

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DE ANEMIA INFECCIOSA, INFLUENZA A, HERPES
Y ENCEFALITIS DEL OESTE DEL NILO EN EQUINOS DE BAJA
CALIFORNIA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO
EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA BERMÚDEZ GALVÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

FEBRERO DE 2014

COMITÉ ASESOR

Esta tesis se realizó bajo la dirección del comité de tesis indicado, ha sido revisada y aceptada por el mismo, como requisito parcial para la obtención del grado de maestro en ciencias veterinarias.

Dr. Gilberto López Valencia
Director de tesis

M.C Luis Mario Muñoz Del Real
Co-director

Dr. Francisco Javier Monge Navarro
Asesor

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

Dr. José Carloman Herrera Ramírez
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi director Gilberto López Valencia por creer y confiar en mí, además de aportar su sabiduría y aliento.

A mis asesores Gerardo Medina, Luis Mario Muñoz Del Real, José Carlomán Herrera Ramírez y Francisco Monge Navarro por sus apreciables consejos y la paciencia para que se realizara este proyecto.

A mi maestra Sawako Hori por sus asesorías y apoyo.

A la M.C Issa Carolina García Reynoso por su gran aportación en este proyecto.

A los médicos Luis Alonso Núñez y Mónica Ayón por aportar los casos clínicos para que se llevara a cabo esta investigación.

A mi equipo de laboratorio conformado por Elizama Ponce Barraza, Javier Palacios Torres, Jennifer Brisuela Raygosa, José Luis Rodríguez Castro y Tomas Cárdenas Reyna por hacer de mi tiempo en el laboratorio una gran experiencia.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por prestarme sus instalaciones.

Por último, a CONACYT por su gran apoyo económico.

DEDICATORIA

A mi familia por ser siempre mi principal motivo para salir adelante.

RESUMEN

Se realizó un estudio epidemiológico observacional transversal con el fin de confirmar la presencia de influenza (IE), herpesvirus (EHV), anemia infecciosa (AIE) y encefalitis del oeste del Nilo (VON), en equinos del valle de Mexicali. Se colectaron muestras de sangre y exudado nasal de 23 animales que presentaban signos clínicos compatibles con cualquiera de las enfermedades estudiadas. Las muestras fueron procesadas para extraer ADN y ARN y probadas por medio de la técnica de reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) usando SYBR Green para identificar regiones específicas del genoma de cada virus. De las 23 muestras analizadas, 1 (4.3%) resultó positiva para EHV-1, 7 (30.4%) para IE, 2 (8.7%) para VON y 3 (13.0%) para AIE, para una prevalencia global de 56.5% (13/23). Las muestras fueron probadas en forma paralela por AGID a AIE resultando solo una muestra positiva. Los resultados de este estudio confirman la presencia de estas enfermedades en Baja California, sin embargo; es necesario realizar estudios epidemiológicos y genéticos más amplios para establecer la frecuencia, distribución y factores de riesgo de las enfermedades en la población equina así como identificar las cepas virales que circulan en la región. Es urgente sensibilizar a los propietarios, organizadores de eventos ecuestres y a la autoridad de salud animal para que la normatividad se cumpla y se logre el verdadero control de estas enfermedades en las poblaciones equinas de Baja California y el país.

Palabras clave: influenza equina, herpes virus equino, anemia infecciosa equina, encefalitis del oeste del Nilo, RT-PCR.

ABSTRACT:

A cross-sectional epidemiological study was conducted in order to confirm the presence of influenza (EI), herpesvirus (EHV), infectious anemia (EIA) and West Nile virus (WNV) in horses from the Mexicali Valley. Blood samples and nasal swabs of 23 animals showing clinical signs consistent with any of the diseases studied were collected. Samples were processed to extract DNA and RNA and tested by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and SYBR Green to identify specific regions of the genome of each virus. From the 23 samples tested, 1 (4.3%) resulted positive for EHV-1, 7 (30.4%) for IE, 2 (8.7%) for WNV and 3 (13.0%) for AIE, for an overall prevalence of 56.5% (13/23). The samples were tested in parallel by AGID to EIA resulting in only one positive sample. The results of this study confirm the presence of these diseases in Baja California, however; there is the need for larger epidemiological and genetic studies to establish the frequency, distribution and risk factors to the diseases in equine population and viral strains circulating in the region. It is urgent to inform owners, organizers of equestrian events and animal health authorities to follow regulations to achieve control of these diseases in the equine population of Baja California and the country.

Keywords: Equine Influenza virus, equine herpesvirus, equine infectious anemia, west Nile virus, RT-PCR

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT:.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	4
III. HIPÓTESIS:.....	4
IV ANTECEDENTES	5
4.1. INFLUENZA EQUINA.....	5
4.1.1. Historia.....	5
4.1.2. Historia natural de la enfermedad	5
4.1.3. Epidemiología	6
4.1.4. Diagnóstico	7
4.1.5. Prevención y control	8
4.2. HERPES EQUINO.....	9
4.2.1. Historia.....	9
4.2.2. Historia natural de la enfermedad	9
4.2.3. Epidemiología	10
4.2.4. Diagnóstico	12
4.2.5. Prevención y control	13
4.3. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	14
4.3.1. Historia.....	14
4.3.2. Historia natural de la enfermedad	14

4.3.3. Epidemiología	15
4.3.4. Diagnóstico	17
4.3.5. Prevención y control	17
4.4. ENCEFALITIS DEL OESTE DEL NILO	18
4.4.1 Historia.....	18
4.4.2 Historia natural de la enfermedad	19
4.4.3. Epidemiología	20
4.4.4. Diagnóstico	22
4.4.5. Prevención y control	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Localización del área de estudio	24
5.2. Diseño del estudio.....	24
5.5. Análisis de laboratorio	26
5.5.1. Extracción de ARN y ADN	26
5.5.2. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	26
5.5.3. Prueba de inmunodifusión en placas de gel de agar (AGID) (prueba de Coggins)	28
5.6. Análisis de datos	30
VI. RESULTADOS	31
VII. DISCUSIÓN.....	35
VIII. CONCLUSIÓN.....	38
IX. LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Página
1	Características de la población estudiada.....	29
2	Detección de enfermedades virales mediante las pruebas de Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real y Prueba de Inmunodifusión en Placa de Gel de Agar.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Interpretación de resultados de la prueba del agar en gel de inmunodifusión.....	27
2	Imágenes de resultados a AIE mediante la prueba de AGID.....	32

I. INTRODUCCIÓN

Las principales enfermedades respiratorias en equinos son de origen viral, donde la función pulmonar es la principal afectada lo que repercute en una disminución del rendimiento del animal. Cuando los animales no son tratados adecuadamente, estas enfermedades se vuelven crónicas produciendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica y hemorragias inducidas por el ejercicio (Carman et al., 1993). Este grupo de virus son altamente contagiosos y producen pérdidas económicas por concepto de costos adicionales por diagnóstico y tratamientos médicos, además que interrumpen sus competencias (Lewis et al., 2011); algunas de ellas son capaces de producir abortos (Ataseven et al., 2009), bajo rendimiento del animal e incluso la muerte. La anemia infecciosa equina, virus de influenza A, herpes equino tipo 1 y tipo 4 y virus de encefalitis del oeste del Nilo son enfermedades incluidas en la lista A de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Internacional de Epizootias (OIE) debido a que se distribuyen prácticamente en todo el mundo.

En Estados Unidos (E.U) se ha presentado un incremento de enfermedades virales principalmente virus del oeste del Nilo (VON). En 2002 estas enfermedades provocaron que se sacrificaran 15,257 caballos afectados en 43 estados. Sólo en Dakota del Norte, los costos totales fueron \$ 1.9 millones de dólares (Mongoh et al., 2008). A partir del 04 de septiembre 2012, el Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) ha informado 181 casos de VON y sobre todo en California, ya que hasta el 17 de septiembre de 2012, han sido reportados al Departamento de Alimentos y Agricultura de California (CDFA) en 11 condados, 21 casos de los cuáles 6 han sido sacrificados (USDA, APHIS, 2012).

En México, la información sobre las tasas de prevalencia de anemia infecciosa equina, virus de influenza A, virus de encefalitis del oeste del Nilo

son pocos y aislados, particularmente para en el caso de anemia infecciosa equina, enfermedad de notificación obligatoria ante la organización internacional de epizootias (OIE), donde se reportaron 103 casos entre los años 1997 a 2001; sin embargo una importante cantidad de esos casos no fueron confirmados. Un estudio realizado por Sandoval et al., (2007), muestran una prevalencia serológica de 0.7 % para anemia infecciosa equina en el estado de Baja California. Otro estudio similar revela una prevalencia serológica de 22% en el estado de Guerrero y 58% para el estado de Nuevo León para VON (Blitvich, 2010). En Yucatán, los reportes de prevalencia serológica indican un 25% para influenza equina y 15% para encefalitis del oeste del Nilo en los equinos del estado (Loroño-Pino, 2010). Es importante señalar que no se cuenta con reportes de prevalencia de herpes virus tipo 1 y tipo 4 para ninguna de las entidades federativas de México.

En México, no se cuenta con información clínica ni epidemiológica sobre estas enfermedades, debido a una falta de cultura para notificar los casos de enfermedad por parte de los propietarios y de los Médicos Veterinarios que atienden esas poblaciones de equinos. En ese sentido, la Delegación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en Baja California, emitió un comunicado de alerta ante el aumento de casos reportados en los Estados Unidos a través de la Coordinación de la Comisión México- Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales CPA (Vargas, 2012). Considerando que la mayoría de los caballos utilizados para reproducción y carreras en México provienen de E.U., es evidente que este hecho representa un riesgo sanitario para los equinos de nuestro país.

Por lo anterior y considerando la importancia de estas enfermedades virales en los equinos, es urgente proponer y realizar estudios epidemiológicos que permitan establecer la presencia, distribución y prevalencia de las enfermedades provocadas por el virus de la anemia infecciosa equina, virus de

influenza A, herpes equino tipo 1 y tipo 4 y virus del oeste del Nilo, con el propósito de sugerir e implementar las estrategias de prevención y control más apropiadas y reducir el riesgo de brotes epidémicos en las poblaciones de equinos de nuestro país.

II. OBJETIVO

Establecer la presencia de anemia infecciosa, influenza A, herpes virus y encefalitis del oeste del Nilo a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en equinos del estado de Baja California.

III. HIPÓTESIS:

Los virus de anemia infecciosa, influenza A, herpes virus y encefalitis del oeste del Nilo están presentes y producen enfermedad en las poblaciones de equinos del estado de Baja California.

