



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Comparación de 3 pruebas diagnósticas comerciales para detectar anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina en caballos”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

Becerra Sánchez Karen Janet

Asesor: Dr. Hugo Ramírez Álvarez

Coasesor: Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

Cuautitlán, Izcalli, Estado de México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

"Comparación de 3 pruebas diagnósticas comerciales para detectar anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina en caballos"

Que presenta la pasante: KAREN JANETT BECERRA SÁNCHEZ
Con número de cuenta: 30329747-9 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. José Margarito Rojo López	
VOCAL	M.V.Z. María de Lourdes Jara Ramírez	
SECRETARIO	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Gerardo Arcila López Tello	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Eréndira De la Fuente Mancera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/nim*

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
• Anemia Infecciosa Equina.....	3
• Historia.....	3
• Etiología.....	4
• Replicación.....	6
• Transmisión.....	8
• Signos clínicos.....	10
• Patología clínica.....	13
• Patogenia.....	15
• Diagnóstico.....	17
○ Coggins.....	18
○ ELISA.....	20
Justificación.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivo general y específicos.....	24
Materiales y métodos.....	25
• Localización.....	25
• Animales de estudio.....	25
• Colección de muestras.....	25
• Procesamiento de las muestras.....	26
• Evaluación serológica.....	26
○ ELISA.....	26
○ Coggins.....	26
• Análisis de resultados.....	27
Resultados.....	27
• Análisis de Resultados.....	32
Discusión.....	33
Conclusión.....	38
Bibliografía.....	39
Apéndices.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema del Virus de Anemia Infecciosa Equina.....	4
Figura 2.- Ciclo de replicación del virus de Anemia Infecciosa Equina.....	6
Figura 3.- Vías de transmisión del Virus de Anemia Infecciosa Equina.....	8
Figura 4.- Equino en postración por ataxia positivo al VAIE.....	11
Figura 5.- Caballo con hemorragia petequiral en mucosa nasal.....	11
Figura 6.- Caballo con ictericia en mucosa oral y conjuntival.....	12
Figura 7.- Caballo con Epistaxis.....	12
Figura 8.- Fagocitosis de eritrocitos relacionado a una hipersensibilidad de tipo III en caballos infectados con el virus de Anemia Infecciosa Equina	16
Figura 6 Inmunodifusión en Agar Gel.....	19
Figura 7.- Prueba de ELISA indirecta para la detección de AIE control positivo.....	21
Figura 11.- Control positivo de la prueba de Coggins.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tabla de parámetros hematológicos normales en equinos.....	14
Tabla 2.- Equinos positivos y negativos a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales clasificados por la presencia o ausencia de signos.....	27
Tabla 3.- Resultados obtenidos en la población de equinos evaluada con 3 diferentes pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra el VAIE.....	29
Tabla 4.- Equinos positivos y negativos a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en las pruebas de ELISA comerciales según la zona geográfica.....	30
Tabla 5.- Muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales, clasificados por municipios del Estado de México.....	31
Tabla 6.- Muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales clasificados por fin zootécnico.....	31
Tabla 7.- Muestras positivas y negativas a anticuerpos contra el VAIE a las pruebas de ELISA comerciales clasificados por Raza.....	32
Tabla 8.- Muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales clasificados por sexo.....	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1.- Resultados positivos (13) y negativos (128) totales de los equinos estudiados, clasificados en grupos con presencia y con ausencia de signos clínicos.....	28
Gráfica 2.- Resultados obtenidos en la detección de anticuerpos contra VAIE clasificando equinos positivos y negativos en las tres diferentes pruebas serológicas comerciales utilizadas para este estudio.....	29

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1.- Manual de proceso de la prueba de ELISA para el diagnóstico de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina ViraCHECK®/EIA.....	43
Apéndice 2.- Manual de proceso de la prueba de ELISA para el diagnóstico de anticuerpos Anemia Infecciosa equina VMRD.....	46
Apéndice 3.- Manual de proceso de la prueba de AGID para el diagnóstico de anemia infecciosa equina VMRD.....	50
Apéndice 4.- Datos de los caballos a los cuales se les tomó muestra.....	58

A la naturaleza le pedí paz, me mostro el campo
Al destino ser feliz, me enseñó el amor
A dios vivir plenamente, me brindo familia y amigos

Entonces...

Mire al cielo y rogué fuerzas para seguir el camino,
La naturaleza, el destino y Dios me brindaron al CABALLO

Gabriel Oliverio





Dedico esta tesis a mis personas, aquellas que solo están a mi lado de manera espiritual, a mis abuelos Félix Becerra, Catalina Medellín y Jesús Sánchez. En especial dedico esta tesis al hombre que me alentó en cada paso de mi carrera a ti Juan Raúl Aguilar Tovar porque la gente solo muere cuando la olvidan

Principalmente quiero agradecer a Dios por permitirme vivir y desarrollarme como mujer y profesional, a mis muy amados padres Ricardo Becerra Medellín y Martha Luisa Sánchez Cruz pues ellos son el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, en ellos tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes infinitas y su gran corazón me llevan a admirarlos cada día más.

A mi asesor de tesis Hugo Ramírez y a mi coasesor Humberto Martínez por su dedicación, disponibilidad, guía e infinita paciencia en la realización de este proyecto, lo logramos!!

A mi hermano Ricardo Becerra Sánchez, por estar siempre a mi lado y apoyarme como amigo. Siempre eres al que le cuento todo, confié en ti como en nadie, gracias por todo, y a pesar de las peleas somos hermanos y siempre estaremos juntos.

A mis tías Alma Delia Soto Medellín y Martha Alejandra Soto Medellín mas que mis tías, después de mis padres son las que más se preocupaban por mí. Sus palabras siempre fueron sinónimo de sabiduría me enseñaron muchas cosas vitales para la vida y me encaminaron por el buen sendero.

A ti amada amiga Patricia Huerta porque siempre estuviste a mi lado inclusive en momentos y situaciones tormentosas, no fue sencillo terminar con este proyecto pero tú siempre estuviste conmigo brindándome motivación y esperanza.

A las familias Medellín, Sánchez y Becerra quienes suponen los cimientos de mi desarrollo, todos y cada uno de ustedes han destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, para brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida.

A mis amigos Jair Vargas, Roberto Juárez, Mazul Morales, Mariana Padilla Ángel Vergara, Manuel Duran, y a todo el equipo del laboratorio de Virología de la FESC sin su apoyo esto no hubiera sido posible

Por último y no menos importante a ti mí querido compañero Enrique Martínez agradezco tus increíbles esfuerzos, tu afecto y tu cariño son los detonantes de mi felicidad, gracias por ayudarme a encontrar el lado dulce de la vida, fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de tesis.



Resumen

La presente tesis describe los aspectos importantes del Virus de Anemia Infecciosa Equina (VAIE) así como también encontrar algunos métodos de diagnóstico confiables en cuanto a sensibilidad y especificidad entre 3 técnicas distintas para diagnosticar la infección. Dentro de la presente tesis se demostró que las pruebas de ELISA comerciales tienen mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de Coggins, la cual está considerada como la prueba principal para confirmar el VAIE; ya que en México se ha descrito una prevalencia de la enfermedad baja, y es importante obtener información sobre la eficiencia de pruebas diagnósticas.

En el presente trabajo se estudiaron 141 caballos de diferente fin zootécnico (carreras, charrería, salto y trabajo de campo) y diferente raza (pura sangre inglés, criollo y cuarto de milla), a los que se procedió a tomar muestra de sangre y realizar el procedimiento para extracción de suero; para posteriormente evaluarlos con ELISA y Coggins. Teniendo como resultado 13 caballos seropositivos a ELISA y no así a Coggins por lo que concluimos que la prueba de ELISA es más sensible que la prueba de Coggins.

Introducción

Ningún ser animal, salvo quizás el perro, tiene significado para el hombre como el caballo. Ninguno tiene la influencia tan profunda en la vida humana, especialmente en México. La historia del caballo al servicio del hombre ha estado vinculado desde tiempos inmemoriales al proceso de evolución económica y social de los pueblos, al inicio el valor del caballo solo se resumía en la conveniencia de obtener con facilidad comida, vestido y su grasa como combustible, pero esto no fue por mucho tiempo, ya que asumió un papel de mayor importancia al servir como medio de transporte, comunicación y sobretodo de conquista (Oseguera, 2002).

En nuestro país, el caballo ha estado presente desde la conquista hasta nuestros días, tanto en los escenarios de la independencia y la revolución como en el trabajo de campo, la charrería y el hipismo, es innegable la trascendencia que tiene este animal en el desarrollo histórico de nuestro país, así como su contribución en el enriquecimiento cultural de México (Oseguera, 2002).

La población de équidos en México según lo que nos indica la FAO es de 6,350,000 cabezas para México divididos en asnos, mulas y caballos. (FAO, 2017)

Los caballos a pesar de ser animales fuertes y muy capaces sufren de distintas enfermedades que pueden mermar su eficiencia en cualquier actividad zootécnica que ellos realicen, estas enfermedades son muchas y de etiología variada.

Anemia Infecciosa Equina

La enfermedad de Anemia Infecciosa Equina (AIE) es un padecimiento contagioso de los equinos que se caracteriza por presentar un curso crónico después de un cuadro agudo inicial. La replicación del virus en los macrófagos origina una anemia aguda mediada inmunológicamente (OIE, 2004). Esta enfermedad tiene muchas sinonimias en diferentes regiones del mundo entre ellas tenemos “Fiebre de los pantanos”, “Anemia perniciosa de los equinos”, “Zurra americana” o “Sida de los equinos” entre otros siendo esta última la más utilizada en México (Brangan y cols., 2008).

Historia

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) fue investigada en Francia en el año de 1843 y, en los Estados Unidos de América en forma experimental en 1888. Esta enfermedad es históricamente importante debido a que fue la primera enfermedad equina causada por un virus filtrable, el cual pudo permanecer viable aun pasándolo a través de un filtro especial de laboratorio (Coggins y Kemen., 1976).

La AIE es la primera enfermedad causada por un retrovirus que se ha comprobado ser transmitida por insectos desde 1904 en donde se determinó su etiología viral; y la primera enfermedad viral para la cual se aprobó una prueba diagnóstica establecida por Coggins y Leroy en el año de 1970 y que el Gobierno de los Estados Unidos de América aprobara en Noviembre de 1972, reconociéndola como la prueba oficial para la detección de animales portadores del virus, con lo cual se ha reducido la cantidad de brotes clínicos, el costo del diagnóstico y el tiempo de procesamiento de las muestras (OIE, 2004).

Etiología

El Virus de Anemia Infecciosa Equina (VAIE) ha sido reconocido como un Lentivirus que causa enfermedades progresivas y mortales, con un tamaño de 80 a 130 nm, simetría icosaédrica de la cápside, presentando envoltura y un genoma lineal diploide de sentido positivo. El ARN del VAIE es de un tamaño de 10 kb, el lugar de replicación viral es en el núcleo y el lugar del ensamblaje es en el citoplasma (Figura 2) (Cook y cols., 2002).

