

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

RESUMEN

La anemia infecciosa equina (AIE) es una infección vírica crónica de los équidos. El agente causal, el virus de la AIE (VAIE), es un lentivirus de la familia Retroviridae, subfamilia Orthoretrovirinae. Otros miembros del género lentivirus son: el virus de la inmunodeficiencia bovina; el virus de la artritis y encefalitis caprina; el virus de la inmunodeficiencia felina; el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2; el virus de la inmunodeficiencia del simio y el virus maedi/visna. Aunque la AIE se puede sospechar teniendo en cuenta los signos clínicos y las lesiones anatomopatológicas, la confirmación de la infección requiere de serología y de métodos moleculares. Los caballos infectados seguirán siendo portadores del virus de por vida y, salvo raras excepciones darán un resultado positivo en una prueba serológica. Aunque los niveles de anticuerpos fluctúan, la infección por el virus de la AIE genera una respuesta de anticuerpos persistente. Todos los équidos de más de 12 meses que dan un resultado positivo en la serología se identifican como portadores del virus. En el caso de los équidos de menos de 12 meses, las reacciones serológicas positivas se pueden deber a la presencia de anticuerpos maternos; por lo tanto, es posible que para determinar si un animal tiene AIE sea indispensable recurrir a técnicas moleculares. Como reservorios del virus, los équidos infectados implican un riesgo de transmisión a otros équidos. El virus se transmite principalmente por la sangre. En la naturaleza, las moscas picadoras son vectores mecánicos del virus, pero la infección a menudo se propaga de forma iatrogénica.

Identificación del agente: *Se puede aislar el virus inoculando sangre sospechosa a un caballo susceptible o a los cultivos de leucocitos preparados a partir de caballos susceptibles. El reconocimiento de la infección en caballos que han sido expuestos experimentalmente se puede llevar a cabo en base a los signos, a una reacción serológica positiva y/o a la detección del virus mediante técnicas moleculares. El aislamiento eficaz del virus en los cultivos de leucocitos de los caballos se confirma mediante la detección del antígeno específico contra la AIE por la prueba de inmunofluorescencia, por técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, o por la inoculación de líquidos de cultivo en caballos susceptibles. Raramente se intenta el aislamiento del virus debido a su duración, su dificultad y los gastos que conlleva.*

Pruebas serológicas: *Las pruebas de inmunodifusión en gel agar (AGID) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) son pruebas serológicas simples y fiables para demostrar la infección por el VAIE. La AGID debe utilizarse para confirmar los resultados positivos en el ELISA. Los niveles de anticuerpos son muy variables, y fluctúan debido a la naturaleza cambiante del virus. Los antígenos para la AIE se pueden preparar a partir de cultivos de tejido infectados mediante la utilización de la tecnología del ADN recombinante. Existen a la venta varios kits comerciales de pruebas autorizadas y validadas.*

Requisitos para las vacunas: *Entre 1975 y 1990, en China (Rep. Pop. de) se utilizó mucho una vacuna viva atenuada que se desarrolló a principios de los años 1970. Se han intentado otros muchos métodos desde entonces, con varios resultados. Desde entonces, la estrategia para el control de la AIE ha pasado de la vacunación a la cuarentena, para evitar que los anticuerpos contra la vacuna interfieran con las pruebas de diagnóstico. Actualmente, no se dispone de vacunas.*

A. INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa equina (AIE) se presenta en todo el mundo. La infección, conocida al principio como fiebre de los pantanos, se limita a los équidos. Muchos casos permanecen subclínicos. La enfermedad se caracteriza por episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y edema de las partes bajas del cuerpo; si no se produce la muerte en el curso de los ataques clínicos agudos, se produce una fase crónica y la enfermedad tiende a convertirse en latente. Normalmente, el período de incubación es de entre 1 y 3 semanas, pero puede prolongarse hasta 3 meses. En casos agudos, los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado se agrandan y se vuelven hiperémicos. Desde el punto de vista histológico, estos órganos están infiltrados con poblaciones de leucocitos inmaduros y de células plasmáticas. Las células de Kupffer, del hígado, generalmente contienen hemosiderina o eritrocitos. Se puede detectar la hipertrofia del bazo mediante un examen rectal. Los distintos tipos de diagnóstico incluyen la arteritis vírica equina (capítulo 3.6.10), *Anaplasma phagocytophilum* y otras causas de edema, fiebre, anemia, o trombocitopenia/equimosis.

El virus de la AIE (VAIE) pertenece al género *Lentivirus*, de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*. Otros miembros del género son el virus de la inmunodeficiencia bovina, el virus de la artritis y la encefalitis caprina, el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2, el virus de la inmunodeficiencia del simio y el virus de maedi/visna.

Cuando el virus de la AIE (VAIE) infecta a un caballo, su sangre permanece infectada durante el resto de su vida y el caballo puede transmitir la enfermedad a otros caballos (Cheevers & McGuire, 1985). La transmisión se realiza por transfusión de sangre o secreción contaminada de un caballo infectado. En la naturaleza, es más probable que la propagación del virus se lleve a cabo por la interrupción de la alimentación de los tábanos (*Tabanidae*) que se alimentan de sangre de los caballos clínicamente enfermos y luego de caballos sanos susceptibles. La transmisión puede ocurrir también por la transfusión iatrogénica de sangre o productos de la sangre con agujas, jeringas, equipos de administración intravenosa o demás equipo contaminado. Puede ocurrir una infección *in utero* de un feto (Kemen & Coggins, 1972). El título del virus es más alto en caballos con signos clínicos y el riesgo de transmisión es más elevado desde estos animales que desde animales portadores con un título de virus inferior. No obstante, los estudios realizados en mulas indican que los animales infectados con resultados positivos en el enzimoimmunoanálisis (ELISA) y con resultados indeterminados en la prueba de la inmunodifusión en gel de agar (AGID) pueden tener cargas víricas de un mismo nivel que los animales con respuestas fuertes de anticuerpos y que, por lo tanto, constituyen una fuente de transmisión igual de probable (Sciicluna *et al.*, 2013).