IV ANTECEDENTES

4.1. INFLUENZA EQUINA

4.1.1. Historia

La influenza equina (IE) ha sido reconocida como una enfermedad común del caballo durante siglos y es considerada la enfermedad respiratoria de mayor importancia económica de los equinos en países dedicados a la cría de caballos y la industria de carreras (Quinlivan et al., 2005b). Antes del conocimiento de la virología, se documentaron epizootias equinas altamente sugestivas a influenza y durante el siglo XIII se documenta una epizootia de IE asociada con una epidemia de gripe generalizada en Europa (Law, 1874). El virus de IE subtipo H7N7 se aisló por primera vez en 1956 durante una epizootia (Webster et al., 1992a) y el virus de IE subtipo H3N8 fue aislado e identificado en caballos en 1963 (Waddell et al., 1963).

4.1.2. Historia natural de la enfermedad

Etiología

El virus de IE pertenece a la familia Orthomyxoviridae, género Influenzavirus A (Lu et al., 2010). El virus de IE del subtipo H3N8 es el agente causante de la enfermedad en caballos y otros équidos. El último brote de IE H7N7 ocurrió en 1978, pero aparentemente se ha extinguido de los equinos ya que no se ha vuelto a aislar de animales enfermos (Webster et al., 1992b). Éstos virus son pleomórficos, esféricos o filamentosos con un diámetro de 80-120 nm. Su genoma consiste de RNA de banda sencilla y polaridad negativa. El octavo segmento del su genoma codifica para dos glucoproteínas de superficie; la hemaglutinina (HA) y neuramidasa (NA), las cuales son altamente antigénicas y son la base de la tipificación viral (McGorum, 2007).

El virus es un patógeno importante en el caballo que provoca brotes periódicos de la enfermedad incluso en poblaciones con alta cobertura de vacunación (Murcia et al., 2011).

Patogénesis

Cuando un huésped está infectado con el virus de la influenza, el sistema inmune responde de muchas maneras. Uno de los mecanismos de defensa es la generación de anticuerpos que reconocen la hemaglutinina, una proteína de superficie del virus que permite el acceso del virus a la célula huésped (Askonas et al., 1982). El virus es inactivado cuando los anticuerpos se unen a este sitio antigénico clave (Dimmock, 1984).

Signos clínicos

Las infecciones por IE se complican frecuentemente con enfermedades bacterianas secundarias, con consecuencias graves y, a veces mortales. Los signos que se extienden rápidamente incluyen fiebre alta, disnea, tos, mialgias, anorexia y agrandamiento de los ganglios linfáticos regionales (Bountouri et al., 2011). Experimentalmente, se ha demostrado que las dosis infectantes altas acortan el período de incubación, aumentan la duración de la excreción del virus y producen los signos clínicos más severos (Mumford et al., 1990).

4.1.3. Epidemiología

Se transmite por contacto directo, incluso aerosoles (Baguelin et al., 2009). El virus de la influenza H3N8 se propaga rápidamente en caballos susceptibles y puede resultar en una morbilidad muy alta dentro de 24 a 48 horas después de la exposición al virus (Lu et al., 2009).

Frecuencia

La IE ocurre normalmente en forma de brotes asociados a la introducción del virus en una población de caballos susceptibles (Radostits O.M, 2002).

Distribución

El virus de IE es una causa importante de enfermedades respiratorias agudas en los caballos en la mayor parte del mundo (Boliar et al., 2006). Islandia y Nueva Zelanda son los únicos países en donde nunca ha ocurrido un brote de IE (Sellon y Long, 2007)

Factores de riesgo

Los factores de riesgo están directamente asociados a las propiedades intrínsecas del virus, a la patogénesis de la enfermedad, la capacidad del sistema inmunológico del caballo, a la estructura de la población equina y al tipo de actividad de la industria equina. Durante las últimas dos décadas, un factor clave en la propagación de la influenza equina ha sido el aumento en el transporte de caballos a largas distancias. Los caballos que están incubando la enfermedad o que presentan la infección clínica o subclínica, pueden introducir la infección en una población susceptible si no se realizan cuarentenas (McGorum, 2007). Las epidemias ocurren cuando uno o más caballos infectados en la fase aguda se introducen en un grupo susceptible (Clarence M, 1991).

4.1.4. Diagnóstico

Distintos estudios demuestran que la prueba de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es un procedimiento eficaz en la detección de la diseminación del virus en caballos seropositivos (Quinlivan et al., 2005). En un estudio que compara la sensibilidad de la detección del virus por cultivo, la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) e inmunoensayo enzimático, PCR demostró ser el método más sensible para la detección de virus (Quinlivan et al., 2004). El PCR también permite la caracterización del aislado a través de la secuenciación de los genes virales (Pusterla et al., 2006a).

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) es capaz de detectar anticuerpos específicos contra el subtipo de hemaglutinina del virus de la influenza. La IH es una prueba rápida y rentable con una reproducibilidad de 84% a 96% para myxovirus. Sin embargo, tiene la desventaja de ser afectado por los inhibidores no específicos presentes en suero equino, pero varias técnicas se utilizan para eliminar los inhibidores inespecíficos del suero equino, incluyendo el tratamiento de calor, la absorción de los eritrocitos, utilización de tripsin-periodato (TP) y los receptores de destrucción de la enzima (ERD) de *Vibrio cholerae* (Boliar et al., 2006).

4.1.5. Prevención y control

La prevención de la influenza equina requiere manejo de higiene y prácticas de vacunación. La exposición puede ser reducida por el aislamiento durante dos semanas de caballos recién introducidos. Existen vacunas disponibles comercialmente para su prevención (Clarence M, 1991). En México el Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA) recomienda que los equinos sean vacunados al menos cada 6 meses, aplicando la primera dosis a los 6 meses de edad, la segunda a los 7 meses y a los 8 meses la tercer dosis, después cada 4 a 6 meses (CONASA, 2008). El movimiento internacional de los caballos destinados a las competencias es cada vez mayor y la cría presenta un desafío con respecto a la lucha contra la influenza equina. Adicionalmente, es común que caballos con infección subclínica sean transportados aplicando períodos cortos de cuarentena, lo cual a menudo no logra evitar la introducción de la enfermedad a una zona con animales susceptibles, extendiendo la zona de influencia de la enfermedad (McGorum, 2007).

4.2. HERPES EQUINO

4.2.1. Historia

La relación entre la infección por herpes virus equino tipo 1 (HVE-1) y el aborto fue reconocido por primera vez en Kentucky en 1932. Para 1959, las principales diferencias antigénicas entre las cepas de HVE-1 fueron reportadas en Japón (McGorum, 2007). El primer gamma herpes virus descubierto en el caballo fue aislado en 1962 del tracto respiratorio de un potrillo con catarro. En la década de 1970, se propuso la idea que las cepas de HVE-1 asociadas con el aborto y las que producían enfermedades respiratorias eran diferentes subtipos de virus. El herpes virus equino tipo 2 (HVE-2) fue aislado por primera vez en Argentina en 1997 (Galosi et al., 2005).

4.2.2. Historia natural de la enfermedad

Etiología

Se han identificado ocho herpesvirus en équidos: cinco pertenecen a la subfamilia *Alfaherpesvirinae* y tres en la *Gamaherpesvirinae* (Patel y Heldens, 2005). El caballo es el huésped natural del herpesvirus equino 1, 3, y 4 (HVE-1, HVE-3, y HVE-4) pertenecen a la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, mientras que el HVE-2 y HVE-5 se clasifican dentro de la subfamilia *Gamaherpesvirinae* (Galosi, et al. 2005). La partícula del virus consiste en una nucleocápside interna ADN, rodeado por una capa de tegumento amorfo compuesto de proteínas estructurales y transactivación, y una envoltura que presenta las principales glucoproteínas virales (McGorum, 2007).

Patogénesis

La replicación de HVE-1 se produce en el tracto respiratorio, seguido de una propagación a los tejidos linfáticos regionales y la diseminación generalizada a través de una viremia. En contraste con otros *Alfaherpesvirus* neuropatogénicos, que causan encefalitis a través de la infección neuronal, la

mieloencefalopatía inducida por HVE-1 es causada por la infección del endotelio vascular de arterias que irrigan el sistema nervioso central (SNC). La respuesta inflamatoria subsiguiente conduce a la trombosis y lesión isquémica (Goodman et al., 2007). Por otro lado, el HVE-2 significa un factor predisponente para otras enfermedades como la infección por *Rhodococcus equi* (Galosi et al., 2005)

Signos clínicos

El HVE-1 y HVE-4 son las principales causas de aborto y enfermedad respiratoria y son padecimientos de considerable repercusión económica a nivel mundial (Galosi et al., 2005). La mieloencefalopatía por HVE-1 es un trastorno relativamente raro pero potencialmente devastador del SNC en caballos infectados (Allen, 2006). El HVE-3 es responsable de infecciones del tracto urogenital en sementales y yeguas. La relevancia patológica de HVE-2 y HVE-5 no está bien definido pero se sabe que pueden ocasionar enfermedades en las vías respiratorias altas, malestar general y fiebre, faringitis y aumento de tamaño de ganglios linfáticos en caballos jóvenes (Bell et al., 2006).

4.2.3. Epidemiología

La enfermedad se transmite por contacto directo o indirecto con secreciones nasales infecciosas, los fetos abortados, y las placentas (Borchers et al., 2005)

Frecuencia

Cada año se producen numerosos brotes de enfermedades respiratorias afectando potros que viven en áreas con alta concentración de animales. La mayoría de estos brotes en animales destetados son causados por HVE-4. La edad, estación y zona geográfica también juegan un papel importante en la severidad de los brotes, y están determinadas por el estado inmunológico y la inmunidad de hato de la población de caballos (Clarence M, 1991). La

inmunidad producida por una infección natural del aparato respiratorio tiene una duración corta, mediada principalmente por anticuerpos neutralizantes en el suero. Debido a la corta duración de la inmunidad, un animal puede padecer la enfermedad varias veces a lo largo de su vida, aunque episodios subsecuentes suelen ser más leves.

Las yeguas abortan generalmente solo una vez en su vida como resultado de la infección por HVE; sin embargo, la relación entre la resistencia y la concentración de anticuerpos en el suero es sumamente variable debido a la dificultad para distinguir entre anticuerpos desarrollados contra HVE 1 y HVE 4 (Radostits O.M, 2002). La reactivación y latencia viral son características importantes de la epidemiología de HVE-1, permitiendo que el virus persista en los caballos infectados previamente con el potencial de reactivación posterior (Hussey et al., 2006).