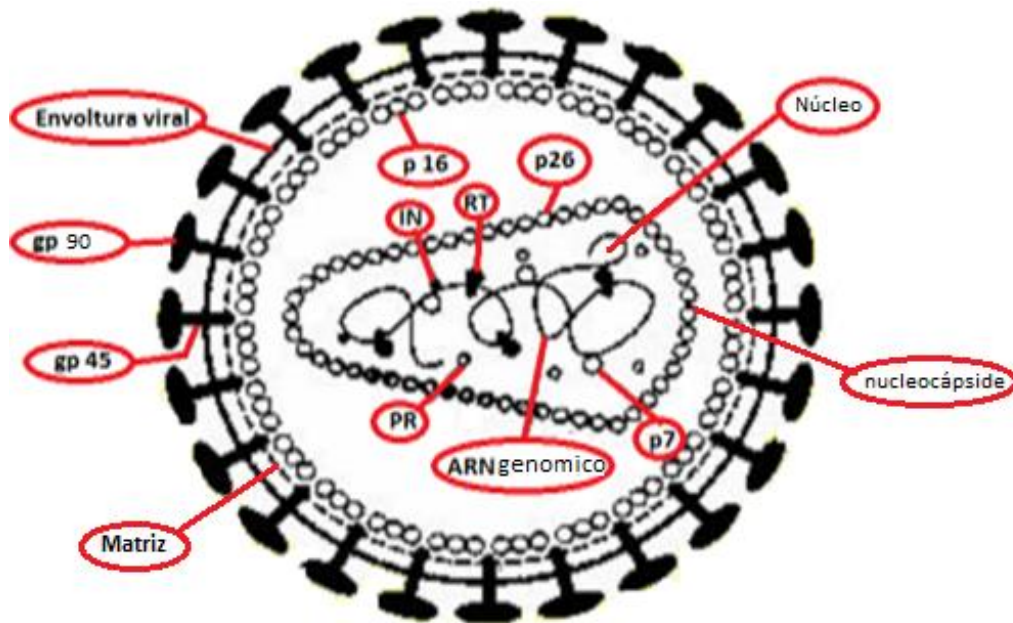


Figura 1.- Esquema del Virus de Anemia Infecciosa Equina: gp100 glicoproteína de superficie; gp46 glicoproteína de membrana; Nucleocápside; p16 proteína de matriz; p26 proteína de cápside; IN Integrasa; PR proteasa; RT transcriptasa reversa; (ilustración tomada y modificada de www.livex.com.ec)

El ARN viral está protegido por la nucleocápside y esto a su vez está envuelto por la proteína de matriz y proteínas de superficie (gp 90 y gp 45). (Cook y cols., 2002). La envoltura viral es tomada de la membrana plasmática de la célula hospedadora en la cual ya están integradas las glicoproteínas virales de membrana (gp 45) y superficie (Gp 95) (Fig. 1). El genoma del

retrovirus está compuesto por tres genes principales (*gag*, *pol* y *env*) y varios genes accesorios. (Liu y Cols., 2015)

Este virus es relativamente resistente al medio ambiente, así como a la ebullición durante 15 minutos y desinfectantes, pero es destruido por la luz ultravioleta. Los lentivirus pueden ser inactivados a 50°C por 3 horas y a 60°C por 15 minutos, son viables a un pH entre 6 y 12 y en el ambiente a 37°C durante 37 días. Persiste durante varios meses a temperatura ambiente en orina, heces, sangre desecada y suero. Dentro de los productos químicos a los cuales los lentivirus son susceptibles se puede mencionar el éter y betapropiolactona a una concentración de 0.4 %; así como a la formalina al 0.1 %, fenol y los productos iodóforos (Cook y cols., 2002).

Este virus no es infeccioso para otras especies animales y, ha sido el primer virus que *in vitro*, se ha relacionado con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), a través de reacciones cruzadas en pruebas de suero sanguíneo. Estos dos lentivirus comparten muchas fracciones estructurales y bioquímicas; el VAIE ha sido de importancia como modelo a tomar para muchos aspectos en la investigación del VIH, especialmente en el descubrimiento de los mecanismos comunes del control inmunológico (Cook y cols., 2001).

La estructura y la función de las partículas virales del VAIE son similares a la de otros lentivirus, la organización y la replicación del material genético es menos complejo. El ARN viral sirve como molde para que la enzima viral transcriptasa reversa catalice la formación de una copia de ADN (ADN proviral), el que se integra con el material genético de las células del hospedador para permanecer de forma latente (Liu y Cols., 2015).

Replicación

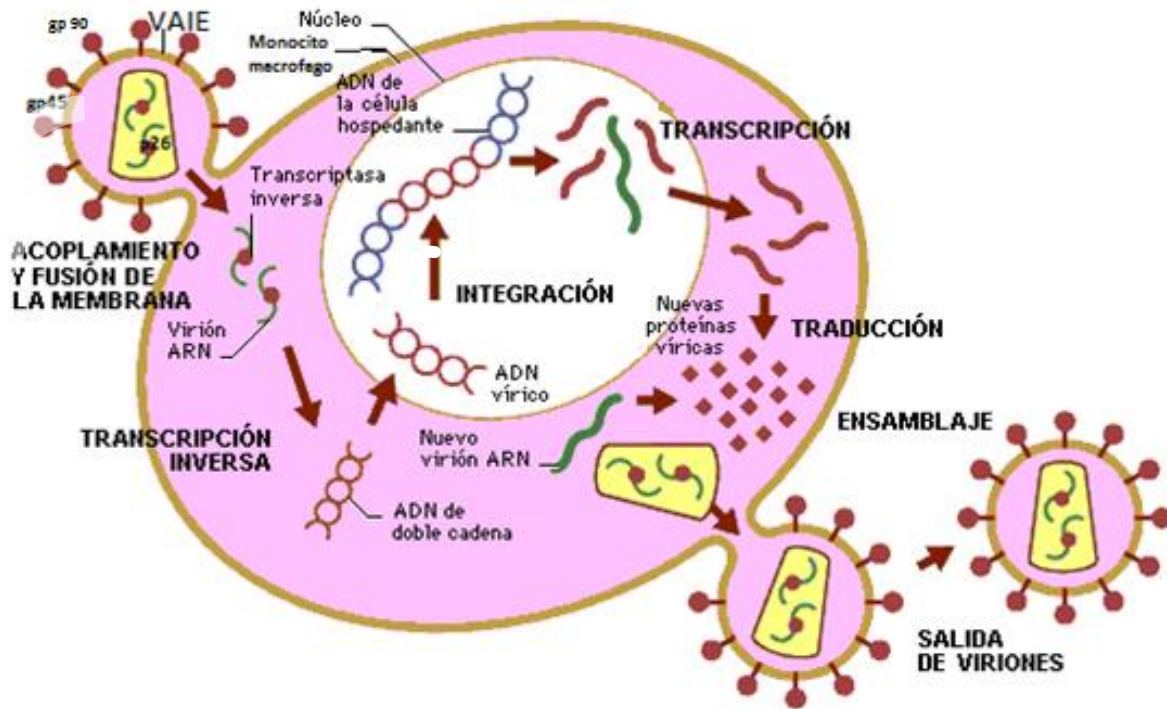


Figura 8.- Ciclo de replicación del virus de la Anemia Infecciosa Equina (Issel y cols., 2013).

El acoplamiento tiene lugar cuando las proteínas del VAIE reconocen al receptor ubicado en el monocito/macrófago llegando a dicha célula y uniéndose ya que se activan otras proteínas presentes en la membrana de la célula, esto permite que ambas membranas se fusionen liberando la cápside dentro de la célula blanca. La cápside viral se rompe para liberar el ácido nucleico en el citoplasma celular, proceso que se conoce como denudación (Fig. 2). (Issel y cols., 2013).

El virus tiene una transcriptasa inversa, que copia el genoma de ARN para formar una copia de ADN, llama la atención el hecho de que el virus transporta ARN de transferencia que actúa como cebador para la síntesis de ácido nucleico. La transformación del ARN en ADN tiene lugar en dos pasos. En primer lugar la transcriptasa inversa copia el ARN para formar un híbrido ARN-ADN, a continuación, el componente ribonucleasa H de la transcriptasa inversa degrada la cadena de ARN para dejar ADN y, después sintetizar la

hebra de ADN, así mismo la transcriptasa inversa copia esta cadena para producir ADN bicatenario denominado ADN proviral el cual es capaz de dirigir la síntesis de mARN y de nuevas copias de ARN genómicas víricas. (Fig. 2). (Prescott y cols., 2009).

Una vez que se ha fabricado el ADN proviral, este adopta una forma circular y se incorpora o se integra en el cromosoma de la célula huésped. Los productos víricos solo se forman después de la integración y en ocasiones estos virus integrados pueden transformar las células huésped en tumorales. (Fig. 2). (Prescott y cols., 2009).

Una vez generadas las cadenas de proteínas virales la proteasa actúa como una tijera dividiendo dichas cadenas en pequeñas proteínas individuales que pueden cumplir varias funciones; algunas se transforman en enzimas del VAIE tales como la transcriptasa inversa, mientras que otras se unen a las copias del material genético, ensamblándose así nuevas partículas del VAIE (Fig. 2). El nuevo virus ensamblado “gema” de la célula y al desprenderse se lleva consigo parte de la membrana celular. De esta manera los viriones salen y pueden infectar a una nueva célula (Fig. 2). (Issel y cols., 2013).

El virus puede cultivarse en células fibroblásticas de equinos y solamente se replica en la línea monocitos/macrófagos de equinos. En la inoculación experimental, el virus se encuentra en la sangre del equino infectado de 2 a 5 días después y, se observa la reacción febril hasta el décimo o vigésimo noveno día. El virus se localiza especialmente en bazo, hígado, riñón y linfonodos. El virus no está presente en los tejidos durante los períodos clínicos graves. La viremia es persistentemente baja durante toda la vida del caballo, a excepción de los períodos de presentación de cuadros clínicos, que es cuando el animal es más infeccioso (Issel y cols., 2013).

La enfermedad, no deja ninguna inmunidad protectora, por lo que los animales infectados pueden enfermar gravemente y morir al cabo de meses

o años, inclusive tras largos períodos apiréticos. Siendo más susceptibles los animales desnutridos, débiles y parasitados (Issel y cols., 2013).

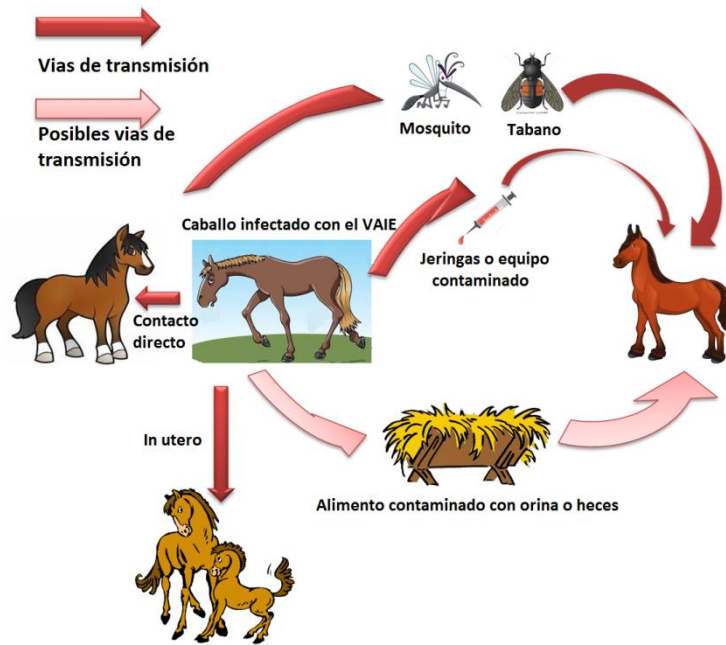


Figura 9.- Vías de transmisión del Virus de Anemia Infecciosa Equina

Modificado de Kemen, 1972

Transmisión

Por definición la transmisión es el contagio de la enfermedad de un individuo a otro, es posible que se de en manera Horizontal es decir de un individuo a otro que no tienen una relación madre-hijo, o bien de manera vertical en donde la trasmisión es de madre a cría ya sea en el útero o bien en la lactancia (Tashjian, 2008).

En el caso del VAIE existen diversas formas de contagio (Fig. 3) siendo la más importante la transmisión indirecta ya que es la que tiene un alto grado de complejidad al momento del control. Son los tábanos y moscas de los establos (*Stomoxys calcitrans*) los principales vectores de este tipo de transmisión, los mosquitos (*Anopheles*) son también significativos, pero no

son considerados tan importantes en la cadena epidemiológica de la transmisión del virus; así mismo, en caballos con heridas abiertas actúan también como vectores las moscas de aparato bucal lamedor (*fam. Muscidae*); por su parte, los ácaros y garrapatas no tienen importancia como agentes transmisores (More y cols., 2008).

La mordida de los tábanos estimula un movimiento defensivo del caballo, el que usualmente resulta en la interrupción de la succión de sangre. Por lo que la mosca es motivada a completar el proceso de alimentación lo antes posible, y es cuando se da el ataque al mismo individuo o a otro hospedero, hasta quedar pletórica. De esta manera cualquier material infectivo que provenga de la sangre del primer hospedero puede ser transmitido mecánicamente hacia el segundo (Stein y Mott, 2004).

La transmisión del VAIE por medio de insectos es dependiente del número y hábitos de los insectos, la densidad de la población equina, el número de veces que el insecto pica al mismo u otro caballo, la cantidad de virus transferido entre caballos y el nivel del virus sanguíneo del caballo infectado (Stein y Mott, 2004).

Otra forma de transmisión indirecta puede ser la iatrogénica al no esterilizar los implementos quirúrgicos, al inyectar diferentes caballos con la misma jeringa o bien al saber que el caballo ha sido diagnosticado con el VAIE y se le permite convivir con el resto de la población y en el entorno se localizan vectores; es de esperar que se lleve a cabo la transmisión entre caballos (Tashjian., 2008).

La transmisión directa es debida a que el virus puede eliminarse por las excreciones y secreciones de los animales infectados, se considera una posible fuente de contagio el agua y el alimento contaminado; aunque sería relevante solo sí el animal presentara lesiones en aparato bucal,

constituyéndose así la puerta de entrada del virus en dosis infectantes suficientes (Tashjian., 2008).

El virus puede adquirirse por medio del coito, siendo esta una transmisión importante en razas en las que únicamente pueden realizar la monta directa, o bien, si se realiza inseminación artificial utilizando semen de machos no evaluados pudiendo favorecer el contagio (More y cols., 2008).

