2019b; 11(461): 1-9.
31. Merten OW. Virus contaminations of cell cultures-A biotechnological view. *Cytotechnology.* 2002; 39: 91-116.
32. Messer NT, Johnson PJ. Idiopathic acute hepatic disease in horses: 12 cases (1982-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994; 204: 1934-1937.
33. Mittel L, Norton P, Tomlinson J. Divers T. Equine Parvovirus-Hepatitis Virus (EqPV-H). 2021. Disponible en: https://aaep.org/sites/default/files/2021-03/Equine_Parvovirus_Hepatitis_Virus_Control_Guidelines.pdf.
34. Panciera R. Serum hepatitis in the horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1969; 155: 408-410.
35. Pénzes JJ, Söderlund-Venermo M, Canuti M, Eis-Hübinger AM, Hughes J, Cotmore SF, et al. Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch. Virol.* 2020; 165: 2133-2146.
36. Pfaender S, Cavalleri JMV, Walter S, Doerrbecker J, Campana B, Brown, R. J. P., et al. Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. *Hepatology.* 2015; 61: 447-459.
37. Plavsic M. An Integrated Approach to Ensure the Viral Safety of Biotherapeutics. *BioPharm Intl*. 2016; 29(5): 40-45.
38. Postel A, Cavalleri JMV, Pfaender S, Walter S, Steinmann E, Fischer N, et al. Frequent presence of hepaci and pegiviruses in commercial equine serum pools. *Vet. Microbiol.* 2016; 182: 8-14.
39. Pusterla N, James K, Barnum S, Delwart E. Investigation of Three Newly Identified Equine

Parvoviruses in Blood and Nasal Fluid Samples of Clinically Healthy Horses and Horses with Acute Onset of Respiratory Disease. *Animals* 2021; 11: 1-8.
40. Ramsay JD, Evanoff R, Wilkinson TE, Divers TJ, Knowles DP, Mealey RH. Experimental transmission of equine hepacivirus in horses as a model for hepatitis C virus. *Hepatology.* 2015; 61: 1533-1546.
41. Reinecke B, Klöhn M, Brüggemann Y, Kinast V, Todt D, Stang A, et al. Clinical Course of Infection and Cross-Species Detection of Equine Parvovirus-Hepatitis. *Viruses* 2021; 13(1454): 1-15.
42. Reuter G, Maza N, Pankovics P, Boros Á. Non-primate hepacivirus infection with apparent hepatitis in a horse. Short communication. *Acta Vet. Hung.* 2014; 62: 422.427.
43. Rippke Byron. 2019. CENTER FOR VETERINARY BIOLOGICS NOTICE NO. 19-03. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/notice_19_03.pdf.
44. Scheel TKH, Kapoor A, Nishiuchi E, Brock KV, Yu Y, Andrus L, et al. Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; 112: 2192-2197.
45. Shahan M. "Secondary" disease occurring subsequent to infectious equine encephalomyelitis. *Vet. Med.* 1939; 34: 354-358.
46. Step D, Blue J, Dill S. Penicillin-induced hemolytic anemia and acute hepatic failure following treatment of tetanus in a horse. *Cornell Vet.* 1991; 81: 13-18.
47. Sturgeon B. Theiler's disease. *Vet. Rec.* 2017; 180: 14-15.
48. Tang W, Zhu N, Wang H, Gao Y, Wan Z, Cai Q, et al. Identification and genetic characterization of equine Pegivirus in China. *J. Gen. Virol.* 2018; 99: 768-776.
49. Theiler A. Acute Liver-Atrophy and Parenchymatous Hepatitis in Horses.,in *Union of South Africa. Dept. of Agriculture. 5th and 6th Repts. of the Director of Veterinary Research.* 1918. p.7-164.
50. Thomsett L. Acute Hepatic Failure in the Horse. *Equine Vet. J.* 1971; 3: 15-19.
51. Tomlinson JE, Jager M, Struzyna A, Laverack M, Fortier LA, Dubovi E, et al. Tropism, pathology, and transmission of equine parvovirus-hepatitis. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9: 651-663.
52. Tomlinson JE, Kapoor A, Kumar A, Tennant BC, Laverack MA, Beard L, et al. Viral testing of 18 consecutive cases of equine serum hepatitis: A prospective study (2014-2018). *J. Vet. Intern. Med.* 2019a; 33: 251-257.
53. Tomlinson JE, Tennant BC, Struzyna A, Mrad D, Browne N, Whelchel D, et al. Viral testing of 10 cases of Theiler's disease and 37 in-contact horses in the absence of equine biologic product administration: A prospective study (2014-2018). *J. Vet. Intern. Med.* 2019b; 33: 258-265.
54. Tomlinson JE, Van de Walle GR, Divers TJ. What Do We Know About Hepatitis Viruses in Horses? *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 2019c; 35: 351-362.
55. Tomlinson JE, Van de Walle GR. Nasal transmission of equine parvovirus hepatitis. *J. Vet. Intern. Med.* 2022; 36: 1-7.
56. Vengust M, Jager MC, Zalig V, Cociancich V, Laverack M, Renshaw R W, et al. First report of Equine Parvovirus-Hepatitis-associated Theiler's disease in Europe. *Equine Vet. J.* 2020; 52: 841-847.
57. Yoon J, Park T, Kim A, Park J, Park BJ, Ahn HS, et al. First Clinical Case of Equine Parvovirus-Hepatitis-Related Theiler's Disease in Asia. 2021a; 13(1917): 1-9.
58. Yoon J, Park T, Kim A, Song H, Park BJ, Ahn HS, et al. First report of equine parvovirus-hepatitis and equine hepacivirus coinfection in horses in Korea. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2021b; 1-12.
59. Zehetner V, Cavalleri JMV, Klang A, Hofer M, Preining I, Steinborn R, et al. Equine Parvovirus-Hepatitis Screening in Horses and Donkeys with Histopathologic Liver Abnormalities. *Viruses.* 2021; 13: 1-17.
60. Zylberman V, Sanguineti S, Pontoriero AV, Higa SV, Cerutti ML, Seijo SMM, et al. Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in argentina. *Medicina.* 2020; 80: 1-6.

Citación recomendada
Ruiz V, Alvarez I. Parvovirus Equino-Hepatitis (EqPV-H): Un nuevo virus contaminante de productos biológicos de origen veterinario. *Rev. Vet*. 2023; 34(2): 134-141. doi: hftp://dx.doi.org/