Distribución

HVE-1 y HVE-4 se consideran endémicos en los equinos de todos los países del mundo con reportes de altas prevalencias de anticuerpos neutralizantes (hasta un 90%) para HVE-2 y se ha logrado el aislamiento del virus a partir de leucocitos circulantes en el 86% de caballos en Escocia, el 90% de caballos en Inglaterra, el 55% de caballos en Japón, el 77% de caballos en Suiza y el 89% de caballos en los Estados Unidos (Allen et al., 1999). En Argentina la prevalencia serológica es de 80% (Galosi et al., 2005; Craig et al., 2005) mientras que los reportes para los Estados Unidos indican una latencia de 47% (Holmes et al., 2006). Por otro lado, los reportes sobre prevalencia de HVE-5 en poblaciones equinas es variable, con índices que van desde 3% (Fortier et al., 2009) a 64% (Bell et al., 2006).

Factores de riesgo

En un estudio realizado por Marenzoni y colaboradores (2010), se encontró que la prevalencia de la infección por HVE-5 fue significativamente diferente entre caballos de distintas edades, siendo mayor en el grupo más joven con 73.3% y 80% de resultados positivos a partir de hisopos nasales y muestras de sangre, respectivamente, en comparación con 40% de resultados positivos con hisopos nasales y 20% en muestras de sangre en caballos más viejos, observa que la edad temprana es un factor que se asocia más frecuentemente con infección por HVE-5. En otro estudio, se comprobó que las razas de tiro Standardbred y ciertas razas hispanas demostraron mayor predisposición a presentar disfunciones neurológicas causadas por HVE-1 (Goehring et al., 2006). Asimismo, se mencionan como probables factores de riesgo para infección por HVE el hacinamiento en establos, la edad, la exposición con animales en período de latencia y la presencia de fiebre (Kydd et al., 2012).

4.2.4. Diagnóstico

El aislamiento del virus se considera como la prueba de oro para establecer el diagnóstico definitivo de HVE-1 y se recomienda realizar sobre todo durante los períodos epidémicos donde los animales presentan mieloencefalopatía sospechosa de herpes equino (Lunn et al., 2009). La detección de antígenos de HVE-1 por técnicas de inmunofluorescencia directa en muestras de tejido de fetos equinos abortados supone un método muy valioso en el laboratorio de diagnóstico veterinario para establecer un diagnóstico rápido preliminar de aborto por herpes virus. Los métodos inmunohistoquímicos de tinción enzimática (IH) que utilizan peroxidasa han sido desarrollados como procedimientos para detectar antígenos de EHV-1 en tejidos procesados en parafina provenientes de fetos equinos abortados o de caballos con afección neurológica (OIE, 2004).

El virus también ha sido aislado de animales con enfermedades respiratorias utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de exudado nasal o células mononucleares de sangre periférica infectadas (Galosi et al., 2005). La eficiencia con la que el PCR amplifica las secuencias es del 99.2% para HVE-1, proporcionando una fuerte evidencia de la sensibilidad al diagnóstico (Pusterla et al., 2006b). El PCR en tiempo real (RT-PCR) es una solución flexible, rápida, con altos niveles de sensibilidad y especificidad que además puede ser cuantitativo para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. El RT-PCR es capaz de distinguir entre la infección de HVE-1 y HVE-4 (Hussey et al., 2006). La sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real para la detección de HVE-1 en caballos infectados es de 96.3% y 100%, respectivamente (Allen, 2007).

4.2.5. Prevención y control

El consejo técnico consultivo nacional de sanidad animal (CONASA, 2008), establece como medida para prevenir la enfermedad respiratoria vacunar a los 2-4 meses, aplicar un refuerzo a los 3 meses y al año de edad. Para prevenir abortos, se recomienda vacunar a los 5,6 y 7 meses de gestación. En áreas de riesgo se recomienda vacunar a los 3, 5, 7 y 9 meses de gestación con virus inactivado de HVE-1. En la práctica común se vacuna a las yeguas antes de la monta y a los sementales antes de la época de montas y cada 6 meses. Para la prevención y el control de HVE-4 y HVE-1, se recomiendan prácticas de manejo que reduzcan la propagación viral. Los caballos nuevos o los que regresan de otros lugares, deben ser aislados de 3-4 semanas antes de que se mezclen con los otros caballos, especialmente con yeguas gestantes. Las yeguas preñadas deben mantenerse en un grupo alejado de los animales destetados, los potros de un año, y los caballos adultos. En un brote de enfermedad respiratoria o de aborto, los animales afectados deben ser aislados y desinfectar las instalaciones contaminadas apropiadamente. Ningún caballo debe salir de las instalaciones durante 3 semanas después de la recuperación del último caso clínico (Clarence M, 1991).

4.3. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

4.3.1. Historia

La anemia infecciosa equina (AIE) es una enfermedad de distribución mundial exclusiva de la familia *Equidae* la cual fue descrita por primera vez en 1843 (Cappelli et al., 2010). En 1970 la AIE fue caracterizada como una enfermedad infecciosa producida por un retrovirus asignado a la subfamilia *lentiviridae* (Craig, 2011).

4.3.2. Historia natural de la enfermedad

Etiología

El virus de la AIE pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, con genoma de RNA lineal dimérico que utiliza una transcriptasa reversa. Las partículas virales son envueltas en una capa lipídica, esféricas o pleomórficas, de 80-100 nm de diámetro. En general, la enfermedad lentiviral es caracterizada por infección persistente que produce patologías degenerativas de forma progresiva que en la ausencia de intervenciones terapéuticas conducen a la muerte del animal. El nombre “lenti” virus se refiere que la enfermedad retrasa su manifestación y puede ser inaparente por años (Craig, 2011).

Patogénesis

La transmisión de la AIE ocurre mecánicamente por la picadura de ciertas especies de insectos hematófagos infectados cuando se está alimentando en un caballo sano. La transmisión también puede ocurrir por transfusiones sanguíneas o por iatrogenia (Covaleda et al., 2010). Los vectores mecánicos insectos son principalmente los tábanos del género *Tabanus fuscicostatus* Hine y las moscas de los establos del género *Stomoxys calcitrans* L. (Bicout D, et al 2006). Distintos estudios han demostrado que el control de la replicación del virus de la AIE y la enfermedad está directamente relacionado

con la potencia y velocidad de la respuesta inmune del huésped y tasa de neutralización del virus infectante (Howe et al., 2002).

Los caballos que sobreviven a los episodios agudos y crónicos de AIE, evolucionan a un estado de enfermedad inaparente donde no se presentan signos o síntomas evidentes. A pesar de carecer signos clínicos, los caballos afectados de esta forma representan una pérdida económica permanente a la industria equina y una fuente de infección a los otros caballos (Langemeier J, et al 1996). Los caballos infectados suelen evolucionar al estado de enfermedad inaparente después de un período de 8 a 12 meses, permaneciendo como portadores y transmisores del virus por toda la vida, experimentando niveles variables de replicación de virus que se encuentran infectando monocitos o macrófagos, principalmente (Craig et al., 2005).

Signos clínicos

Los signos clínicos de AIE pueden ser muy leves, casi indetectables, hasta sumamente evidentes que ponen en riesgo la vida del animal. A pesar de que en casos agudos se reporta con frecuencia pirexia y trombocitopenia, el curso de la enfermedad es variable y algunos animales pueden presentar estados febriles que pueden durar hasta 12 meses, seguido de un periodo prolongado de estado inaparente donde los animales no presentan signo alguno pero que son reservorios activos del virus. Otros signos clínicos incluyen, diarrea, edema, letargia, anemia, trombocitopenia y ocasionalmente encefalitis o ataxia (Zhang et al., 2008).

4.3.3. Epidemiología

Frecuencia

La prevalencia de la infección por el virus de la AIE varía en función de la densidad de la población equina, de la proporción de animales portadores y de la densidad de población de insectos vectores. En condiciones ideales, la

incidencia de la infección puede alcanzar casi el 100% de los animales en un período de tres semanas (Radostits O.M, 2002).

Distribución

El virus de la AIE se distribuye por todo el mundo y existe de forma enzoótica en un 23% de los países del planeta (Bicout et al., 2006). El virus de la AIE se ha detectado en las provincias canadienses y en la mayoría de los estados de E.U, donde las áreas enzoóticas más importantes son la región de la costa del golfo de México (Radostits O.M, 2002). Las diferencias entre los índices de prevalencia e incidencia dependen de la densidad de población de équidos, la proporción de animales portadores, de la densidad de población de insectos vectores y de los resultados de las medidas de control (Blaha, 1995). En condiciones ideales, la incidencia de la infección puede alcanzar casi el 100% en un período de semanas (Radostits O.M, 2002).

Factores de riesgo

Es suficiente con que un caballo, asno o mula se encuentre infectado para convertirse en un foco nuevo de AIE. En los caballos, la infección es persistente y los animales infectados pero que no presentan signos clínicos son una fuente del virus. El virus de AIE se transmite de forma casi exclusiva a través del paso de la sangre o derivados sanguíneos contaminados (Radostits O.M, 2002). Otro factor de riesgo es el estrés en los animales, puede ocasionar la expansión del virus en circulación sanguínea en pocos días (Issel et al., 2013).

En un estudio realizado se encontró una prevalencia del 40% en animales mayores de 12 años. En el mismo estudio se descubrió un O.R de 5.8 en animales que no estaban aislados de los seropositivos, un O.R de 60.0 en animales que vivían en áreas pantanosas y un O.R de 1.8 en cuadras que se encuentran a una distancia por encima de 2 km (Borges et al., 2013).

4.3.4. Diagnóstico

La prueba de elección para AIE es la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y se considera el estándar internacional para el diagnóstico de la AIE, con niveles de sensibilidad y especificidad $\geq 99\%$. Sin embargo, la sensibilidad del AGID es baja durante la primera semana después de la infección debido a la baja concentración de anticuerpos, pero aumenta rápidamente durante el primer mes (Carpenter et al., 1998); Por más de 30 años, se ha reconocido que un bajo porcentaje de los équidos expuestos al virus de AIE pueden llegar a ser portadores persistentes del virus y arrojar falsos negativos mediante la prueba de AGID. Lo anterior se debe a los bajos niveles de anticuerpos contra el antígeno p26 del virus de la AIE (Issel et al., 2013). Los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), son pruebas precisas y fiables para la detección de la AIE en caballos, excepto para animales que se encuentran dentro de la primera semana de infección o para los potros de las madres infectadas (Langemeier, et al., 1996; OIE, 2008). El ELISA ofrece una especificidad $>80\%$ (Issel et al., 2013). Las pruebas moleculares basadas en técnicas de reacción de cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR) a partir de células mononucleares obtenidas del torrente venoso, representan una alternativa que ofrece altos niveles de sensibilidad para la detección de ácidos nucleicos virales (Whetter et al., 1990, Cappelli et al., 2010). Los métodos moleculares basados en PCR son considerados como la mejor metodología disponible para confirmar la presencia del virus en casos que se sospecha de exposición reciente al virus. Una ventaja adicional del PCR es que se puede detectar ARN viral y ADN proviral (Issel et al., 2013), además en animales portadores del virus de AIE clínicamente imperceptibles, es posible detectar el ADN a través de estas técnicas moleculares (Cappelli et al., 2011).