Por otra parte, la transmisión vertical es posible en yeguas gestantes infectadas que transmiten el virus a la cría, aunque no está todavía claro en qué momento ocurre dicha infección, si sucede durante la gestación, o en el periodo del parto o durante la lactancia, pero es necesaria la ingestión de cantidades relativamente grandes de virus, ya que el aparato gastrointestinal no es una puerta de entrada apropiada para monocitos y/o macrófagos que contiene el calostro (Liu y Cols, 2015).

Signos clínicos

Los signos clínicos que presenta el caballo al ser infectado con el VAIE aparecen 14 días postinfección, ya que este es el tiempo determinado para su incubación. La enfermedad se presenta de forma aguda, subaguda, crónica e inaparente; estadios difícilmente de identificar entre sí. Los signos que se presentan en las fases aguda y subaguda son de grado variable, generalmente es raro observarlas en situaciones naturales y son las formas de la enfermedad que más daño causan debido a que los signos aparecen rápidamente; como regla general se observa depresión inicial, debilidad intensa y deterioro del estado general. La ataxia (Fig. 4) es un signo importante en muchos de los casos crónicos y en algunos es la única anormalidad clínica observada (Villalobos, 2016).



Figura 10.- Equino en postración por ataxia positivo al VAIE (González del pino, 2011).

Existe fiebre intermitente hasta 41°C , que puede elevarse y caer rápidamente, en algunos casos dura menos de 24 horas, con fluctuaciones de hasta 1°C en una hora. También se pueden observar hemorragias petequiales en la mucosa nasal (Fig. 5), conjuntival y especialmente sublingual, signo considerado como característico de la enfermedad; es posible observar ictericia (Fig. 6), edema en la porción ventral del abdomen, en el prepucio y las extremidades (Villalobos, 2016).



Figura 11.- Caballo con hemorragia petequeial en mucosa nasal (González del pino,



Figura 6.- Caballo con ictericia en mucosa oral y conjuntival (González del pino 2011).

En las etapas iniciales de la enfermedad las mucosas se observan congestionadas y edematosas. Hay un aumento característico en la frecuencia e intensidad de los ruidos cardíacos, que se exacerban durante el ejercicio moderado. La disnea se observa en las etapas terminales, pero se puede presentar epistaxis antes de ello (Fig. 7) (Villalobos, 2016).



Figura 7.- Caballo con Epistaxis (González del pino, 2011).

La esplenomegalia es tan intensa que frecuentemente puede ser detectada por exploración rectal. En las yeguas gestantes se puede presentar aborto en el segundo tercio de la gestación. Muchos animales se recuperan de esta etapa aguda después de un curso de 3 días a 3 semanas. Otros se debilitan progresivamente, caen en decúbito lateral y mueren después de 10 a 14 días de iniciados los signos clínicos de la enfermedad. Los caballos que se recuperan, temporalmente pueden permanecer normales durante 2 o 3 semanas y luego recaen con signos similares, generalmente menos graves. Las recaídas ocurren frecuentemente coincidiendo con períodos de estrés y, se caracterizan por períodos febriles y recidivantes, como adelgazamiento progresivo, debilidad e insuficiencia cardíaca, otro signo es la palidez de las mucosas. La viremia se presenta durante todo el curso de la enfermedad e incluso durante toda la vida del caballo. Si el animal no muere en un período de 2 a 3 semanas la enfermedad puede tornarse crónica y los animales infectados que logran sobrellevar la infección se observan en buenas condiciones. En esta etapa puede observarse alotriofagia (pica) (Villalobos, 2016).

Patología clínica

Dentro de los valores de laboratorio que se pueden determinar son anemia severa y suficiente para causar la muerte con recuentos eritrocitarios muy bajos, de hasta 1×10^{12} por litro, hemoglobina de 25 a 50 g/litro y hematocrito de 0,08 a 0.15 litro/litro. Hay una trombocitopenia constante durante los períodos febriles, lo que constituye la base de las petequias. En las etapas tempranas de la enfermedad hay anisocitosis, con poiquilocitosis moderada, característicamente ningún policromático. En la etapa temprana de un ataque agudo hay macrocitosis, a veces hasta un volumen celular medio de 1774.2 ml. (tabla 1) Más tarde la enfermedad se vuelve normocromática y normocítica. Hay leucopenia y neutropenia, desviación mínima a la izquierda, linfopenia y una monocitosis relativa. Los monocitos

con frecuencia contienen glóbulos rojos ingeridos (sideroleucocitos). Los niveles de 4 por 10,000 sideroleucocitos constituyen un diagnóstico positivo de la enfermedad (Villalobos, 2016).

Tabla 2 Tabla de parámetros hematológicos normales en equinos (Merck, 2000)

Hematología	Unidad	Referencia en equinos
Eritrocitos	Mill/mm ³	6-10.43
Leucocitos	/mm ³	5.600-12.100
Hematocrito	%	32-53
Hemoglobina	Gr./dl	11-19
V.C.M	ml	1035.074-1449.103
H.C.M	Pg	13.7-18.2
C.H.C.M	%	35.3-39.3
Plaquetas	X10 ³ /ul	100-350

Los sideroleucocitos están presentes en la sangre a los 2 o 3 días de un episodio febril y disminuyen con la temperatura. Los neutrófilos tienen cambios tóxicos moderados, con vacuolización y granulación azurófila.

Las células mononucleares son grandes y basofílicas y es difícil distinguir los linfocitos de los monocitos jóvenes. Las plaquetas son pequeñas, uniformemente basofílicas, con un nivel bajo normal de granulación y las células inmaduras se encuentran con poca frecuencia. La ictericia siempre está presente en los caballos anémicos y febriles y la bilirrubina está entre 170 y 250 mmol/litro mientras que los valores de referencia son de hasta 54.72 mmol/litro la mayor parte no está conjugada. Se observa lipemia ocasionalmente en el cuadro agudo. Con la cronicidad de la enfermedad hay una caída en la albúmina de aproximadamente 10 g/litro y se produce un aumento en las gammaglobulinas de tal manera que la proteína total permanece relativamente sin cambio y la relación albúmina-globulina está disminuida. El hierro sérico aumenta en el cuadro agudo y cae con la cronicidad (Villalobos, 2016).

Patogenia

La patogenia del virus no es del todo compleja ya que la infección produce daño a la capa íntima capilar, con afectación del sistema reticuloendotelial, produciéndose gran destrucción de eritrocitos. A las lesiones del endotelio le siguen cambios inflamatorios en los órganos parenquimatosos, sobretodo en el hígado. Se producen cambios similares en el tejido nervioso desencadenándose ataxia, leptomeningitis espinal y encefalomiелitis, signos característicos en la presentación clínica de la enfermedad. La enfermedad aguda se asocia con la replicación masiva del virus y con la destrucción de macrófagos aunque la causa se desconoce (Cook y cols., 2002).

La hemólisis se caracteriza por la breve duración de los eritrocitos, así como la fragilidad vascular y eritrocitaria forman parte de una reacción de tipo III complejos inmunes. El virus puede atravesar la barrera placentaria e infectar al feto (Cook y cols., 2002).

Todos los signos clínicos corresponden con la aparición de anticuerpos circulantes, los cuales son fijadores de complemento pero no neutralizantes del virus. El tercer componente del complemento aparece sobre las membranas de los eritrocitos y esto responde por el reconocimiento de los macrófagos y es cuando se produce la eritrofagocitosis (Fig. 8) (Cheevers y Mcguire, 2004).

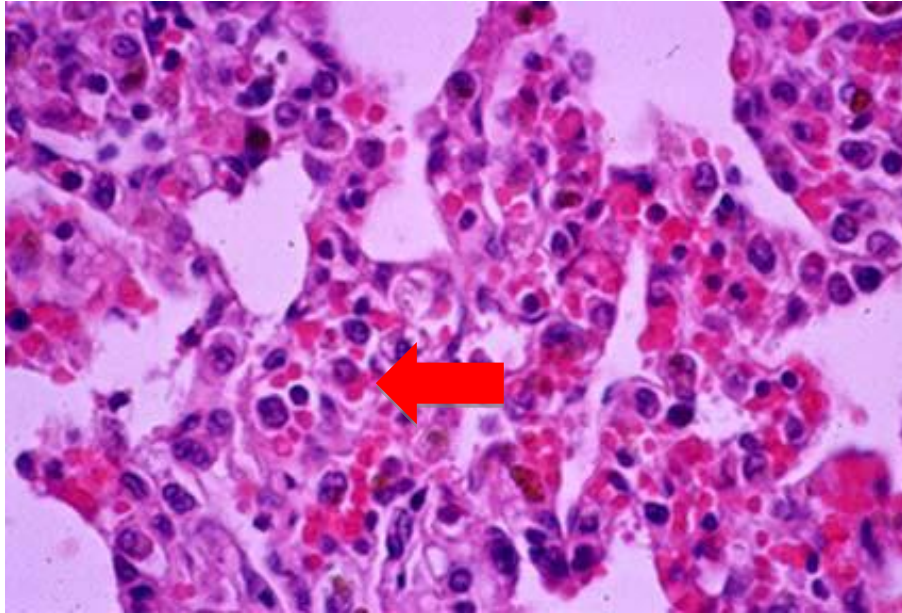


Figura 8.- Fagocitosis de eritrocitos relacionado a una hipersensibilidad de tipo III en caballos infectados con el virus de Anemia Infecciosa Equina (Cook y Cols., 2002).

Los anticuerpos IgG e IgM no se encuentran fijados a los eritrocitos, pero se cree que reaccionan específicamente con las proteínas virales adsorbidas en los eritrocitos. La médula ósea se muestra al principio con una respuesta muy elevada, presentando una desviación hacia arriba en el volumen celular medio y anisocitosis marcada posteriormente la médula se vuelve hipoproliferativa (Cheevers y McGuire, 2004).

Un aspecto importante de la patogenia del VAIE es la evasión que realiza el virus ante la respuesta inmunitaria del hospedero, ya que los caballos recuperados del primer ataque de la enfermedad clínica, pueden permanecer normales durante semanas o meses. Generalmente ocurren 3 o 4 recaídas antes de que el equino desarrolle una enfermedad emaciante o crónica, o de que se vuelva clínicamente normal. Las recaídas cíclicas del animal enfermo pueden estar separadas entre dos y ocho semanas. Cada episodio de la enfermedad tiende a ser menos grave que el anterior (fiebres más bajas y anemia menos intensa) (Cheevers y McGuire, 2004).

Diagnóstico

Ya que el cuadro clínico de la enfermedad es muy variable. Para emitir un diagnóstico confirmatorio resulta imprescindible la práctica de pruebas de laboratorio. Actualmente la OIE recomienda como método diagnóstico de elección la Inmunodifusión en Gel de Agar (AGID, por sus siglas en inglés) o Coggins la cual fue establecida por la OIE desde 1984, sin embargo, investigaciones recientes demuestran que esta prueba no es altamente eficiente en cuanto a la sensibilidad que se requiere (Cook y Cols., 2001).

Debido a la persistencia del VAIE en los équidos infectados, la detección serológica de anticuerpos sirve para confirmar el diagnóstico de la infección por dicho virus (Brangan y cols., 2008).

Los caballos expuestos al VAIE generalmente desarrollan una respuesta inmune detectable a los antígenos gp90 y gp45 (glicoproteínas de envoltura), y p26 (proteína de cápside) a los 45 días postinfección. Estos antígenos en general conservan la secuencia proteica y se mantienen en todas las cepas. Debido a esto, los laboratorios han utilizado las proteínas de envoltura del virus para detectar los anticuerpos generados por los caballos en respuesta a la infección con todas las cepas de campo. Los anticuerpos precipitantes (IgG) aparecen precozmente, al mismo tiempo que el anticuerpo de fijación de (IgG e IgM), pero duran más tiempo, el mismo tiempo que persiste el anticuerpo neutralizante. El período entre la inoculación y la aparición de la positividad de las reacciones puede ser hasta de 45 días. Los potros reaccionan positivamente cuando absorben anticuerpos del calostro de la madre y los títulos se hacen negativos entre los 65 a 182 días de edad (Kong y cols., 2010).

Para realizar un diagnóstico serológico en animales sospechosos de padecer la enfermedad de AIE se debe utilizar únicamente suero de equino. En el

campo se debe realizar la colecta de sangre asépticamente por medio de venopunción y colocarla en tubos limpios sin anticoagulante. La sangre debe dejarse coagular durante 1-2 horas a temperatura ambiente, mantenerse en posición horizontal durante toda la noche a 4°C y, tras esto, debe separarse el suero mediante centrifugación a 2,000-3,000 rpm durante 15 minutos o bien colocar el tubo en ángulo y en refrigeración hasta que se separe la formula roja del suero(Jodi y cols, 2013).