4.3.5. Prevención y control

El control del virus de AIE se basa en la identificación de portadores inaparentes mediante la detección de anticuerpos del virus de AIE en pruebas

serológicas. Depende también de la identificación y erradicación o de la cuarentena de por vida de los animales infectados, cuarentena y estudio del ganado nuevo, estudio serológico obligatorio de los caballos importados y programas sanitarios encaminados a evitar propagación del virus. El fundamento universal del control de la AIE sigue siendo la erradicación de la enfermedad a través de la identificación de los caballos infectados en estado de enfermedad inaparente clínicamente sanos pero infectados (Radostits O.M, 2002). No existe vacuna aprobada para la prevención de AIE.

4.4. ENCEFALITIS DEL OESTE DEL NILO

4.4.1 Historia

El virus del oeste del Nilo (VON) se aisló por primera vez en Uganda en 1937 (Shannan L, 2010). En Francia se produjo el primer brote reportado que afectó a humanos y equinos durante el verano de 1962 en el sur del país (Durand et al., 2002) En los Estados Unidos fue identificado por primera vez en Nueva York en 1999 y, desde entonces se ha extendido por todo el continente americano (Ludwig et al., 2010; Ludwig et al., 2002). El VON Infecta a las aves, seres humanos y animales domésticos y una extensa gama de otros vertebrados que funcionan como huéspedes accidentales (Murray, 2010), produciendo índices de morbilidad y mortalidad variables (Rios J, 2010). Desde mediados de 1990, los brotes de fiebre del Nilo Occidental y encefalitis se han producido en todo el mundo y VON es ahora endémico en África, Asia, Australia, Oriente Medio, Europa y los Estados Unidos (De Filette M, 2012). En el año 2002 se realizó el primer aislamiento del virus del Nilo Occidental en México, en un cuervo común (*Corvus corax*) del estado de Tabasco (Estrada J., 2003).

4.4.2 Historia natural de la enfermedad

Etiología

El VON, es un *Arbovirus* pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus* (Durand et al., 2002). Es un virus con genoma de ARN de banda sencilla y polaridad positiva, es esférico pequeño con un diámetro de 50 nm, cápside icosaédrica y una envoltura lipídica que rodea una nucleocápside (De Filette M, 2012).

Patogénesis

En los mamíferos, la replicación inicial del VON se lleva a cabo en el sitio de inoculación de mosquitos (De Filette M, 2012). El genoma se procesa dentro de los leucocitos como una sola poliproteína que posteriormente se fragmenta por acción de proteasas virales y celulares en su producto final (Papin et al., 2010). Los leucocitos infectados migran a los ganglios linfáticos y torrente sanguíneo resultando en una viremia primaria y una posterior infección de los tejidos periféricos tales como el bazo y el riñón (De Filette M, 2012). El periodo de incubación es de 5- 15 días (Tasha Epp et al., 2007a). La penetración del virus al sistema nervioso central da como resultado de la estimulación de los receptores tipo *toll like receptor* (TLR) y aumento de los niveles de factor de necrosis tumoral- α , que aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Wang et al., 2004). El VON infecta directamente las neuronas, particularmente en los núcleos profundos y la materia gris del cerebro, tronco cerebral, y la médula espinal (Kleinschmidt-DeMasters et al., 2004). Se sospecha que una infección endotelial inicial ocurre seguida por la translocación en el SNC; El virus infecta a las neuronas en diversos sitios del SNC donde el virus infecta a las neuronas en diversos sitios causando una polioencefalomielitis difusa o multifocal. La función de los nervios craneales y la función mental pueden verse afectadas indirectamente por edema intracraneal.

Las lesiones directas a la corteza cerebral y el cerebelo son poco frecuentes (Furr Martin, 2008).

Signos clínicos

Los signos clínicos de la infección incluyen ataxia, paresia, parálisis, hiperestesia, convulsiones (Kleiboeker et al., 2004), fasciculaciones musculares en todo el cuerpo y en particular de la cabeza y cuello, fiebre, depresión, anorexia, debilidad, disimetría, (Furr Martin, 2008).

4.4.3. Epidemiología

El ciclo natural de la infección consiste en aves y mosquitos *Culex spp*, en particular *Aedes spp*. Muchas especies de aves silvestres pueden actuar como huéspedes amplificadores, mientras que los seres humanos, caballos y otros mamíferos se consideran huéspedes accidentales o definitivos (Calistri P, 2010), sin embargo, los mamíferos también podrían desempeñar el papel de reservorio (Root et al., 2006). Se cree que las aves migratorias son los principales responsables de la dispersión del virus, incluyendo la reintroducción del VON de áreas endémicas en regiones que experimentan brotes esporádicos.

Frecuencia

Distintos índices de prevalencia para VON han sido documentados en todo el mundo. Italia, empleando muestreo al azar ha reportado índices de prevalencia de 38% (Trock. et al., 2001). En una encuesta serológica realizada en Francia en el año 2000 mostró diferencias geográficas en la prevalencia de menos del 5% al 58% (Durand et al., 2002). En el este de los Estados Unidos la prevalencia serológica en caballos examinados en relación con casos clínicos ha sido el 15% (Trock. et al., 2001). En México, también se ha documentado la presencia del VON con 43% de prevalencia en el estado de Coahuila (Blitvich et al., 2003), en Yucatán se encontró una prevalencia de 1.2% (Loroño-Pino M.A,

2010). Del año 2003 a 2006, se registraron 290 casos en aves y equinos confirmados mediante serología positiva (Téllez et al., 2006). En septiembre del 2012, la SAGARPA lanzó un comunicado haciendo una atenta solicitud para mantenerse alerta ante el aumento de casos por VON reportados en Estados Unidos, según información de la coordinación de la CPA (Vargas, 2012).

Distribución

Desde mediados de 1990, los brotes de fiebre del Nilo Occidental y encefalitis se han producido en todo el mundo y VON es ahora endémico en África, Asia, Australia, Oriente Medio, Europa y los Estados Unidos (De Filette M, 2012). Durante la última década, el VON ha sido responsable de más de 29,000 casos de enfermedades humanas y por lo menos 26,000 casos de encefalitis equina en Estados Unidos. Los anticuerpos contra el VON han sido previamente detectados en distintas especies de vertebrados asintomáticos en la Península de Yucatán (Loroño-Pino M.A, 2010). En un estudio realizado en 14 estados de México, un total de 441 muestras de suero de equinos se sometieron a prueba y se detectaron anticuerpos específicos de VON en 97 (22%) de las muestras (Estrada J., 2003). El día 14 de julio de 2003, a través de la publicación en el diario oficial de la federación, fue oficialmente activado el dispositivo nacional de emergencia en sanidad animal, declarando la presencia en el territorio nacional de VON (CENAVE, 2006).

Factores de riesgo

Las aves migratorias son reservorios del VON y son un factor importante en la propagación de la enfermedad. El cuervo americano (*Corvus brachyrhynchos*) es altamente susceptible a la infección del virus del Nilo Occidental (Ludwig et al., 2010). Desde hace décadas, los brotes localizados de la enfermedad del virus del Nilo Occidental en caballos se han descrito cerca de lugares de descanso de aves migratorias. Los mosquitos del género *Culex* funcionan como vectores mecánicos al transmitir virus desde el reservorio de ave en una variedad de especies. Sin embargo, los caballos y seres humanos

son los más afectados. La temporada es un factor de riesgo importante para la aparición de virus del Nilo Occidental, que está estrechamente conectada con el ciclo de vida y nivel de actividad del mosquito vector. Por lo tanto, los factores de riesgo para la infección por VON son la residencia de un área endémica, la temporada, la actividad al aire libre, tales como acceso al pastoreo las 24 horas, el estado de vacunación y los programas de control de mosquitos (Furr Martin, 2008).

Se ha documentado que los caballos de color oscuro y los sementales tienen más probabilidades de morir como consecuencia de la infección por VON. En algunos mamíferos se ha observado que la testosterona, además de aumentar las características sexuales, también disminuye el funcionamiento del sistema inmune. Por lo tanto, los sementales pueden tener respuesta inmune inferior que cualquiera de las yeguas o caballos castrados. Con respecto al color, se encontró que los animales de color oscuro desarrollan más infecciones por VON comparado con animales de color más claro; una posible explicación podría ser que la respuesta inmune está vinculada genéticamente con el color. Sin embargo, no existe evidencia suficiente para sustentarlo (Tasha Epp et al., 2007).

4.4.4. Diagnóstico

La prueba de neutralización por reducción de placas todavía se considera como la prueba estándar de oro para el diagnóstico de VON, sin embargo; el diagnóstico de la infección del VON humano y equino se obtiene a través de pruebas serológicas. Actualmente, los sistemas ELISA se utiliza rutinariamente para el diagnóstico de VON en humanos y animales, ya que es menos laboriosa (Hobson-Peters et al., 2008) y ofrecen niveles de sensibilidad y especificidad de 83,6% y 93,4%, respectivamente (Ledermann et al., 2011).

Las técnicas de diagnóstico molecular que emplean el RT-PCR ha sido utilizado para el diagnóstico de VON; este grupo de pruebas se basa en la

tecnología TaqMan; donde además de los dos juegos de oligonucleótidos específicos externos, se utiliza un tercero marcado con fluorescencia (Sondas Taq-Man). Esta prueba ha demostrado un límite de detección de 0.1 PFU/ ml. El método RT-PCR que utiliza *SYBR Green* es tan sensible como el Taq-Man en un ensayo de RT-PCR cuantitativo para el VON, además de ser menos costoso (Papin et al., 2004).

4.4.5. Prevención y control

En la actualidad, se cuenta con tres vacunas autorizadas para el VON en caballos. La primera vacuna con licencia fue desarrollada con VON inactivado en formalina. Esta vacuna se comercializa actualmente en los E.U. La dosis se aplica vía intramuscular y la segunda aplicación se realiza de dos a cuatro semanas después (De Filette M, 2012). En México se recomienda la primera dosis a los 6 meses de edad y 1 o 2 refuerzos, posteriormente cada 6 meses dependiendo de la zona (CONASA, 2008).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Valle de Mexicali, Baja California durante el periodo comprendido entre el mes de diciembre de 2012 a julio de 2013. El valle de Mexicali se encuentra localizado en el extremo noreste del estado de Baja California y está conformado por el curso bajo del Río Colorado, se extiende desde la frontera entre Estados Unidos y México hasta el delta del Río en el Golfo de California, y desde el mismo río hasta la Sierra de Juárez. En las coordenadas 32° 43' norte, 28° 00' sur de latitud norte; al este 112° 47', oeste 117° 07' de longitud oeste.