La reactividad de los anticuerpos a las técnicas serológicas puede verse afectada por un almacenamiento deficiente de las muestras, a consecuencia de una alteración en las inmunoglobulinas (Jodi y cols., 2013).

La conservación prolongada de anticuerpos puede conducir a la formación de fragmentos Fab monovalentes, lo que da lugar a la pérdida de anticuerpos específicos; la congelación y descongelación repetidas tienen efectos deletéreos y la utilización de crioprotectores y enzimas reduce o elimina el deterioro de las muestras. Los sueros congelados deben ser descongelados antes de su uso y utilizarse inmediatamente, ya que todo retraso conduce a un aumento en la tasa de proteólisis. Se deberán de mezclar las muestras varias veces antes de usarlas (Jodi y cols., 2013).

Si la muestra presenta turbidez, hemólisis o indicios visibles de crecimiento bacteriano no hay que utilizarla ya que puede interferir con el rendimiento y exactitud del análisis serológico (Jodi y cols., 2013).

Coggins

La prueba de AGID es una prueba de unión secundaria en la cual la reacción entre antígeno y anticuerpo va seguida de una segunda reacción, en este caso la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo. La prueba de Coggins o AGID, es un método confiable de difusión en gel que se usa para detectar anticuerpos específicos formados entre 10 y 30 días después de la infección

con el VAIE. Desde 1970, este método de diagnóstico detecta la presencia de anticuerpos contra la proteína p26 del VAIE, la cual es obtenida a partir de cultivos celulares infectados con el VAIE. El uso de estos antígenos altamente purificados elimina las líneas de precipitación no específicas de la prueba (Coggins y cols., 1973).

Para realizar esta prueba se cortan dos pozos de unos 5 mm de diámetro en una capa del agar, con una separación aproximada de 1 cm. Un pozo se llena con antígeno y el otro con el suero del caballo sospechoso; los reactivos se difundirán en forma radial y si se encuentran anticuerpos contra el virus se formará una línea blanca opaca de precipitado (López, 2016).

El desplazamiento de los anticuerpos hacia sus respectivos antígenos en un gel de agar da lugar a la formación de líneas de precipitación. En sueros fuertemente positivos, puede visualizarse líneas de precipitina de identidad como una continuación de la línea entre el suero del control y el pocillo de antígeno central. En los sueros débilmente positivos la línea del suero de control forma una curva, orientada hacia el pocillo de antígeno. Si el suero es negativo, no se forma ninguna línea de precipitina de identidad (Fig. 9) (Brangan y Cols., 2008).



Figura 12 Inmunodifusión en Agar Gel (Gonzales del pino, 2011).

La reglamentación vigente de SAGARPA y SENASICA establece la obligatoriedad de realizar la prueba de AGID a los equinos que se encuentren en alguna de las condiciones que siguen:

- Todos los équidos del país que se movilizan, cualquiera que sea su origen y destino, con excepción de aquellos con destino final a rastro.
- Todos los équidos residentes en lugares de concentración tales como: club's hípicas, caballerizas, centros de descanso, clubes de campo, countries, hipódromos, cuadras, centros de entrenamiento o eventos deportivos tales como, polo, trote, salto, equitación, prueba completa, espectáculos públicos, domas, jineteadas, desfiles tradicionalistas, marchas, paseos, recreación; o cualquier otra actividad o situación en la que convivan o se reúnan equinos de diversos orígenes. La validez de un resultado negativo, es de 60 días contados a partir de la fecha de extracción de la muestra. (López, 2016).

ELISA

La prueba de ELISA es altamente eficiente en cuanto a sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de este virus, se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes marcado con una enzima e inmovilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo (complejo inmune) quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Pare y Simard, 2004).

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- ❖ Anticuerpos marcados o conjugado:
 - ELISA Directo
 - ELISA Indirecto

- ELISA sándwich

- ❖ Heterólogo (HADAS)
 - Antígeno marcado

- ❖ ELISA competitivo

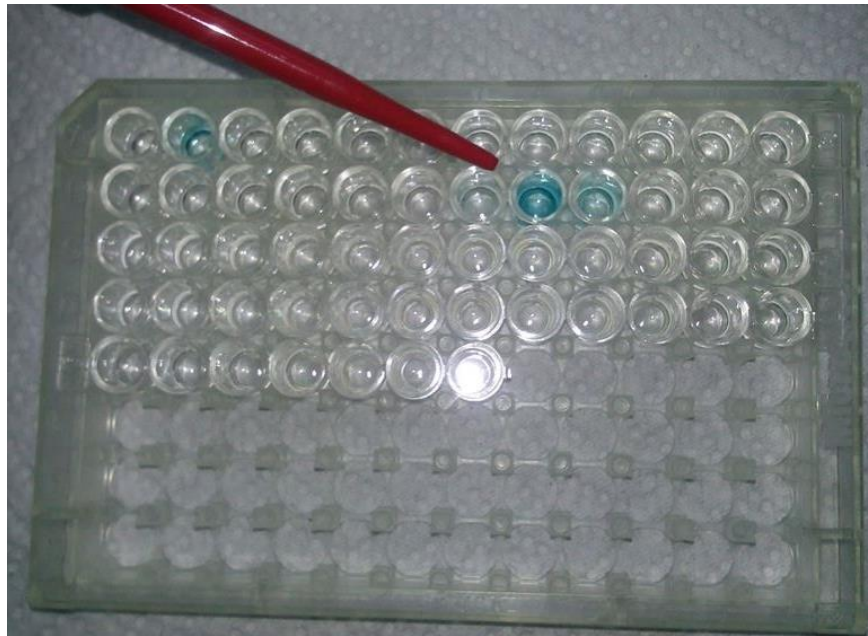


Figura 13.- Prueba de ELISA indirecta para la detección de AIE control positivo (Laboratorio Virología. FESC)

La técnica de ELISA (Fig. 10) se realiza mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas las etapas. Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras y necesitar una elevada repetitividad de resultados (Pare y Simard, 2004).

Justificación

A pesar de que el VAIE causa una enfermedad que se caracteriza por presentar signos clínicos agudos y/o crónicos recurrentes, que pueden incluir fiebre, anemia, edema y caquexia en algunos animales. Muchos caballos presentan signos leves o inaparentes en una primera exposición y son portadores subclínicos del virus, lo que ocasiona que se movilicen caballos infectados que pueden diseminar el virus. Los caballos mexicanos son requeridos para diferentes competencias dentro del país y el extranjero, muchas veces en lugares donde hay una incidencia alta de la enfermedad y la cultura del diagnóstico oportuno no está muy arraigada. Es por esto, que la correcta elección de la prueba diagnóstica asegurará la detección oportuna de animales con infección subclínica.

Diferentes estudios describen prevalencias bajas del VAIE, por lo cual, el uso de técnicas altamente sensibles son necesarias para asegurar la detección de animales infectados y coadyuvar en favorecer las medidas de control y posible erradicación de VAIE.

Hipótesis

Si con la técnica de Coggins es factible identificar equinos seropositivos al VAIE, con una técnica más sensible y específica como el ELISA Indirecto se podrá detectar un mayor número de animales infectados.

Objetivo general:

- Determinar la calidad diagnóstica de tres diferentes pruebas comerciales de uso rutinario para la identificación de anticuerpos contra el VAIE en caballos de diferentes regiones de México.

Objetivos específicos:

- Detectar anticuerpos contra el VAIE en suero de equinos de diferente procedencia geográfica, utilizando tres pruebas serológicas.
- Comparar la sensibilidad y especificidad de dos pruebas de ELISA comerciales que se utilizan en el país para detectar anticuerpos contra el VAIE con respecto a la prueba oficial (Coggins).

Material y método

Localización

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C4. UNAM.

Animales de estudio

La colección de muestras se obtuvo de 141 caballos sin y con signos clínicos del VAIE tales como ictericia, caquexia, sangrados nasales y edema ventral. El muestreo fue de oportunidad y las muestras se colectaron de diferentes lugares de la República Mexicana tales como, Estado de México (112), Hidalgo (17), San Luis potosí (5), Tamaulipas (2) y Yucatán (5).

Colección de muestras

Se procedió a la sujeción del ejemplar, en donde no existían mangas para el manejo de los animales, se tomaron todas las medidas de seguridad correspondientes, con la finalidad de preservar la integridad física del animal y del encargado de realizar el manejo necesario para la obtención de las muestras de sangre requeridas. Para la obtención de la muestra se realizó presión en la tabla del cuello en la vena yugular para lograr su visibilidad y poder facilitar la toma de muestra. Luego con un algodón con alcohol se procedió a realizar la asepsia de la zona de punción, se tomó el equipo vacutainer y se procedió a extraer 8 ml de sangre en tubos sin anticoagulante.

Luego de tomar la muestra correspondiente, se rotularon los tubos y se colocaron en inclinación, en un termo refrigerado con el fin de preservar las muestras a baja temperatura para ser transportados al laboratorio para su

respectivo análisis de acuerdo a lo descrito por López en el primer foro internacional de AIE de México en 2014 (López, 2016).

Procesamiento de las muestras

Posterior a la toma de muestra se procedió a separar el suero con el uso de una centrifuga a 3000 rpm y fueron colocadas en microtubos para ser congelados a -20° C. Fueron descartadas las muestras con presencia de turbidez, hemólisis o indicios visibles de crecimiento bacteriano ya que podían interferir con el rendimiento y la exactitud del análisis. Se analizaron sueros con 5 días máximos de almacenamiento.

Para realizar el análisis se descongelaron las muestras y se procedió a meterlas al homogeneizador para poder integrarlas correctamente, una vez hecho esto se desarrollaron las técnicas serológicas de ELISA y Coggins siguiendo las instrucciones del fabricante (Apéndices 1-3).

Evaluación serológica

ELISA

Las pruebas de ELISA utilizadas fueron ViraCHECK[®] de laboratorio Zoetis[®] (Apéndice 1) y la prueba de ELISA para el Virus de Anemia Infecciosa Equina del laboratorio VMRD (Apéndice 2) ambas basadas en el uso de la proteína p26.

Coggins

La prueba de Coggins que se utilizó fue del laboratorio VMRD y está basada en el uso de la proteína p26 (apéndice 3).

Análisis de resultados

Los resultados fueron comparados entre si valorando la sensibilidad y especificidad con el teorema de Bayes en el programa WinEpi www.winepi.net/menu1.php.

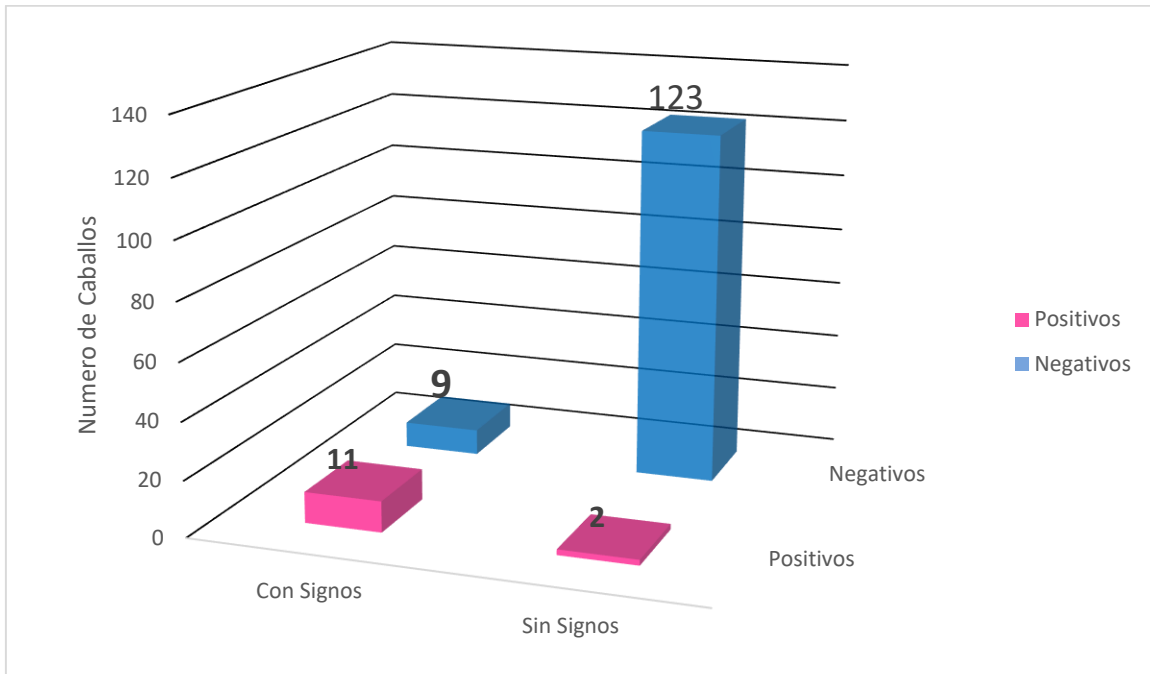
Resultados

Se evaluaron 141 caballos con y sin signos clínicos aparentes, los signos clínicos más frecuentemente encontrados fueron: fiebres intermitentes, anemia, caquexia, ictericia y epistaxis. Los resultados fueron divididos en dos grupos y se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Equinos positivos y negativos a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales clasificados por la presencia o ausencia de signos

Signos clínicos	Número	Positivos		Negativos	
		ViraCHECK®	VMRD®	ViraCHECK®	VMRD®
Con presencia	16	7	7	9	9
Sin signos	125	2	1	123	124

Es importante mencionar que dentro del grupo de los equinos que presentaron signología 3 equinos resultaron positivos en ambas pruebas de igual forma solo un equino del grupo sin signología coincidió en ambas pruebas (apéndice 4). El total de animales positivos en ambas pruebas fue de 13 (Gráfica 1). En la gráfica 1 se puede observar que los caballos que presentaron signos clínicos fueron los que con mayor frecuencia resultaron positivos a la prueba de ELISA.