5.2. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio epidemiológico observacional transversal con el fin de detectar la presencia de anemia infecciosa, influenza, herpes en equinos y encefalitis del oeste del Nilo en muestras provenientes de caballos con sintomatología asociada a esas enfermedades. El muestreo fue por conveniencia ya que únicamente fueron muestreados animales que a juicio del médico veterinario estaban cursando alguna patología y que presentaban signos respiratorios, tales como disnea, taquipnea, tos, descarga nasal y ocular; Además se tomaron muestras de animales con signos neurológicos desde ataxia leve a parálisis progresiva. A todos los animales incluidos en el estudio se les tomó muestra de sangre y secreción nasal, además se realizó un examen físico en el que se evaluaron entre otras variables: temperatura rectal, frecuencia respiratoria, presencia o ausencia de tos, caracterización de los ganglios linfáticos y presencia o ausencia de secreción ocular y nasal, toda esta información quedó registrada en un cuestionario epidemiológico que incluyó aspectos epidemiológicos tales como medicina preventiva, manejo de la explotación, procedencia y transporte de los animales.

5.3. Toma de muestra

Muestra de sangre:

Para realizar las pruebas de RT-PCR e inmunodifusión en placas de gel de agar (AGID) en cada uno de los animales incluidos en el estudio se tomaron dos muestras de sangre mediante la punción de la vena yugular: empleando en tubos evacuados (Vacutainer® BD) con EDTA. La segunda muestra fue colectada depositada en tubos evacuados sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas en hieleras a una temperatura promedio de 10°C. y enviadas para su análisis al laboratorio el mismo día.

Muestra de secreción nasal

Se utilizaron hisopos estériles de dacrón con mango de plástico. Se tomó la muestra de la parte interna de los ollares, aproximadamente 10 centímetros de profundidad y de la parte ventral del meato nasal. Los hisopos con la muestra fueron colocados de inmediato en frascos estériles y transportados a 4°C. La muestra fue utilizada para el diagnóstico mediante la técnica molecular de RT-PCR. En el laboratorio todos los hisopos se congelaron a -80°C, hasta el momento de las pruebas de extracción de ácido nucleico. Antes de realizar la extracción de ARN y ADN; la muestra del hisopo fue re-suspendida en 160 µl de solución salina de fosfatos (PBS) en los tubos cónicos de 1.5 ml y centrifugados a 3000 RCF durante 15 minutos.

5.4. Procesamiento de la muestra de sangre:

Las muestras se centrifugaron a 1300 RPM por 11 minutos, después se tomó la capa flogística con un poco de plasma; una parte fue almacenada con un conservador de ARN a -80°C y la otra parte fue almacenada a -20°C para la extracción de ADN.

5.5. Análisis de laboratorio

5.5.1. Extracción de ARN y ADN

El ARN y ADN fueron extraídos a partir de las muestras de hisopos nasales y sangre utilizando el kit RNeasy mini kit y DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) de acuerdo al procedimiento del manual. La muestra de sangre con el conservador de RNA se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y la muestra se obtuvo del sedimento.

5.5.2. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Para el virus de influenza equina H3N8 se amplificó un fragmento de 120 pares de bases (pb) de la región 375-294 del gen de la nucleocápside viral de acuerdo a la referencia GenBank: DQ124184.1, utilizando los oligonucleótidos EIVH3N8f 5'-TGGTGAAGACGCTACTGCTG-3' para el sentido positivo y EIVH3N8r 5'-GAGCACATTCTGGGATCCAT-3' para el sentido negativo. Para el herpes virus equino tipo 1 se amplificó un fragmento de 89 pb de la región 2326-2414 del gen de la glucoproteína B (gB) con referencia GenBank: M36298.1, utilizando los oligonucleótidos EHV1f 5'-TCGAGTTTGCCATGCTACAG-3' para el sentido positivo y EHV1r 5'-GGTACACCACGCAGTTGCTA-3' para el sentido negativo. Para el herpes virus equino tipo 4 se amplificó un fragmento de 82 pb de la región 2646-2727 del gen de la glucoproteína B (gB) con referencia GenBank: M26171.1, utilizando los oligonucleótidos EHV4f 5'-GTCAACGTGGACAACACTGC -3' para el sentido positivo y EHV4r 5'- CAACTGCCTCTCCCACCTTA -3' para el sentido negativo. Para el virus de anemia infecciosa equina se amplificó un fragmento de 114 pb de la región 1441-1554 de la intersección de los genes GAG y POL con referencia GenBank: NC_001450.1, utilizando los oligonucleótidos EIAg/p1f 5'- CTGGACAGTTTGTGGGAGTAAC -3' para el sentido positivo y EIAg/p1r 5'- CACTGAAGTATCTGCTCCTGTGTC -3' para el sentido negativo. Para el virus

Del Oeste del Nilo se amplificó un fragmento de 77 pb de la región 962-1038 de la glucoproteína B con referencia GenBank: AF196835.2, utilizando los oligonucleótidos WNVf 5'- GCACTGTGGTGTGGAATTG -3' para el sentido positivo y WNVr 5'- CAATGAAGCCACTGACGAGA -3' para el sentido negativo. Todos los juegos de oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa Oligo Perfect Designer de Life Technologies (Hércules, CA, E.U.A.), sintetizados y adquiridos con ese mismo proveedor. Asimismo, todos los juegos de oligonucleótidos fueron utilizados a una concentración final de 400 nM

Se utilizó un volumen total de 25 µl por cada reacción de RT-PCR. La mezcla maestra para virus con genoma de RNA, contenía 12.5 µl de *iScript™ One-Step RT-PCR kit con SYBR® Green* (Bio Rad) 1.0 µl de cada juego de oligonucleótidos, 0.5 µl de *iScript* enzima transcriptasa reversa para RT-PCR de un solo paso, 8.0 µl de agua libre de nucleasas y 2.0 µl del RNA de la muestra. Las condiciones de amplificación del termociclador en tiempo real para muestras de virus con genoma ARN fueron un ciclo de 50°C por 10 minutos para activación de la transcriptasa reversa y obtención de la primera banda de ADN complementario (cDNA), un ciclo de 95°C por 3 minutos para desnaturalización del cDNA de la mezcla y posteriormente 40 ciclos de 90°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos cada uno para amplificación de DNA.

La mezcla maestra para virus de ADN contenía 12.5 µl de SoAdvanced Universal SYBR Green SuperMix (Bio Rad), 1.0 µl de cada juego de oligonucleótidos, 9.5 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del DNA de la muestra. Las condiciones de amplificación del termociclador en tiempo real para muestras de virus con genoma ADN fueron un ciclo de 95°C por 3 minutos para desnaturalización del DNA de la mezcla y posteriormente 40 ciclos de 90°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos cada uno para amplificación de DNA.

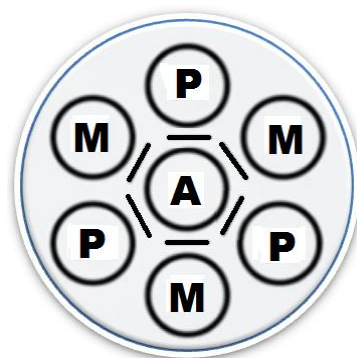
A todos los protocolos de pruebas se les realizó el análisis de curva de fusión (*melting curve*) siguiendo el procedimiento de rutina del equipo CFX 96 de *Bio Rad* para asegurar que la amplificación obtenida es producida por los

oligonucleótidos y ADN o ARN templete y no por la formación de dímeros o artefactos ajenos a la amplificación de ácido nucleico viral.

Los controles positivos para IE, HVE-1, HVE-4 y VON fueron extraídos a partir de la vacuna *Vetera® Gold 7-way* y para el virus de AIE se utilizó como control positivo, ARN extraído de una muestra de sangre proveniente de un caso confirmado como positivo por AGID.

5.5.3. Prueba de inmunodifusión en placas de gel de agar (AGID) (prueba de Coggins)

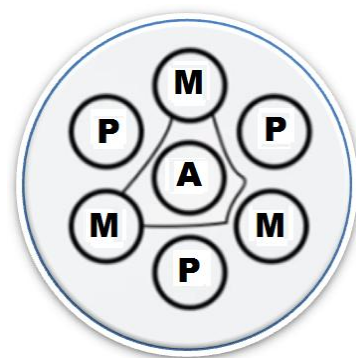
Se utilizó el kit para la detección de anticuerpos frente al virus de la Anemia Infecciosa Equine (EIA-AGID) de IDEXX. Las reacciones de inmunodifusión se llevaron a cabo en una capa de agar en placas de Petri de 100 mm de diámetro, se tomaron de 15–17 ml de agar Noble al 1%. Se perforaron 6 pocillos de 5.3 mm de diámetro y con una separación de 2,4 mm en el agar en torno a un pocillo central del mismo diámetro. En el pocillo central se colocaron 50 µl del antígeno y 50 µl del antisuero estándar en tres pocillos exteriores. Las muestras del suero problema se colocaron en los tres pocillos restantes. Las cajas de petri se mantuvieron a temperatura ambiente en una cámara húmeda y las lecturas se realizaron después de transcurridas 24–48 horas post-inoculación. Las cajas de petri se examinaron con un haz estrecho de luz oblicua e intensa frente a un fondo negro. Las líneas de referencia fueron claramente visibles a las 24 horas, sin embargo se realizó otra lectura a las 48. En AGID se considera positiva una muestra cuando se forma una línea entre los dos pocillos, significando que sucedió una reacción de precipitación entre el antígeno de prueba y los anticuerpos contra el virus de la AIE presentes en el suero.



Positivo:

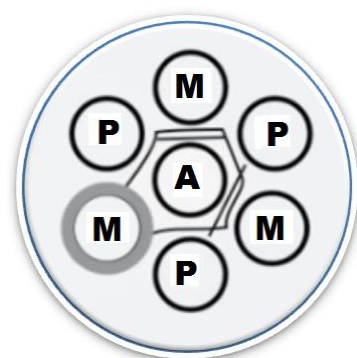
Los pocillos con la letra P contienen el control positivo, los que tienen la letra M la muestra positiva y en el centro se encuentra el antígeno.

Cuando la línea se forma entre el pocillo A y el pocillo que contiene la muestra significa que es positivo.



Negativo:

Cuando no se forma la línea entre los dos pocillos significa que no hubo una reacción antígeno-anticuerpo.



Positivo débil:

La carga de anticuerpos no es suficiente, ya sea porque se trate de un potrillo que adquirió anticuerpos de la madre o el sistema inmune no ha respondido lo suficiente.

Se recomienda repetir la prueba,

Figura 1. Interpretación de resultados de la prueba del agar en gel de inmunodifusión.