Gráfica 1.- Resultados positivos (13) y negativos (128) totales de los equinos estudiados, clasificados en grupos con presencia y con ausencia de signos clínicos.

Los resultados obtenidos de la prueba de Coggins fueron negativos, en la figura 11 se puede observar el control positivo.

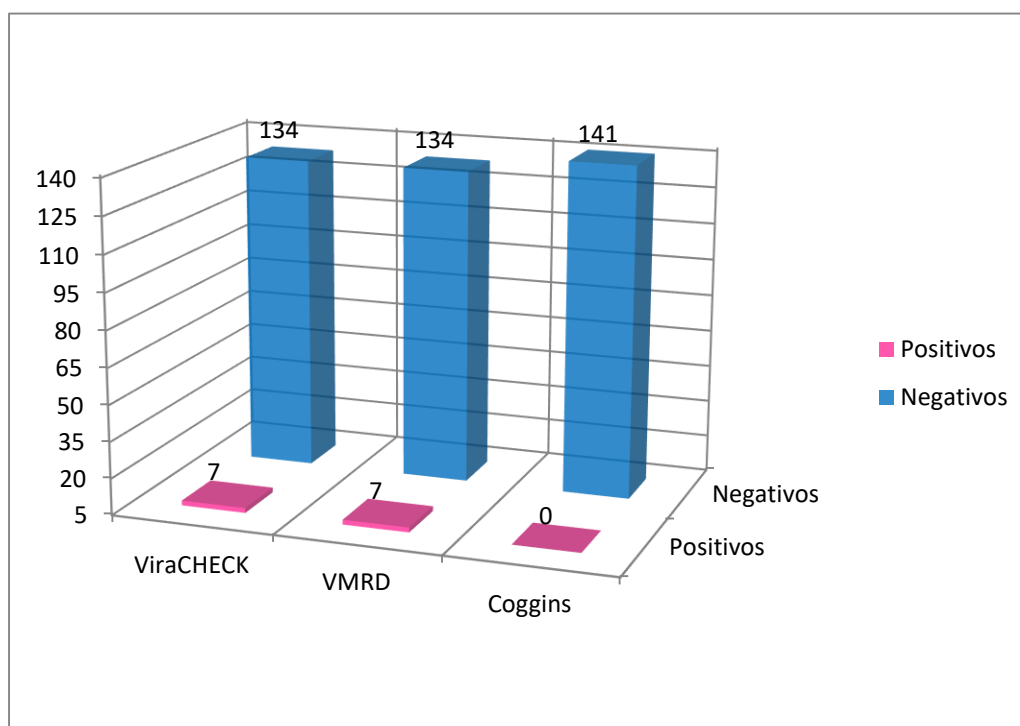


Figura11.- Control positivo de la prueba de Coggins (Laboratorio de Virología. FESC)

Solo se detectaron equinos seropositivos en las pruebas de ELISA comerciales y no así en la prueba de referencia Coggins que indica la OIE (Tabla 3 y Gráfica 2).

Tabla 3.- Resultados obtenidos en la población de equinos evaluada con 3 diferentes pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra el VAIE.

Prueba	Positivos	Negativos
ViraCHECK®	7	134
VMRD	7	134
Coggins	0	141



Gráfica 2.- Resultados obtenidos en la detección de anticuerpos contra VAIE clasificando equinos positivos y negativos en las tres diferentes pruebas serológicas comerciales utilizadas para este estudio

El mayor número de equinos encontrados como seropositivos se ubicaron en el Estado de México (n=10) y en menor proporción en Yucatán (n=2) e Hidalgo (n=1) (Tabla 4).

Tabla 4.- Equinos positivos y negativos a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en las pruebas de ELISA comerciales según la zona geográfica.

Zona geográfica	Nº de equinos	Positivos	Negativos
Estado de México	112	10	102
Hidalgo	17	1	16
Sn Luis Potosí	5	0	5
Yucatán	5	2	3
Tamaulipas	2	0	2

De forma pormenorizada, de los animales seropositivos del Estado de México, la mayor cantidad de ellos provenía de Chapa de Mota y Sayavedra (Tabla 5). Es importante mencionar que en estos sitios la principal función zootécnica de los equinos es el trabajo de campo y cría (n=66), Otras funciones zootécnicas de los equinos en el estudio fueron charrería (n=18), salto (n=9), carrera (n=48) (Tabla 6). Otro aspecto relevante es que la mayoría de los equinos seropositivos fueron animales de raza criolla (Tabla 7).

Tabla 5.- Muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales, clasificados por municipios del Estado de México.

Municipio Edo Mex.	Nº de muestras	Positivos	Negativos
Teoloyucan	10	1	9
Sayavedra	20	3	17
Cuautitlán	19	0	19
Chapa de mota	18	4	14
Naucalpan	15	0	15
Lago de Guadalupe	19	2	17
Villa del carbón	11	0	11

Tabla 6.- Muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales clasificados por fin zootécnico.

Fin zootécnico	Cantidad	Positivos	Negativos
Carreras	48	3	45
Salto	9	1	8
Charrería	18	2	16
Trabajo	66	7	59

Tabla 7.- Muestras positivas y negativas a anticuerpos contra el VAIE a las pruebas de ELISA comerciales clasificados por raza.

Raza	Cantidad	Positivos	Negativos
Criollo	66	7	59
Pura Sangre Ingles (PSI)	50	3	47
Cuarto de Milla	25	3	22

Los resultados de seropositividad del grupo de equinos estudiados no mostraron diferencia sustancial cuando fueron analizadas por sexo (Tabla 8).

Tabla 8.- Muestras positivas y negativas a la presencia de anticuerpos contra el VAIE en pruebas de ELISA comerciales clasificados por sexo.

Sexo	Nº de muestras	Positivos	Negativos
Hembra	61	6	55
Macho	80	7	73

Análisis de resultados

Antes de comenzar con este estudio se propuso utilizar el teorema de Bayes pero al no tener resultados positivos en la prueba de Coggins no se pudo realizar dicha comparativa ya que el resultado no sería significativo ya que existe diferencia entre los kits de ELISA.

Discusión

En equinos infectados con el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), no siempre es posible identificar signos clínicos relacionados a la infección, es por ello, que el uso de herramientas diagnósticas son importantes para la identificación de los mismos (Brangan y cols., 2008). En el presente estudio se compararon tres diferentes pruebas serológicas comerciales para determinar la presencia de anticuerpos contra el VAIE en caballos de diferente origen geográfico, función zootécnica, raza y sexo. Se utilizaron dos tipos de pruebas, una basada en IDGA (Coggins) que es la prueba de referencia (OIE, 2004) y dos técnicas de ELISA de uso rutinario en los laboratorios. Estas pruebas utilizan como antígeno la proteína de cápside (p26) la cual es altamente conservada y permite identificar todos los serotipos descritos hasta ahora (Kong y cols., 2010).

En un trabajo donde se compararon pruebas de ELISA y Coggins ambos trabajando con la proteína p26 se demostró que esta última tiene un porcentaje del 3% de falsos negativos comparado con el 0.6% que presentó el ELISA (Reis y cols., 2012), en el estudio anterior se realizó el ELISA con el antígeno recombinante de la envoltura viral Gp90. En otro estudio realizado donde se involucró la misma proteína viral que en el presente trabajo la p26, se encontró que la presencia de anticuerpos que reconocen esta proteína fueron reconocidos desde el día 0 hasta el día 35 post infección, en dicho trabajo se inoculó el virus en algunos caballos de estudio y se le realizaron pruebas diagnósticas a diario; a diferencia de la presencia de anticuerpos que reconocen la Gp90 en los cuales se identificaron ventanas serológicas de reacciones negativas; esto indica que la proteína de cápside del VAIE estimula la producción de anticuerpos en etapas tempranas y durante un periodo largo de tiempo (Issel y cols., 2013).

En el estudio de Scicluna y cols., (2013) donde realizaron una cinética de anticuerpos encontraron que en algunos caballos después del día 240 reaccionaban negativos en la prueba de Coggins, no obstante, con el uso de pruebas de ELISA los mismos caballos presentaron una reacción positiva desde los primeros días la infección. Otros estudios aseveran que a través de un ELISA se pueden detectar animales infectados en estadios tempranos de la enfermedad (Issel y Cols., 2013; Pare y Simard, 2004; Pisa y cols., 2007). Se ha descrito que el periodo de incubación del virus de la AIE va a depender de la dosis del inóculo y la especie equina afectada, pero se estima que es de entre 21 y 28 días, pudiendo ser mayor si la cepa involucrada posee una menor capacidad de virulencia (Cook y cols., 2013; Issel y Cols., 2013); lo cual explicaría los tiempos amplios para generar anticuerpos que puedan ser detectables. Issel y cols., (2013) reportaron seronegatividad en la técnica de Coggins en el 25% de casos, por lo menos 180 días postinoculación, mientras que a los 35 días post inoculación resultaron positivos por ELISA e inmunoblot. Es posible que los caballos en el presente estudio tuvieran poco tiempo de infectados y por ello la prueba de Coggins no los identificó.

En otro estudio donde se realizó la comparación en la detección de anticuerpos contra el VAIE entre machos y hembras, se encontró una diferencia no significativa en donde los machos tuvieron una mayor incidencia de infección respecto a las hembras (Sarmiento y Quijano, 2005). En el presente trabajo se encontraron resultados parecidos al estudio antes citado entre machos y hembras, aunque la población de estudio se conformó por poblaciones diferentes.

Un hallazgo significativo del presente estudio es que se realizó un análisis entre razas dando como resultado un mayor número de caballos criollos positivos a las pruebas de ELISA, sobre la susceptibilidad entre razas hay pocos estudios, solo algunos trabajos como el de Sarmiento y Quijano,

(2005) han demostrado altos porcentajes de seropositividad hasta el 67% en caballos criollos

En otro estudio realizado en Venezuela (Márquez y cols., 2015) demostraron que es posible identificar 6% más de animales positivos con el kit de ELISA ViraCHECK® que con la prueba de Coggins, corroborando los resultados obtenidos en el presente estudio.

En los estudios comparativos entre el ELISA e IDGA para la detección de anticuerpos contra la AIE, los resultados corroboran que el ELISA es una prueba altamente sensible, aun cuando posean una baja tasa de anticuerpos en fase aguda, o bien en algunos equinos asintomáticos crónicos (Burki y Rossmann, 2002). Esto realza que esta técnica puede ser de gran utilidad en el diagnóstico en fases iniciales de la infección; además facilita el procesar un alto número de muestras, por lo tanto es una prueba ventajosa para realizar el tamizaje en poblaciones numerosas y su interpretación cuenta con mayor precisión que la prueba de Coggins.

Por otro lado, hay estudios que demuestran que el ELISA y Coggins son iguales de eficientes, como el de Matsushita y cols., (2000) donde evaluaron un ELISA en 420 muestras, de las cuales 297 resultaron negativas, 122 positivas y 1 sospechoso con una correlación con la IDGA del 100%, por lo que concluyeron que el ELISA resultó equivalente en cuanto a sensibilidad y especificidad a la prueba oficial IDGA, por lo tanto, sugieren considerar al ELISA como un método adecuado para la detección de la AIE. No obstante, en el presente estudio se pretendió realizar la comparativa entre Coggins y ELISA's, sin embargo se encontró una diferencia substancial entre ambas pruebas, identificando únicamente reacciones positivas en las pruebas de ELISA's.