5. 6. Análisis de datos

Se realizaron tabulados básicos de los resultados de las pruebas RT-PCR y se establecieron valores de corte para determinar el ciclo de amplificación (C_q) máximo para considerar una muestra como positiva o negativa. Con base en el análisis de curva de fusión, se calcularon los promedios para controles positivos, controles negativos y muestras para considerar una muestra como positiva, negativa o artefacto ajeno a la amplificación del cDNA de template. Para considerar un muestra como positiva, esta deberá producir una temperatura de fusión ± 1 °C de la temperatura de fusión de los controles positivos incluidos en cada sesión de pruebas. Los resultados de las pruebas RT-PCR y AGID fueron expresados como porcentaje de positivos a cada enfermedad particular.

VI. RESULTADOS

Cuadro 1. Características de la población estudiada

Variable	Descripción		Variable	Descripción	
	n	%		n	%
Sexo			¿Comparte equipo?		
• Hembra	8	34.8	• Si	9	39.2
• Macho entero	8	34.8	• No	10	43.4
• Macho castrado	7	30.4	• No se monta	4	17.4
Raza			Vacunados		
• Cuarto de Milla	14	60.8	• Si	11	47.8
• Andaluz	2	8.7	• No	12	52.2
			Presencia de tábanos		
• Criollo	3	13	• Si	20	87
• Portugués	1	4.35	• No	3	13
• Azteca	2	8.1			
• Costarricense	1	4.35			
Edad			Otros animales		
• < 2 años	5	21.7	• Perros	14	60.8
• 2 a 10 años	15	65.2	• Aves	11	47.8
• 11 a 20 años	3	13	• Bovinos y ovinos	10	43.4
Fin zootécnico			• Cerdos	1	4.35
• No tiene	6	26	• Ninguno	5	21.7
• Carreras	8	34.8			
• Charrería	1	4.35			
• Bailador	4	17.4			
• De silla	4	17.4			

Factores de riesgo de la relación estudiada

El cuadro 1 muestra las principales variables que se evaluaron en este estudio y que se consideran como factores de riesgo para las enfermedades estudiadas. Es importante señalar que el 60% de los animales son dedicados a competencias de cuarto de milla, los cuáles participan en diferentes eventos ecuestres como carreras y charrería, entre otros. Estos animales debido a su fin zootécnico son transportados de manera frecuente. Otro aspecto importante es que el 39% de la población estudiada comparte equipo de manejo y monta.

Adicionalmente, el 52% de los animales no lleva un adecuado programa de medicina preventiva. Es evidente que los aspectos antes descritos pudieran incrementar la posible transmisión de enfermedades por contacto directo o aerosoles.

Resultados RT-PCR

Los controles positivos para todas las enfermedades fueron probados por cuadruplicado y las muestras por duplicado. Para las pruebas de herpes virus tipo 1, el promedio de Cq de los controles positivos fue de 16.6 con promedio de temperatura de la curva de fusión de 79.5 °C para 1/23 muestras positivas (4.3%). Para las pruebas de herpes virus tipo 4, el promedio de Cq de los controles positivos fue de 30.4 con promedio de temperatura de la curva de fusión de 82.0 °C con ninguna muestra positiva para esta enfermedad. Para las pruebas de virus de influenza equina H3N8, el promedio de Cq de los controles positivos fue de 36.6 con un promedio de temperatura de la curva de fusión de 79.5 °C para 7/23 muestras positivas (30.4%). Para las pruebas de virus del Oeste del Nilo, el promedio de Cq de los controles positivos fue de 32.09 con promedio de temperatura de la curva de fusión de 79.0 °C para 2/23 muestras positivas (8.7%). Para las pruebas de virus de anemia infecciosa equina, el promedio de Cq de los controles positivos fue de 35.6 con promedio de temperatura de la curva de fusión de 74.25 °C para 3/23 muestras positivas (13.0%). Lo anterior, arroja un 56.5% de animales positivos a cualquiera de las enfermedades incluidas en este estudio.

Resultados AGID

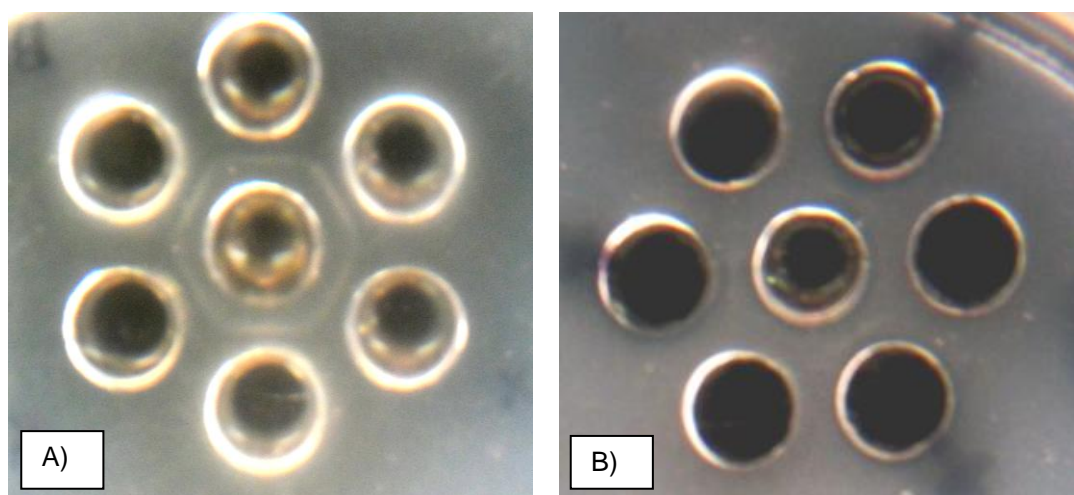
De las 23 muestras analizadas por AGID (prueba de Coggins), solo una muestra de suero resultó positiva. Esa misma muestra también resultó positiva a la prueba RT-PCR.

El cuadro 2 muestra la presencia de enfermedades detectadas por medio de RT-PCR y AGID donde se observa que el 56.5% (13/23) del total de animales analizados que resultaron positivos a alguna de las enfermedades utilizando ambas pruebas. Se detectaron con mayor frecuencia influenza (30.4%), VON (8.7%), HVE-1 (4.34%) y AIE (13%).

Cuadro 2. Detección de enfermedades virales mediante las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real y Prueba de Inmunodifusión en Placas de Gel de Agar (Coggins).

No. Muestra	HVE-1		HVE-4		I.E		VON	AIE	
	RT- PCR								AGID
	Hisopos nasales	Sangre	Hisopos Nasaes	sangre	Hisopos nasales	sangre	sangre	sangre	Suero
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	-	-	-	-	+	-	-	-	-
9	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	+	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	+	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Positivos (%)	0%	4.34%	0%	0%	30.43%	0%	8.7%	13%	4.35%
Total positivos (%)	56.5%								

HVE-1= Herpes virus equino-1; HVE-4= Herpes virus equino-4; I.E= Influenza equina; VON= Virus del Oeste del Nilo; AIE= Anemia Infecciosa Equina; + Positivo; - Negativo.



- A) Caso positivo a AIE. Nótese las líneas que se encuentran entre el pocillo central y los pocillos laterales. Entre los tres pocillos con el control positivo y los tres pocillos de la muestra se forma un hexágono.
- B) Caso negativo a AIE. Únicamente se formó una línea entre los pocillos del control positivo y el pocillo del antígeno.

Figura 2. Imágenes de resultados a AIE mediante la prueba de AGID.

VII. DISCUSIÓN

En México son pocos los estudios donde se haya reportado la presencia de estas enfermedades, entre ellos se encuentra el trabajo realizado por Sandoval (Sandoval, 2007) para diagnóstico de AIE a partir de AGID o los trabajos de Blitvich y colaboradores (Blitvich et al., 2003) y Loroño-Pino (Loroño-Pino M.A, 2010), quienes utilizaron pruebas serológicas para diagnóstico de AIE. De esos trabajos, solo el realizado por Blitvich aplica técnicas de diagnóstico molecular basadas en PCR de transcriptasa reversa, siendo el primero en utilizar técnicas moleculares de PCR en tiempo real para el diagnóstico de enfermedades en equinos logrando ser un gran avance para el inicio de investigación en equinos en nuestro país.

El presente estudio, se incorpora el diagnóstico molecular a partir de técnicas RT-PCR para detectar enfermedades virales de importancia en equinos y se convierte en una alternativa rápida, eficiente y confiable para el apoyo del control de movimiento de animales hacia dentro y fuera de la región, el seguimiento y evaluación de tratamientos, programas de vacunación y vigilancia epidemiológica asociada a enfermedades de los equinos.

En este estudio, la prevalencia global para las cinco enfermedades virales detectadas en los especímenes probados fue de 56.5%, cifra que se anticipaba elevada ya que únicamente se muestrearon animales que presentaban signos clínicos asociados a las enfermedades descritas. En el 43.5% de los animales en los que no se detectaron enfermedades virales, los problemas respiratorios que presentaron al momento de la toma de muestras pudieran ser atribuidos a otras enfermedades virales o bacterianas, además de otras causas mecánicas capaces de producir los mismos signos (Carman et al., 1997), (Clark et al., 2008), (Wood et al., 2005),

Con respecto a los resultados del virus influenza equina H3N8, de los 7 casos que resultaron positivos, dos de ellos se encontraban vacunados; una de ellas se trataba de una potranca y el otro de un caballo de carreras. Petermann y colaboradores (1970) sugieren que los caballos jóvenes, especialmente los caballos de carreras, son particularmente susceptibles a la infección por influenza y es más difícil estimular la inmunidad inducida por la vacuna en estos caballos jóvenes que en los animales de edad avanzada. Otro aspecto importante a considerar es las características genéticas y antigénicas del virus de influenza equina que se utilizan en las vacunas comerciales, así como la falla evidente de algunas vacunas para estimular la respuestas inmunes debido a cepas poco compatibles con la de campo o fallas en la conservación de la cadena de frío (Myers, 2006).

Una limitante de este estudio es que no fue posible determinar que cepas están presentes en estos casos para compararlas con las cepas utilizadas en las vacunas comerciales para ver si son compatibles con las cepas presentes en la región y confieren la inmunidad esperada (Crawford, 2005). Dos de los casos positivos al virus de influenza equina se encontraban frecuentemente expuestos a otros animales en eventos ecuestres. Como ya se ha documentado, el transporte y el contacto con animales en eventos de competencia representa un riesgo para la transmisión e infección por este virus (McGorum, 2007). Los 7 casos detectados resultaron positivos únicamente en muestras de hisopos nasales. De acuerdo con Myers (Myers, 2006), los caballos infectados por primera vez liberan el virus en secreciones nasales a las 24 horas después de la infección y continúa liberándolo los siguientes 10 días.