Debido a la alta especificidad del test de Coggins, el cual se caracteriza por su capacidad para detectar a los animales verdaderamente negativos, éste puede ser de gran utilidad para confirmar aquellos casos que resulten positivos al ELISA. Se ha sugerido comprobar un resultado positivo obtenido mediante ELISA utilizando IDGA debido a que se han detectado algunos resultados falsos positivos mediante las pruebas de ELISA (De la sota, 2005). Contrariamente, Scicluna y cols., (2013) observaron en un trabajo realizado en mulas (*Equus mulus*), que el uso exclusivo de IDGA para el diagnóstico de la enfermedad es muy riesgoso ya que pueden resultar falsos negativos de animales realmente infectados, los cuales resultan positivos por ELISA, además concluyen que el IDGA es de interpretación muy subjetiva ya que es cualitativa y depende de la experiencia del personal de laboratorio.

Issel y cols., (2013) han señalado la necesidad del uso de pruebas serológicas que se apoyen entre sí para el diagnóstico definitivo de la AIE. Proponen un algoritmo diagnóstico que consiste en repetir el ELISA en aquellos casos que resulten positivos, si la seropositividad continúa se debe realizar IDAG, si en esta última resulta positivo se reporta con confianza como tal, de lo contrario si resulta negativo sugieren realizar inmunoblot para emitir el diagnóstico definitivo. Sin embargo, en las explotaciones ganaderas de México probablemente el factor económico sea una limitante, siendo imperante el uso del ELISA que ha demostrado ser una prueba más sensible.

Desde finales de 1980, se han producido una serie de kits (Shane y cols., 1984; Sotulo y cols., 2001) que utilizan formatos de pruebas de ELISA y han recibido una amplia aceptación; sin embargo, el IDAG sigue siendo la prueba serológica de oro para la evaluación de la enfermedad. Basados en el carácter de denuncia obligatoria de la AIE y las consecuencias que implica reportar falsos positivos o negativos, se considera importante evaluar y reeditar constantemente los protocolos y método diagnósticos con el fin de

minimizar los posibles errores teniendo en cuenta el valor económico, sentimental y genético de los animales.

Posiblemente, con la técnica de ELISA se puedan detectar animales positivos antes que los mismos puedan ser detectados por el test de Coggins, esto debido a que esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad ya que se usa antígeno del virus de la AIE purificado y anticuerpos monoclonales frente a la p26 (Pisa y cols., 2007). Debido a las bondades de la prueba de ELISA, las probabilidades de un falso positivo o falso negativo son muy bajas en comparación al IDGA (Pisa y cols., 2007).

Conclusión

- La prueba de Coggins fue menos sensible para la detección de anticuerpos contra el VAIE.
- Las pruebas de ELISA resultaron más confiables para la detección de anticuerpos contra el VAIE.
- Algunos animales que presentaron signos compatibles con la infección del virus de la anemia infecciosa equina resultaron positivos a las pruebas de ELISA.

Bibliografía

1. Burki, F. y Rossmannith, E. ***“Comparative evaluation of the agar gel immunodiffusion test two commercial ELISA kits for the serodiagnosis of equine infectious anemia”***. Zentralbl Veterinarmed. 37(6): 448-458. 2002.
2. Brangan P., Bailey D., Larkin JF, Myers T y More S. ***“Management of the national programme to eradicate equine infectious anaemia from Ireland during 2006: a review”***. Equine Vet J. 702-4. 2008.
3. Cheevers W. y McGuire T. ***“Equine infectious anaemia virus; immunopathogenesis and persistence”***. Rev. Infect. Dis., 7:83-88. 2004.
4. Coggins L. y Kemen M. ***“Inapparent carriers of equine infectious anaemia (EIA) virus. In: Proceedings of the IVth International Conference on Equine Infectious Diseases”***. University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA, 14-22. 1976.
5. Coggins L., Norcross L. y Nusbaum R. ***“Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test”***. Am. J. Vet. Res., 33:11-18. 1972.
6. Cook J., Cook F., Issel J., Montelaro C. ***“Differential responses of Equus caballus and Equus asinus to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus”***. Vet Microbiol. Two: 93-109. 2001.
7. Cook F., Cook J., Li L., Issel J. y Montelaro C. ***“Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV)”***. Virol Methods. 171-179. 2002.
8. Cook R., Issel, J. y Leroux C. ***“Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review”***. Vet Microbiol. 167(1): 81-204. 2013.
9. De la sota, M. ***“Manual de Procedimientos para la detección de anemia infecciosa equina (AIE). Servicio Nacional de Sanidad Animal Calidad Agroalimentaria. Argentina”***. Pp. 36-38. 2005.
10. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) ***“Estadísticas de población equina en México”***

<http://www.fao.org/statistics/es/> Fecha de consulta 15 de Agosto de 2017

11. González del pino J., ***“Anemia Infecciosa Equina (AIE): presentación de cuadro clínico”***
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101011.html> Fecha de consulta 14 de marzo del 2016.
12. Issel C., Scicluna. M., Cook S., Cook R., Caprioli A., Ricci I. Rosone F., Craigo J., Montelaro R. y Autorino G. ***“Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia”***. Vet. Rec. 172:210-220. 2013.
13. Jodi K., Craigo C., Ronald C. y Montelaro R. ***“Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of Equine Infectious Anemia virus infection and inmunity”***. Viruses 5: 2963-2976. 2013. www.mdpi.com/journal/viruses consultado el día 25 de octubre de 2016.
14. Kemen J., y Coggins L. ***“Equine infectious anemia: transmission from infected mares to foals”***. J Am Vet Med Assoc. 5:496-499. 1972.
15. Kong K., Pang H., Sugiura T., Sentsui H., Onodera T., Matsumoto Y. y Akashi H. ***“Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis”***. Microbiol. Immunol. 1:975-980. 2010.
16. Liu Q., Wang F. Ma J., He J. Wang J. y Zhou H. ***“Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Integration in the horse genome, Viruses”*** 7, 3241-3260. 2015.
17. López M., 1er. ***“Foro internacional de anemia infecciosa equina de México en 2014 y plan nacional para control de la anemia infecciosa equina en México”*** (memorias en línea) 2014 www.caballosyopinion.com. Fecha de consulta 20 de noviembre 2016.
18. Márquez Y., Márquez A., Meléndez C., Villarreal V., Salas Y. y Canelón J. ***“Comparación de las técnicas de IDGA y ELISA para el diagnóstico de anemia infecciosa equina en caballos criollos venezolanos”*** SABER-ULA, Universidad de Los Andes - Mérida - Venezuela Revista Científica Vol. XXV - No. 005. 2015

19. Matsushita T., Hesterberg L., Porter J., Smith B. y Newman L. ***“Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody”***. J.Vet. Diagnos. Invest. One: 50-52. 2000.
20. Merck. ***“El manual Merck de veterinaria”***. 5ª ed. Ed. Océano. Barcelona, España. 2455 p. 2000.
21. More J., Aznar I., Myers T., Leadon P. y Clegg A. ***“An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: the modes of transmission and spread in the Kildare cluster”***. Equine Vet J. 709-71. 2008.
22. OIE. 2004. ***“Anemia infecciosa equina (en línea). Manual de la OIE sobre animales terrestres”***. www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/. Fecha de consulta 15 de octubre de 2016.
23. Oseguera D. ***“Los équidos de trabajo en la economía campesina mexicana memorias del XXIV congreso anual AMMVEE Veracruz, 2002”***
24. Pare J. y Simard C. ***“Comparison of commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay and agar gel immunodiffusion test for the serodiagnosis of equine infectious anemia”***. Canad. J. Vet. Res. 68(4): 254-258. 2004.
25. Pisa A., Pereira A., Terreran M., Mozzer O., Tanuri A., Brandao P. y Richtzenhain L. ***“Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in Escherichia coli antigen”***. Prev. Vet. Med. 78(3-4): 239-245. 2007.
26. Prescott M., Harley P. y Klein G.A., ***“Microbiología”*** 3a edición, Madrid, México, Mc GrawHill-Interamericana, 2009.
27. Sarmiento y Quijano ***“prevalencia del virus de la anemia infecciosa equina (AIE) en dos poblaciones de caballos de trabajo de los departamentos del chocó y la guajira”*** Universitas Scientiarum Revista de la Facultad de Ciencias 10; 2:55-60. 2005.

28. Shane S., Issel J. y Montelaro R. ***“Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody”***. J. Clin. Microbiol. 19:51-355. 1984.
29. Scicluna M., Issel C., Cook F., Manna G., Cercine A., Rosone F., Caprioli A., Antonetti V. y Autorino G. ***“Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread equine infectious anemia?”*** Vet. Microbiol. 165:123-134. 2013.
30. Sotulo A., Verwimp V., Riveros M., Pauli R. y Tonarelli G. ***“Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides”***. Vet. Microbiol. 79(2): 11-121. 2001.
31. Stein D. y Mott O. ***“Studies on congenital transmission of equine infectious anemia”***. Vet Med. 37:37-77. 2004.
32. Tashjian J. ***“Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period”***. J Am Vet Med Assoc. 282-288. 2008.
33. Villalobos M. ***“Consideraciones sobre la anemia infecciosa equina en Colombia. El diseño de las estrategias de control apropiadas para nuestra realidad”***. www.corpoica.org.co. Fecha de consulta 18 de octubre de 2016.

Apéndices

Apéndice 1 Manual de proceso de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el Virus de Anemia Infecciosa Equina ViraCHECK®/EIA

Introducción

ViraCHECK®/EIA utiliza un antígeno recombinante altamente purificado para identificar rápidamente anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina (AIE) en equinos infectados sin causar las reacciones no-específicas encontradas comúnmente en las pruebas de ELISA de antígeno cultivado, este método ha sido optimizado para usar muestras de suero.

Almacenamiento

- Almacene los reactivos de la prueba y la solución de lavado diluida no utilizada a 2° - 7° C (36° - 45° F).
- No congele.
- Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad siempre y cuando se almacenen correctamente.

Contenido Neto

- A. Pozos revestidos de antígeno 8 x 12 (96 pozos por empaque).
- B. Frasco A: Antígeno AIE - Conjugado HRP (Tapa azul) 5.0 ml.
- C. Frasco B: Control positivo AIE (Tapa roja) 1.6 ml.
- D. Frasco C: Control negativo AIE (Tapa gris) 1.6 ml.
- E. Frasco D: Cromógeno (tapa verde) 7.5 ml.
- F. Frasco E: Buffer del sustrato (Tapa blanca) 7.5 ml.
- G. Frasco F: Buffer de lavado concentrado, 10x 100ml.
- H. Soporte de micropozos.

Principios de la prueba

ViraCHECK®/EIA es altamente específico, sensible y sencillo de realizar. El kit de diagnóstico contiene un control positivo y un control negativo que deben ser incluidos cada vez que se realiza una prueba. La comparación visual del color de la muestra con el control positivo permitirá la detección exacta de la presencia del anticuerpo contra el VAIE en la muestra. Si se desea, los resultados de la prueba pueden ser determinados usando un lector de placas.

Información de la muestra

Se requieren 50 microlitros de suero. Use solo muestras de equino para ser analizadas. Las muestras deben ser almacenadas a 2 - 7 °C por hasta 7 días. Si requiere almacenamiento más prolongado las muestras deben almacenarse a 20° C. El suero demasiado hemolisado o lipemico puede producir un color de fondo. Si tiene duda, obtenga una muestra de mejor calidad.

Preparación de la solución de lavado

Permita que el buffer de lavado concentrado 10x alcance una temperatura ambiente. Mezcle suavemente por inversión. Diluya el concentrado de lavado 10 veces (1 parte de concentrado por 9 partes de agua destilada) en una botella de lavado.

Procedimiento para realizar la prueba

A. Preparación:

Calcular el número necesario de pozos.

- 1 pozo para control positivo.
- 1 pozo para control negativo.
- 1 pozo para cada muestra.

Nota: Cuando se prueba un número grande de muestras en un ensayo se recomienda incluir un pozo para control positivo y un pozo para control negativo por cada 22 muestras corridas a la vez.

- Remover el número requerido de pozos y colocarlos uno junto a otro en el soporte de pozos.

B. Conjugado:

Agregue una gota del frasco A- Conjugado (Tapa azul) en cada pozo.

C. Adición de la muestra:

- Controles.
- Agregue una gota del frasco B- Control positivo (Tapa roja) en el primer pozo.

- Agregue una gota del frasco C - Control negativo (Tapa gris) en el segundo pozo.
- Usar una punta diferente por cada muestra.
- Espere por 10 minutos.

D. Lavado y secado:

- Elimine el fluido de los pozos en una tarja o un contenedor apropiado.
- Invierta el sujetador y seque firmemente en una toalla de papel para remover las gotas finales.
- Enjuague los pozos vigorosamente.
- Lave los pozos mediante un llenado vigoroso para sobrellenarlos con la dilución de lavado diluida.
- Dirija un chorro enérgico en cada pozo.
- Elimine los excesos de solución de lavado.
- Repita el ciclo de lavado 5 veces.
- Lave los pozos más con agua destilada o desionizada para remover las burbujas.
- Seque los pozos contra una toalla de papel.

E. Desarrollo

- Agregue una gota del frasco D (Tapa verde) a cada pozo.
- Agregue una gota del frasco E (Tapa blanca) a cada pozo.
- Espere por 10 minutos.
- Lea los resultados exactamente a los 10 minutos.

F. Interpretación de los resultados

- El control positivo debe ser distintivamente azul.
- El control negativo debe ser completamente claro.

Apéndice 2 Manual del proceso de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa equina, VMRD.

Descripción general

Este ensayo inmunoenzimático (ELISA) detecta anticuerpos contra el Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) en sueros equinos. Los anticuerpos del EIAV de suero de la muestra se unen al antígeno p26 de VAIE recombinante recubierto en los pocillos de plástico. El anticuerpo no específico se elimina por lavado y el anticuerpo específico de VAIE unido a la placa, captura el conjugado marcado con HRP en algunos sitios de unión a antígenos Fab libres. El conjugado no unido se elimina por lavado y la presencia de conjugado marcado con HRP unido se detecta mediante la adición de un sustrato de la enzima con posterior desarrollo del producto de color azul. La adición de la solución de paro ralentiza la reacción enzimática y cambia el color del producto de azul a amarillo. Un control positivo de corte proporciona una referencia de color para la interpretación de resultados por lectura visual.

La densidad óptica (DO) puede ser leída con un espectrofotómetro de absorbancia de micro placas. El color amarillo o DO igual o mayor que el control positivo indica la presencia de anticuerpos contra VAIE p26 en sueros de muestra.

El color o OD inferior al control positivo indica la ausencia de anticuerpos detectables contra VAIE p26.

Contenido del Kit

- A. Placas revestidas con antígeno.
- B. Control positivo 2 ml.
- C. Control negativo 2 ml.
- D. Conjugado de antígeno-peroxidasa 100X 0,15 ml.
- E. Buffer del conjugado 15 ml.
- F. Solución de lavado 10X concentrado, 60 ml.
- G. Solución de sustrato 15 ml.
- H. Solución de Paro 15 ml.

Materiales requeridos pero no incluidos en el kit de prueba

Pipetas monocanales de volumen ajustable y puntas de plástico desechables, tubos de ensayo o placas de transferencia revestidas sin antígeno, espectrofotómetro de absorción de microplacas de ELISA con filtro de 450 nm, agua desionizada o destilada, toallas de papel, cilindro graduado, temporizador, pipeta multicanal, depósitos, botella de lavado, dispositivo manual de lavado multicanal o lavador automático de placas.

Almacenamiento y estabilidad

Guarde todos los reactivos a 2-7 ° C. No congelar. Los reactivos sin abrir se mantendrán estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan según las instrucciones. No utilice el kit de prueba después de la fecha de caducidad impresa en la caja.

Preparación

- A. Reactivos a temperatura ambiente: Llevar las muestras de suero, reactivos y placa (s) a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) antes de comenzar el ensayo.
- B. Preparar los controles y las muestras: Los controles positivos y negativos se proporcionan listos para usar. Cuando se utilizan placas completas, es mejor poner los controles en pozos en diferentes áreas de la placa. Los controles se deben cargar en cada placa. Las muestras de suero se evalúan sin diluir.
- C. Preparación de las placas: Retire la (s) placa (s) de la (s) bolsa (s) de aluminio (A). Si procede: Devuelva las tiras no utilizadas a la bolsa y séllela bien. Las bolsas adicionales y el sellador están disponibles en VMRD. Coloque las tiras que se utilizarán en el marco y numerar la parte superior de cada tira para mantener la orientación. Siempre marque las tiras en caso de que se desprendan del marco durante el lavado.
- D. Preparar el conjugado: Preparar el antígeno 1X-peroxidasa conjugado mediante la dilución de 1 parte del conjugado de antígeno-peroxidasa 100X (D) con 99 partes de tampón de dilución de conjugado (E). Ejemplo: Para 96 pozos, mezclar 60 μl de conjugado -Peroxidasa 100X (D) con 5.940 ml de tampón de dilución del conjugado (E) para producir 6 ml de Conjugado 1X. Cincuenta micro litros (50 μl) son necesarios por pocillo. El conjugado-peroxidasa diluido (1X) es estable durante dos semanas cuando se almacena a 2-7° C.
- E. Prepare la solución de lavado: Prepare 1X de solución de lavado diluyendo 1 parte del concentrado de solución de lavado 10X (F) con

9 partes de agua desionizada o destilada. Se necesita aproximadamente 1 ml por pocillo. Permita una cantidad adicional para depósitos, pipeteado, etc. La solución de lavado diluida 1X es estable durante dos semanas cuando se almacena a 2-7° C.

Procedimiento de prueba

1. Controles de carga y muestras de suero: Utilizando una pipeta graduada ajustada a 50 µl, adicionar controles y muestras de suero en la placa revestida con antígeno (A). Las muestras de suero y los controles deben ser cargados en la placa recubierta de antígeno (A) tan pronto como sea posible. Cuando se utilicen más de dos tiras, se recomienda que las muestras de suero y los controles se carguen primero en una placa de transferencia y luego se transfieran a la placa revestida con antígeno (A) usando una pipeta multicanal. El volumen de la muestra en la placa de transferencia debe ser superior a 50 µl con el fin de transferir 50 µl de la misma. Toque el lado de la placa de ensayo varias veces para asegurarse de que las muestras cubren el fondo de los pozos. Tenga cuidado de no derramar muestras de pozo a pozo. Incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$).
2. Lavar los pocillos: Después de 10 minutos de incubación lavar la placa una vez: Si se utiliza un lavador automático, coloque la placa en el aparato de lavado y lave la placa 1 vez, llenando los pocillos cada vez con solución de lavado 1x. Si se utiliza el lavador, vaciar el contenido de los pocillos y eliminar los sueros y controles restantes golpeando bruscamente la placa invertida 4 veces en una toalla de papel limpia, golpeando un área limpia cada vez. Llene inmediatamente cada pocillo con solución de lavado 1X usando un dispositivo de llenado multicanal o una botella de lavado. Vaciar la solución de lavado de la placa y golpear la placa invertida bruscamente sobre una toalla de papel limpia como anteriormente se describió.
3. Añadir conjugado -peroxidado: Añadir 50 µl de conjugado -peroxidado diluido (1X) a cada pocillo. Toque el lado de la placa de ensayo varias veces para asegurarse de que el conjugado cubra el fondo de los pozos. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$).
4. Lavar los pocillos: Después de la incubación, lavar la placa 4 veces como en el paso 2.
5. Añadir solución de sustrato: Añadir 50 µl de solución de sustrato (G) a cada pocillo. Toque el lado de la placa de ensayo varias veces para asegurarse de que el sustrato cubra el fondo de los pozos. Incubar

durante 15 minutos a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$). Evite dejar la placa bajo la luz directa del sol. No vacíe los pozos.

6. Añadir solución de paro: Añadir 50 μl de solución de paro (H) a cada pocillo. Cuando se agrega la solución de paro, el color cambiará de azul a amarillo. Toque el lado de la placa de ensayo varias veces para mezclar la solución de sustrato y la solución de paro. No vacíe los pozos.
7. Leer y registrar los resultados de la prueba: Inmediatamente después de añadir la solución de paro, la placa debe observarse visualmente contra el control positivo o debe leerse en un espectrofotómetro de absorbancia de microplacas. Ajuste la longitud de onda de lectura de la densidad óptica (O.D.) a 450 nm. Coloque el instrumento en el aire y lea la (s) placa (s).
8. Devuelva todos los reactivos del kit restantes a $2-7^\circ \text{C}$ para su almacenamiento.

Interpretación de los resultados

Interpretación del lector de microplacas: Las muestras que tienen un D.O. mayor o igual que la D.O. del control positivo son positivos para anticuerpos contra el EIAV p26. Las muestras que tienen una D.O. menor que el control positivo debe ser considerado negativo. Para que la prueba sea válida, la D.O. del control positivo debe ser mayor o igual a 1,5 veces la D.O. del control negativo. El D.O. del control negativo debe ser menor o igual a 0,15.

Interpretación visual: Las muestras con el mismo o mayor color que el control positivo son positivas. Las muestras sin color o color débil menor que el control positivo son negativas. Para que la prueba sea válida, el control positivo debe tener color amarillo visible y el control negativo debe tener un color visible o no visible que sea menor que el control positivo. Los resultados positivos deben ser verificados por AGID. En caso de resultados discrepantes, la muestra debe enviarse a los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios para confirmación.

Apéndice 3 Manual del proceso de la prueba de AGID para la detección de anticuerpos contra el virus de anemia infecciosa equina, VMRD

Descripción general

La prueba de Inmunodifusión (ID) para el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) detecta los anticuerpos precipitantes en sueros de équidos contra la proteína del núcleo del virus EIA recombinante purificado de 26.000 Daltons de peso molecular (p26). Los sueros si son positivos, formarán una línea que se fusiona con líneas de control positivas de referencia o que desvían las líneas de control positivo de referencia hacia adentro cerca del pocillo de muestra sin formación de una línea visible. Los sueros negativos no formarán una línea que se fusione con la línea de control positivo de referencia ni cause desviación de las líneas de control positivas de referencia.

Contenido del kit

- 1 botella de antígeno AEIAV p26, 3,35 ml.
- 1 botella de referencia de control positivo de suero, 10 ml.
- Estos reactivos son suficientes para realizar hasta 200 pruebas.

Materiales requeridos pero no incluidos en el kit de prueba

Bomba de vacío o bomba de filtro accionada por agua, micropipeta, puntas de micropipeta desechables, recipiente de plástico, fuente de luz de haz estrecho de alta intensidad, agar noble, NaOH, ácido bórico, agua destilada o desionizada, placas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro o bandeja de plástico de 45 x 90 mm.

Almacenamiento y estabilidad

No utilice componentes de otros kits. Guarde todos los reactivos a 2-7° C. No congelar. Los reactivos permanecerán estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan según las instrucciones. No utilice el kit de prueba después de la fecha de caducidad impresa en la caja. Utilice equipo limpio para evitar la contaminación de los reactivos.

Preparación de gel de agar

1. Preparar tampón borato mezclando 2 g de NaOH y 9 g de ácido bórico en 1 litro de agua destilada. El pH resultante debe ser de aproximadamente 8,6.
2. Preparar solución al 1% de agar noble en tampón borato.
3. Hervir la solución hasta que se disuelve y luego autoclave a 15 libras de presión, 121° C durante 7 minutos. Alternativamente, utilizar el microondas y disolver la solución de agar / buffer a intervalos de 30 segundos durante aproximadamente 2 minutos o hasta que el agar se disuelva completamente.
4. Enfriar la solución a 45° C y luego transferir 15 ml de solución en una placa de Petri de 100 mm de diámetro o 11 ml en bandejas de 45 x 90 mm. El agar debe tener un espesor de 2,8 mm.
5. Deje que el agar se enfríe en un ambiente relativamente libre de polvo. Retire las tapas durante el enfriamiento para permitir el escape del vapor de agua. Para obtener los mejores resultados, recomendamos que las placas recién vertidas se almacenen durante la noche a 2-7° C antes de su uso. Las placas o bandejas de agar sin cortar se pueden almacenar invertidas a 2-7° C en bolsas con cremallera por hasta una semana. Compruebe el agar almacenado antes de usarlo para asegurarse de que no esté ni desecado ni cubierto con humedad.

Corte de pocillos en el gel de agar

Un modelo de siete pozos se utiliza con un pozo central y seis pozos en un círculo alrededor de él. Los pocillos tienen 2,4 mm de separación y 5,3 mm de diámetro. El agar se corta después de que se haya endurecido lo suficiente para que los bordes cortados de los pocillos no se rompan cuando se retiran los tapones de agar. El tapón de agar se succiona de los pocillos usando una cánula de metal o de vidrio atraída a una pequeña abertura (1-2 mm de diámetro), conectada a una línea de vacío. Se debe tener cuidado para evitar separar el agar de la placa. Si se observa humedad en los pocillos antes de la introducción de reactivos o muestras, se debe eliminar por succión o dejar que se evapore. Las placas deben ser utilizadas el mismo día en que se cortan.

Requisitos de la muestra

La muestra a evaluar debe ser suero. El suero debe separarse del coágulo lo antes posible y almacenarse a 2-7° C, o almacenarse congelado hasta la prueba. Sin embargo, el suero puede almacenarse a 2-7° C hasta 28 días hasta la prueba. El suero separado puede congelarse indefinidamente hasta la prueba. El suero hemolizado puede manchar el agar, pero no se ha demostrado que afecte el resultado de la prueba. Sin embargo, no se recomienda el análisis de muestras gravemente hemolizadas o contaminadas.