Con respecto a Anemia Infecciosa Equina, dos de los animales que resultaron positivos por RT-PCR se encontraban en la misma cuadra donde sus caballerizas eran separadas únicamente por un cerco de madera, adicionalmente en esta cuadra se comparte el equipo de monta y de aplicación de medicamentos. Uno de los animales que resultó negativo a AIE por AGID y

positivo a RT-PCR, este evento puede tener diferentes explicaciones; una de ellas es que la muestra tenga un nivel bajo de anticuerpos contra la proteína p26 lo que resulta en la ausencia de reacción antígeno anticuerpo y el resultado sea negativo en AGID (Issel et al., 2013; Scicluna et al., 2013). Otra explicación es que el animal aunque haya estado expuesto al virus, la respuesta inmune humoral no era todavía detectable por el AGID, ya está documentado que un animal infectado produce una respuesta inmune humoral detectable al virus a los 12 días post-infección, por lo que los anticuerpos no pudieron ser detectados en esa muestra pero el ARN viral si pudo ser amplificado por RT-PCR (Issel y Cook, 1993).

Dos muestras resultaron positivas a VON, sin embargo; ninguno mostró signos clínicos a la enfermedad.

VIII. CONCLUSIÓN

Este estudio se realizó con el objetivo de establecer evidencia técnica que para confirmar la presencia de herpes virus equino tipo 1 y tipo 4, virus de influenza equina, virus del Oeste del Nilo y virus de anemia infecciosa equina en muestras obtenidas de caballos del valle Mexicali. Tomando en cuenta que en México existen pocos estudios que confirmen la presencia de estas enfermedades, los resultados de este trabajo soportan la hipótesis que en Baja California existe la presencia de las enfermedades virales aquí descritas. Sin embargo, es necesario realizar estudios epidemiológicos y genéticos más amplios para establecer la frecuencia, distribución y factores de riesgo de las enfermedades en la población equina así como identificar las cepas virales que circulan en la región. Es urgente sensibilizar a los propietarios, organizadores de eventos ecuestres y a la autoridad de salud animal para que la normatividad se cumpla y se logre el verdadero control de estas enfermedades en las poblaciones equinas de Baja California y el país.

IX. LITERATURA CITADA

- Allen, G., 2006, Antemortem detection of horses latently infected with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 67, 1401-1405.
- Allen, G.P., 2007, Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 69-72.
- Askonas, B.A., McMichael, A.J., Webster, R.G., 1982, The immune response to influenza viruses and the problem of protection against infection. In *Basic and Applied Influenza Research*, 159- 188.
- Ataseven V. S, Dagalp Seval B, Güzel Murat, Basaran Zeynep, Mehmet T. Tan, Bob., G., 2009, Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Veterinary Science* 86, 339–344.
- Baguelin, M., Newton, J.R., Demiris, N., Daly, J., Mumford, J.A., Wood, J.L.N., 2009, Control of equine influenza: scenario testing using a realistic metapopulation model of spread. *J R Soc Interface* 7, 67-79.
- Bell, S.A., Balasuriya, U.B.R., Nordhausen, R.W., MacLachlan, N.J., 2006, Isolation of Equine Herpesvirus-5 from Blood Mononuclear Cells of a Gelding. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 472-475.
- Bicout, D.J., Carvalho, R., Chalvet-Monfray, K., Sabatier, P., 2006, Distribution of Equine Infectious Anemia in Horses in the North of Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 479-482. Blaha, T., 1995, *Epidemiología Especial Veterinaria*.

- Blitvich, B., Fernandez-Salas., I., Contreras-Cordero., J.F., Marlenee., N.L., Gonzalez-Rojas., J.I., Komar., N., Gubler., D.J., Calisher., C.H., Beaty., a.B.J., 2003, Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Coahuila State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases* 9.
- Blitvich, B.J., Fernández-Salas, I., Contreras-Cordero, J.F., Loroño-Pino, M.A., Marlenee, N.L., Díaz, F.J., González-Rojas, J.I., Obregón-Martínez, N., Chiu-García, J.A., Black IV, W.C., Beaty., B.J., 2004, Phylogenetic Analysis of West Nile Virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerging Infectious Diseases* 10.
- Boliar, S., Stanislawek, W., Chambers, T.M., 2006, Inability of Kaolin Treatment to Remove Nonspecific Inhibitors from Equine Serum for the Hemagglutination Inhibition Test Against Equine H7N7 Influenza Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 264-270.
- Borchers, K., Wiik, H., Frolich, K., Ludwig, H., East, M.L., 2005, Antibodies against equine herpesvirus and equine arteritis virus in burchell's zebras (*Equus burchelli*) from the serengeti ecosystem. *J. Wildl. Dis.* 41, 80-86.
- Borges, A.M.C.M., Silva, L.G., Nogueira, M.F., Oliveira, A.C.S., Segri, N.J., Ferreira, F., Witter, R., Aguiar, D.M., 2013, Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in Veterinary Science* 95, 76-81.
- Bountouri, M., Fragkiadaki, E., Ntafis, V., Kanellos, T., Xylouri, E., 2011, Phylogenetic and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from Greece (2003 and 2007): evidence for reassortment between evolutionary lineages. *Virology* 438, 350.
- Calistri P, G.A., Hubalek Zdenek, Ionescu Aurelia, 2010, Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *The Open Virology* 4, 29-37.

- Cappelli, K., Capomaccio, S., Cook, F.R., Felicetti, M., Marenzoni, M.L., Coppola, G., Verini-Supplizi, A., Coletti, M., Passamonti, F., 2010, Molecular Detection, Epidemiology, and Genetic Characterization of Novel European Field Isolates of Equine Infectious Anemia Virus. *J. Clin. Microbiol.* 49, 27-33.
- Carman, S., Rosendal, S., Huber, L., Gyles, C., McKee, S., Willoughby, R.A., Dubovi, E., Don Lein, J.T., 1997, Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *Vet Diagn Invest* 9, 17-23.
- Carpenter, T.E., McBride, M.D., Hird, D.W., 1998, Risk Analysis of Quarantine Station Performance: A Case Study of the Importation of Equine Infectious Anemia Virus-Infected Horses into California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 11-16.
- CENAVE 2006. Centro nacional de vigilancia epidemiológica (SSA), s.d.s., ed. (México).
- Clarence M, e.a., 1991, *The Merck Veterinary Manual*, Cuarta edición Edition.
- Clark, C., Greenwood, S., Boison, J.O., Chirino-Trejo, M., Dowling, P.M., 2008, Bacterial isolates from equine infections in western Canada (1998–2003). *Can Vet J* 49, 153-160.
- CONASA 2008. Guía de vacunación para equinos en México., Conasa, C.d.S.y.P.E.d., ed. (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.).
- Covaleda, L., Fuller, F.J., Payne, S.L., Rash, A.S., 2010 EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology.* 397(1):.
- Covaleda, L., Gno, B.T., Fuller, F.J., Payne, S.L., 2010, Identification of cellular proteins interacting with equine infectious anemia virus S2 protein. *Virus Res* 151, 235-239.

- Craig, M., Barrandeguy, M., Fernandez, F., 2005, Equine herpesvirus 2 (EHV-2) infection in thoroughbred horses in Argentina. *BMC Veterinary Research* 1, 9.
- Craig, J.K., Li, F., Steckbeck, J.D., Durkin, S., Howe, L., Cook, S.J., Issel, C., Montelaro, R.C., 2005, Discerning an Effective Balance between Equine Infectious Anemia Virus Attenuation and Vaccine Efficacy. *J. Virol.* 79, 2666-2677.
- Craig, J.K., Montelaro, R.C., 2011, equine infectious anemia virus infection and immunity: lessons for aids vaccine development. *Future Virol* 6, 139-142.
- Crawford, P.C.e.a., 2005, Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs. *science* 310.
- De Filette M, e.a., 2012 Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research* 43.
- Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L., Rodwell, B.J., Corney, B.G., 2006, Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 131, 92–98.
- Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L.L., Kelly, M.A., Rodwell, B.J., Corney, B.G., 2007, Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4) *Veterinary Microbiology* 123, 93-103.
- Dimmock, N.J., 1984, Mechanisms of neutralisation of animal viruses. . *J. Gen. Virol.* 65, 1015-1022.
- Durand, B., Chevalier., V., R Pouillot, e.a., 2002, West Nile Virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. . *Emerg Infect Dis* 8, 777–782.
- Estrada J., e.a., 2003, West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. *Emerging Infectious Diseases* 9.

- Fortier, G., Pronost, S., Mischczak, F., Fortier, C., Léon A, Richard E, Van Erck E, Thiry E, P, L., 2009, Identification of equid herpesvirus-5 in respiratory liquids: A retrospective study of 785 samples taken in 2006–2007. *The Veterinary Journal* 182, 346-348.
- Furr Martin, R.S., 2008, *Equine Neurology*. Blackwell, Ames, Iowa, 178-180 pp.
- Galosi, C.M., de la Paz, V.C., Fernandez, L.C., Martinez, J.P., Craig, M.I., Barrandeguy, M., Etcheverrigaray, M.E., 2005, Isolation of Equine Herpesvirus-2 from the Lung of an Aborted Fetus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 500-502.
- Goehring, L.S., Van Winden, S.C., Van Maanen, C., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., 2006, Equine Herpesvirus Type 1–Associated Myeloencephalopathy in The Netherlands: A Four-Year Retrospective Study (1999–2003). *J Vet Intern Med* 20, 601-607.
- Goodman, L., Loregian, A., Perkins, G., Nugent, J., Buckles, E., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palu, G., Smith, K., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N.J., 2007, A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *Plos Pathog* 3.
- Hobson-Peters, J., Toye, P., Sanchez, M.D., Bossart, K.N., Wang, L.-F., Clark, D.C., Cheah, W.Y., Hall, R.A., 2008, A glycosylated peptide in the West Nile virus envelope protein is immunogenic during equine infection. *J. Gen. Virol.* 89, 3063-3072.
- Harless, W., Pusterla, N., 2006, Equine Herpesvirus 1 and 4 Respiratory Disease in the Horse. *Clinical Techniques in Equine Practice* 5, 197-202.
- Howe, L., Leroux, C., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2002, Equine Infectious Anemia Virus Envelope Evolution In Vivo during Persistent Infection Progressively

Increases Resistance to In Vitro Serum Antibody Neutralization as a Dominant Phenotype. *J. Virol.* 76, 10588-10597.

Holmes, M.A., Townsend, H.G.G., Kohler, A.K., 2006, Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1 equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus. . *Veterinary immunology and immunopathology* 111, 67-80.

Hussey, S.B., Clark, R., Lunn, K.F., Breathnach, C., Soboll, G., Whalley, J.M., Lunn, D.P., 2006, Detection and Quantification of Equine Herpesvirus-1 Viremia and Nasal Shedding by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 335-342.