Pozos de llenado e incubación de placas de agar

El antígeno (A) se coloca en el pocillo central con una micropipeta ajustando la cantidad a 50 µl. Se colocan cincuenta microlitros de suero control positivo de referencia (R) en pozos a cada lado de la muestra o muestras a ensayar (Figura 1). Esta disposición proporciona una línea de control positivo

en cada lado del suero de ensayo, facilitando así la determinación exacta de las líneas de identidad. Se pueden evaluar total de tres muestras en cada patrón, utilizando de nuevo 50 µl para cada pozo. Los pozos se llenan al nivel de la superficie del agar, sin dejar menisco. El suero o antígeno no debe correr sobre el agar. Deje que las placas se ajusten unos minutos antes de moverse para reducir la posibilidad de derrames. Las placas se incuban a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) en una cámara húmeda cerrada. Si la temperatura ambiente es superior a 25°C o por debajo de 20°C , se debe utilizar una incubadora de 22°C .

Validación de la prueba

Para que una prueba sea válida las líneas de referencia (entre los pozos positivos de referencia y el pozo del antígeno EIAV central) deben visualizarse fácilmente. Estas líneas deben ser claramente visibles justo al borde de los pozos negativos de la muestra. Si no, el ensayo no puede ser interpretado con precisión.

Interpretación de los resultados

Un intenso haz de luz, ajustable para diferentes intensidades y posiciones, debe utilizarse para proporcionar iluminación para la lectura. La reacción debe observarse contra un fondo negro. Una lente de aumento es útil en algunos casos. Se requiere un mínimo de 24 horas para que tenga lugar una reacción de Inmunodifusión completa. Si la reacción se completa después de 24 horas de incubación, se puede informar el resultado. La reacción se completa cuando las líneas de control positivo entran en el pozo que contiene una muestra negativa o cuando se forma una línea específica distinta de identidad entre la muestra y los sueros de control positivos. Algunas muestras positivas débiles requieren 48 horas antes de que la reacción se complete. Estos deben ser re-probados antes de que los

resultados sean reportados. El tipo de reacción variará con la concentración de anticuerpo en la muestra que se está evaluando. La línea de referencia del suero control positivo es la base para leer la prueba. Si no es una línea distinta, entonces la prueba no es válida y debe repetirse.

Se observan los siguientes tipos de reacciones:

Negativo: Las líneas de control positivo de referencia continúan en el pozo de la muestra del ensayo sin doblarse o con una ligera curvatura en el pozo del antígeno (A) y hacia el suero de control positivo (Figura 2, S1, muestra negativa).

Positivo: Las líneas de control se unen y forman una línea continua con la línea entre el suero de prueba (S2) y el antígeno (A) (Figura 2).

Positivo débil: Las líneas de control positivas de referencia se curvan ligeramente hacia el pozo del antígeno (A) y lejos de los pozos de referencia (R) del control positivo de referencia, pero no forman una línea completa entre el antígeno (A) y el suero de prueba (S3). Estas reacciones requieren una observación cuidadosa y pueden pasarse fácilmente por alto. Todas las muestras positivas débiles deben ser re-ensayadas antes de reportar los resultados.

Se han observado reacciones débiles de Inmunodifusión en tres tipos de casos:

A) Los potros que son infectados por yeguas infectadas tienen reacciones débiles a muy intensas que pueden persistir hasta 5 meses de edad debido a la presencia de anticuerpos calostrales. Si la yegua y el potro son ambos positivos, el potro debe ser re-probado a los 6 meses de edad para

determinar si se convierte en negativo. Si una yegua es negativa, su potro positivo debe ser considerado infectado.

B) Se han observado positivos débiles durante el período de incubación del VAIE. Si se obtiene una segunda muestra de dos a tres semanas más tarde, la reacción debe ser más fuerte.

C) Los portadores inaparentes que no tienen signos clínicos de la AIE durante largos períodos de tiempo pueden tener reacciones débiles en la prueba. En estos casos, el reexamen rara vez da lugar a un cambio en la fuerza de la reacción.

Positivo intenso: Las líneas de control positivas de referencia se dirigen hacia el antígeno mucho antes de que lleguen al pozo que contiene el suero de prueba (S1) y existe una línea ancha y nebulosa entre el suero de prueba (S1) y el antígeno (A). Esta línea se sitúa muy cerca del pozo del antígeno (A), especialmente si se observa la placa a las 24 horas.

Líneas no específicas: Estas líneas se observan entre el antígeno y el pozo del suero de prueba. Sin embargo, las líneas de control positivas de referencia pasarán a través de la línea no específica y continuarán en el pozo de suero de prueba de sueros negativos (no mostrados). La línea no específica no forma una línea continua con las líneas de control positivas de referencia. Las líneas de referencia positivas de referencia formarán ángulos más agudos con una línea no específica que con una línea de identidad específica del VAIE. Las líneas no específicas se forman mediante reacciones de muestra-anticuerpo con antígenos distintos al del VAIE p26. Un suero de muestra puede producir una línea contra el VAIE específica, así como una línea no específica (Figura 3, S2). Se debe tener cuidado de asegurarse de que una reacción específica no se vea obscurecida por una línea que no sea contra el VAIE. El reexamen de dichas muestras y la observación de las

reacciones a intervalos frecuentes pueden facilitar la determinación si las muestras son positivas o negativas.

Halos opacos alrededor del pozo: Ocasionalmente, se formará un halo opaco, debido a lípidos u otro material en el suero, alrededor del pozo del suero de prueba que puede oscurecer las líneas de control positivo de referencia cerca del pozo de la muestra (Figura 3, S3). Si se lee la prueba a las 24 y 48 horas, a veces los resultados pueden determinarse antes de que el halo oscurezca la reacción. Sin embargo, en algunos casos no se puede hacer una determinación y se debe solicitar otra muestra.

Todos los positivos deben ser confirmados por una nueva prueba antes de reportar los resultados. Además, las muestras que producen reacciones cuestionables deben volver a examinarse por duplicado antes de informar de los resultados.

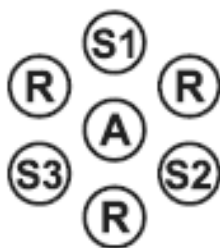


Figure 1.

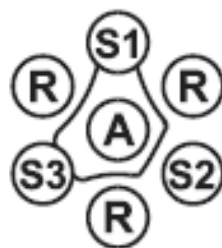


Figure 2.



Figure 3.

Los caballos infectados con el VAIE se aceptan generalmente como portadores de virus durante toda la vida. Los caballos infectados pueden no mostrar signos clínicos durante meses o años, pero todavía tienen virus infecciosos en la sangre. Por lo tanto, cualquier caballo adulto que sea positivo en la prueba de IDGA debe ser considerado como infectado.

Precauciones

Los componentes del kit deben ser manipulados y eliminados como potencialmente peligrosos. No coma, beba, ni fume donde se manipulen las

muestras de suero y los reactivos del kit. No pipetear con la boca. Algunos reactivos pueden ser dañinos si se ingieren. Si se ingiere, busque atención médica. No utilice reactivos caducos o contaminados, o reactivos de otros kits o lotes. No mezcle reactivos de diferentes lotes de este mismo producto.

El componente A, antígeno del VAIE p26, contiene azida sódica como conservante.

El componente R, suero control positivo de referencia, contiene azida de sodio como un preservativo.

Apéndice 4. Datos de la población de estudio y resultados de los estudios serológicos

Nº	Sexo	Edad	Especie	Raza	Lugar de origen	Fin Zoo	Signos	ViraCHECK	Coggins	VMRD
1	M	2 años	Equina	PSI	Kentucky	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
2	H	2 años	Equina	PSI	Kentucky	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
3	H	2 años	Equina	PSI	Kentucky	Car	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
4	H	2 años	Equina	PSI	Kentucky	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
5	H	5 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
6	H	3 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
7	M	2 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
8	M	2 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Presencia	Negativo	Negativo	Positivo
9	M	2 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
10	H	3 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
11	H	5 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
12	H	2 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
13	H	3 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
14	M	2 años	Equina	CM	Teoloyucan	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
15	M	3 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
16	H	2 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
17	M	2 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
18	M	2 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
19	M	2 años	Equina	CM	Houston	Car	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
20	M	2 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
21	M	6 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
22	H	4 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
23	M	3 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
24	M	4 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
25	M	3 años	Equina	CM	Sayavedra	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
26	H	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
27	H	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
28	H	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Car	Presencia	Negativo	Negativo	Positivo
29	H	2 años	Equina	PSI	Sn Luis Potosí	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
30	M	2 años	Equina	PSI	Sn Luis Potosí	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
31	H	2 años	Equina	CM	Sn Luis Potosí	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
32	H	3 años	Equina	CM	Sn Luis Potosí	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
33	M	2 años	Equina	CM	Sn Luis Potosí	Cha	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
34	M	2 años	Equina	CM	Yucatán	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
35	M	3 años	Equina	CM	Yucatán	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
36	H	3 años	Equina	CM	Yucatán	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
37	M	3 años	Equina	PSI	Yucatán	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo

38	M	3 años	Equina	CM	Yucatán	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
39	H	3 años	Equina	CM	Houston	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
40	M	3 años	Equina	PSI	Sayavedra	Car	Presencia	Positivo	Negativo	Positivo
41	M	5 años	Equina	CM	Houston	Cha	Presencia	Positivo	Negativo	Positivo
42	M	3 años	Equina	CM	Houston	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
43	M	4 años	Equina	PSI	Sayavedra	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
44	H	5 años	Equina	PSI	Houston	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
45	H	5 años	Equina	CM	Houston	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
46	H	5 años	Equina	CM	Houston	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
47	M	6 años	Equina	PSI	Oklahoma	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
48	M	3 años	Equina	PSI	Tamaulipas	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
49	H	3 años	Equina	PSI	Tamaulipas	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
50	H	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
51	M	3 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
52	M	3 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
53	M	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
54	M	5 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
55	H	3 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
56	M	4 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
57	H	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Sal	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
58	M	2 años	Equina	PSI	Sayavedra	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
59	M	2 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
60	M	14 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
61	H	15 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
62	M	10 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
63	M	10 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
64	M	10 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
65	M	5 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
66	H	7 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
67	H	2 años	Equina	CM	Hidalgo	Cha	Presencia	Negativo	Negativo	Positivo
68	M	4 años	Equina	CM	Hidalgo	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
69	M	12 años	Equina	CM	Hidalgo	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
70	M	9 años	Equina	CM	Hidalgo	Cha	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
71	M	10 años	Equina	CM	Hidalgo	Cha	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
72	H	6 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
73	M	2 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo

74	H	10 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
75	H	3 años	Equina	CM	Hidalgo	Car	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
76	H	2 años	Equina	C	Villa del carbón	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
77	H	5 años	Equina	C	Villa del carbón	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
78	H	2 años	Equina	C	Villa del carbón	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
79	M	7 años	Equina	C	Villa del carbón	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
80	M	4 años	Equina	C	Villa del carbón	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
81	M	15 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
82	M	8 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
83	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
84	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
85	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
86	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
87	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
88	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
89	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
90	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
91	M	10 años	Equina	C	Naucalpan	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
92	M	6 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
93	M	8 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
94	M	11 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
95	M	8 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
96	M	6 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
97	H	20 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Positivo	Negativo	Negativo
98	H	6 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
99	M	4 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
100	H	6 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Presencia	Positivo	Negativo	Negativo
101	H	8 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
102	M	10 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Presencia	Positivo	Negativo	Negativo
103	M	9 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
104	M	8 años	Equina	C	Chapa de Mota	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo

105	H	28 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
106	H	29 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
107	H	1 año	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
108	M	28 años	Equina	C	FESC	Tra	Presencia	Negativo	Negativo	Negativo
109	M	28 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
110	M	5 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
111	M	5 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
112	H	8 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
113	M	15 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
114	H	5 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
115	M	5 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
116	M	2 años	Mulo	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
117	H	14 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
118	H	12 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
119	M	6 años	Burro	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
120	H	29 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
121	H	7 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
122	H	12 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
123	H	13 años	Equina	C	FESC	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
124	H	7 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
125	H	13 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
126	H	12 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
127	M	5 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
128	M	2 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
129	M	3 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
130	H	4 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Positivo	Negativo	Positivo
131	H	2 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
132	M	2 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
133	M	11 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
134	M	15 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo

135	M	10 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
136	H	12 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
137	H	18 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
138	H	6 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
139	H	8 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Presencia	Positivo	Negativo	Positivo
140	H	1 año	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo
141	H	2 años	Equino	C	Lago de Gpe	Tra	Sin Signos	Negativo	Negativo	Negativo

Notas: Sexo: M=Macho

H= Hembra

Raza: C=Criollo

PSI=Pura Sangre Inglés

CM=Cuarto de Milla

Fin zootécnico: Cha= Charrería

Tra= Trabajo

Sal= Salto

Car= Carreras