Issel, C.J., Cook, R.F., 1993, A Review of Techniques for the Serologic Diagnosis of Equine Infectious Anemia. *J Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 137-141.

Issel, C.J., Scicluna, M.T., Cook, S.J., Cook, R.F., Caprioli, A., Ricci, I., Rosone, F., Craigo, J.K., Montelaro, R.C., Autorino, G.L., 2013, Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record* 10.

Kleinschmidt-DeMasters, B., BA., M., ME., L., SP., L., JT., M., EJ., E., 2004 Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients: clinical, laboratory, diagnostic, and neuropathological features. . *Arch Neurol.* 61 1210-1220.

Langemeier, J.L., Cook, S.J., Cook, R.F., Rushlow, K.E., Montelaro, R.C., Issel, C.J., 1996, Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1481-1487.

Law, J., 1874, Influenza in horses. In: Agriculture Commission. Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1872, 203-248.

- Ledermann, J.P., Loroño-Pino, M.A., Ellis, C., Saxton-Shaw, K.D., Blitvich, B.J., Beaty, B.J., Bowen, R.A., Powers, A.M., 2011, Evaluation of Widely Used Diagnostic Tests To Detect West Nile Virus Infections in Horses Previously Infected with St. Louis Encephalitis Virus or Dengue Virus Type 2. *Clin Vaccine Immunol* 18, 580–587.
- Loroño-Pino M.A, e.a., 2010, Antibodies to influenza and West Nile viruses in horses in Mexico. *veterinary Research* 166, 22–23.
- Ludwig, A., Bigras-Poulin, M., Michel, P., Belanger, D., 2010, Risk factors associated with west nile virus mortality in american crow populations in Southern Quebec. *J. Wildl. Dis.* 46, 195-208.
- Ludwig, G.V., Calle, P.P., Mangiafico, J.A., Raphael, B.L., Danner, D.K., Hile, J.A., Clippinger, T.L., Smith, J.F., Cook, R.A., Macnamara, T., 2002, An outbreak of West Nile virus in a New York City captive wildlife population. . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 67-75
- Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J.B.F., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H.G.G., 2009, Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 23, 450-461.
- Lewis N. S, Daly J. M, Russell C. A, D. L. Horton, E. Skepner, N. A. Bryant, D. F. Burke, A. S. Rash, J. L. N. Wood, T. M. Chambers, R. A. M. Fouchier, J. A. Mumford, D. M. Elton, Smith, D.J., 2011, Antigenic and Genetic Evolution of Equine Influenza A (H3N8) Virus from 1968 to 2007. *Journal of virology* 85, 12742–12749.
- Lu, Z., Chambers, T.M., Boliar, S., Branscum, A.J., Sturgill, T.L., Timoney, P.J., Reedy, S.E., Tudor, L.R., Dubovi, E.J., Vickers, M.L., Sells, S., Balasuriya, U.B.R., 2009, Development and Evaluation of One-Step TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays Targeting Nucleoprotein, Matrix, and Hemagglutinin Genes of Equine Influenza Virus. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3907-3913.

- Lu, Z., Dubovi, E.J., Zyllich, N.C., Crawford, P.C., Sells, S., Go, Y.Y., Loynachan, A.T., Timoney, P.J., Chambers, T.M., Balasuriya, U.B.R., 2010, Diagnostic Application of H3N8-Specific Equine Influenza Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of Canine Influenza Virus in Clinical Specimens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 942-945.
- Marenzoni, M.L., Coppola, G., Maranesi, M., Passamonti, F., Cappelli, K., Capomaccio, S., Supplizi, A.V., Thiry, E., Coletti, M., 2010, Age-dependent prevalence of equid herpesvirus 5 infection. *Vet Res Commun* 34 703-708.
- McGorum Bruce C, D.P.M., Robinson N Edward and Schumacher Jim, 2007, *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, 677 p.
- Mongoh, M., Hearne, R., Dyer, N., Khaita, M., 2008, The economic impact of West Nile virus infection in horses in the North Dakota equine industry in 2002. *Trop Anim Health Prod* 40, 69-76.
- Morens, D.M., Taubenberger, J.K., 2010, Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza Other Respi Viruses* 4, 327-337.
- Mumford JA, Hannant D, DM., J., 1990, Experimental infection of ponies with equine influenza (H3N8) viruses by intranasal inoculation or exposure to aerosols. *Equine Vet J.* 22, 93-98.
- Murcia, P.R., Baillie, G.J., Daly, J., Elton, D., Jarvis, C., Mumford, J.A., Newton, R., Parrish, C.R., Hoelzer, K., Dougan, G., Parkhill, J., Lennard, N., Ormond, D., Moule, S., Whitwham, A., McCauley, J.W., McKinley, T.J., Holmes, E.C., Grenfell, B.T., Wood, J.L.N., 2010, Intra- and Interhost Evolutionary Dynamics of Equine Influenza Virus. *J. Virol.* 84, 6943-6954.

- Murcia, P.R., Wood, J.L.N., Holmes, E.C., 2011, Genome-Scale Evolution and Phylodynamics of Equine H3N8 Influenza A Virus. *J. Virol.* 85, 5312-5322.
- Murray, K., 2010, West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Veterinary Research* 41.
- Myers, C.a.W., W.D., 2006, Equine influenza virus. *Clinical Techniques in Equine Practice* 187-196.
- Oxburgh, L., Klingeborn, B., 1999, Cocirculation of Two Distinct Lineages of Equine Influenza Virus Subtype H3N8. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3005-3009.
- Papin, J.F., Vahrson, W., Dittmer, D.P., 2004, SYBR Green-Based Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of West Nile Virus Circumvents False-Negative Results Due to Strain Variability. *Journal of clinical microbiology* Vol. 42, 1511–1518.
- Papin, J.F., Vahrson, W., Larson, L., Dittmer, D.P., 2010, Genome-wide real-time PCR for West Nile virus reduces the false negative rate and facilitates new strain discovery. *J Virol Methods* 169 103–111.
- Park, A.W., Wood, J.L.N., Daly, J.M., Newton, J.R., Glass, K., Henley, W., Mumford, J.A., Grenfell, B.T., 2004, The effects of strain heterology on the epidemiology of equine influenza in a vaccinated population. *Proc R Soc B* 271, 1547-1555.
- Petermann, H.G., Fayet, M.T., Fontaine, M., Fontaine, M.P. 1970. Vaccination against equine influenza. In *Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases*, p. 105±110.
- Pusterla, N., Madigan, J.E., Leutenegger, C.M., 2006a, Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases. *J Vet Intern Med* 20, 3-12.

- Pusterla, N., Wilson, W.D., Conrad, P.A., Barr, B.C., Ferraro, G.L., Daft, B.M., Leutenegger, C.M., 2006b, Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy *Veterinary Record* 159 341-346.
- Quinlivan, M., Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T., Palese, P., 2005b, Attenuation of Equine Influenza Viruses through Truncations of the NS1 Protein. *J. Virol.* 79, 8431-8439.
- Quinlivan, M., Cullinane, A., Nelly, M., van Maanen, K., Heldens, J., Arkins, S., 2004, Comparison of Sensitivities of Virus Isolation, Antigen Detection, and Nucleic Acid Amplification for Detection of Equine Influenza Virus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 759-763.
- Quinlivan, M., Dempsey, E., Ryan, F., Arkins, S., Cullinane, A., 2005, Real-Time Reverse Transcription PCR for Detection and Quantitative Analysis of Equine Influenza Virus. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5055-5057.
- Radostits O.M, e.a., 2002, *Medicina Veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*, Vol II, Novena Edition.
- Rios J, e.a., 2010, OAS1 Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to West Nile Encephalitis in Horses. *Plos one* Volume 5.
- Root, J.J., P. T. Oesterle, N. M. Nemeth, K.Klenk, D. H. Gould, R. Mclean, L. Clark, a., Hall, J.S., 2006, Experimental infection of fox squirrels (*Sciurus niger*) with West Nile virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 697–701.
- Sandoval, G.A., 2007. Seroprevalencia de anemia infecciosa equina en el municipio de Mexicali, Baja California. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California.
- Scicluna, M.T., Issel, C.J., Cook, F.R., Manna, G., Cersini, A., Rosone, F., Frontoso, R., Caprioli, A., Antonetti, V., Autorino, G.L., 2013, Is a diagnostic system based

- exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology* 165, 123-134.
- Sellon, D.C., Long, M.T., 2007, *Equine infectious diseases* second edition. 142.
- Shannan L, 2010, West Nile Virus. *Clin Lab Med* 30, 47–65.
- Tasha Epp, Cheryl Waldner, Keith West, Townsend, H., 2007a, Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Can Vet J* 48, 1137–1145.
- Tasha Epp, Cheryl Waldner, Keith West, Townsend, H., 2007b, Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Can Vet J* 48 1137–1145.
- Téllez, I., Calderón, O., Franco-Paredes, C., del Río, C., 2006, El virus del Oeste del Nilo: una realidad en México. *Gac Med.* 142.
- Trock., S.C., Meade., B.J., Glaser., A.L., Ostlund., E.N., Lanciotti., R.S., Cropp., B.C., Kulasekera., V., Kramer., L.D., Komar., N., 2001, West Nile Virus Outbreak Among Horses in New York State, 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis* 7, 745–747.
- Waddell, G.H., Teigland, M.B., Sigel, M.M., 1963, A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 143
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E., Flavell, R.A., 2004, Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Medicine* , 10, 1366 - 1373.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Yoshihiro, A.K., 1992b, Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological reviews* 56, 152-179.
- Whetter, L., Archambault, D., Perry, S., Gazit, A., Coggins, L., Yaniv, A., Clabough, D., Dahlberg, J., Fuller, F., Tronick, S., 1990, Equine infectious anemia virus derived from a molecular clone persistently infects horses. *J. Virol.* 64, 5750-5756.

- Wood, J.L.N., Newton, J.R., Chanter, N., Mumford, J.A., 2005, Association between Respiratory Disease and Bacterial and Viral Infections in British Racehorses. *Journal of clinical microbiology* 43, 120–126.
- Zhang, B., Sun, C., Jin, S., Cascio, M., Montelaro, R.C., 2008, Mapping of Equine Lentivirus Receptor 1 Residues Critical for Equine Infectious Anemia Virus Envelope Binding. *J. Virol.* 82, 1204-1213.
- Zielonka, J., Bravo, I.G., Marino, D., Conrad, E., Perkovic, M., Battenberg, M., Cichutek, K., Munk, C., 2009, Restriction of Equine Infectious Anemia Virus by Equine APOBEC3 Cytidine Deaminases. *J. Virol.* 83, 7547-7559.