El VAIE no se considera un riesgo para la salud humana. Las manipulaciones que se realicen en el laboratorio deberán llevarse a cabo al nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se determinará mediante un análisis del riesgo biológico (véase el capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Las AGID (Coggins *et al.*, 1972) y los ELISA (Suzuki *et al.*, 1982) son pruebas precisas y fiables para la detección de la AIE en los caballos, excepto para los animales que están en las primeras etapas de la infección y para los potros de las madres infectadas (McConnico *et al.*, 2000; USDA 2007). En otras circunstancias poco frecuentes, pueden obtenerse resultados equívocos cuando la cantidad de virus que circulan en la sangre durante un episodio agudo de la enfermedad es suficiente para unir el anticuerpo disponible, y si la cantidad inicial de anticuerpos nunca aumenta lo suficiente para que estos sean detectables (Toma, 1980). Aunque con el ELISA se detectan los anticuerpos en concentraciones bajas antes que con la prueba AGID, esta se utiliza para confirmar los ELISA positivos. Esto es debido a los falsos positivos que se han detectado con el ELISA. La prueba AGID es específica y, por lo tanto, tiene la ventaja de distinguir entre las reacciones de los anticuerpos con antígeno de la AIE y las producidas con antígeno diferente al de la AIE. Las discrepancias entre métodos o pruebas con resultados cuestionables se pueden evaluar en mayor profundidad empleando inmunoelctrotransferencia (Issel *et al.*, 1999; 2013; Rusvai *et al.*, 2009).

Tabla 1. Métodos disponibles para el diagnóstico de la anemia infecciosa equina y su propósito.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
PCR	–	+/-	–	+/-	–	n/a
Aislamiento del virus	–	–	–	+	–	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	++	++	++	++	++	n/a
ELISA	++	++	++	+	+	n/a
Inmnoelectro transferencia	–	++	++	++	–	n/a

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; +/- = cuestionable, puede no funcionar en todas las situaciones; n/a = no aplicable.
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; AGID = inmunodifusión en gel de agar;
 ELISA = enzimoimmunoanálisis

1. Identificación del agente patógeno

1.1. Aislamiento e identificación del virus

Generalmente, no es necesario el aislamiento del virus para realizar un diagnóstico.

Se puede aislar el virus en caballos sospechosos inoculando su sangre en cultivos de leucocitos preparados a partir de caballos no infectados. La producción de virus en los cultivos puede confirmarse detectando el antígeno específico contra la AIE por medio de un ELISA (Shane *et al.*, 1984), por la prueba de la inmunofluorescencia (Weiland *et al.*, 1982), o mediante pruebas moleculares. Apenas se intenta el aislamiento del virus debido a la dificultad para obtener cultivos de leucocitos de caballos.

1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Se ha descrito la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) para detectar el ADN provírico de la AIE en la sangre periférica de los caballos (Nagarajan & Simard, 2001). El método de la PCR anidada está basado en las secuencias de cebadores en la región correspondiente al gen *gag* del genoma provírico. Ha resultado ser una técnica sensible para detectar cepas naturales del VAIE en leucocitos de sangre de caballos infectados por la AIE; lo normal es que el límite inferior de detección se sitúe en torno a 10 copias genómicas del ADN diana (Nagarajan & Simard, 2001; 2007). También se ha descrito la PCR con transcriptasa inversa en tiempo real (Cook *et al.*, 2002). Para confirmar los resultados de esas pruebas tan sensibles se recomienda procesar duplicados de las muestras de cada espécimen de diagnóstico. Es importante utilizar procedimientos adecuados para prevenir el riesgo de contaminación cruzada (véase el Capítulo 1.1.5 *Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias* y el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación par las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*). Es importante destacar que la falta de coincidencia entre el cebador y el virus circulante, posiblemente como consecuencia de la alta tasa de mutación del virus, puede dar

1 A combination of agent identification methods applied on the same clinical sample is recommended.

lugar a un fracaso de la PCR a la hora de detectar el virus (Cappelli *et al.*, 2011; Quinlivan *et al.*, 2007).

A continuación se indican algunas de las circunstancias propicias para la utilización de la prueba PCR para la detección del VAIE en caballos:

- i) Resultados de las pruebas serológicas contradictorios;
- ii) Sospecha de una infección pero con resultados serológicos negativos o dudosos;
- iii) Pruebas que complementen el uso de la serología para la confirmación de los resultados positivos;
- iv) Confirmación de la infección precoz, antes del desarrollo de anticuerpos séricos frente al VAIE;
- v) Garantía de que los caballos utilizados para la producción de antiseros o vacunas o como donantes de sangre no están infectados por el VAIE;
- vi) Confirmación del estatus de un potro nacido de una yegua infectada.

2. Pruebas serológicas

Debido a la persistencia del virus de la AIE en los équidos infectados, la detección serológica de anticuerpos frente al VAIE sirve para confirmar el diagnóstico de la infección por dicho virus.

2.1. Prueba de inmunodifusión en gel de agar

La AGID detecta anticuerpos precipitantes producidos como respuesta al VAIE. Las reacciones específicas vienen indicadas por las líneas de precipitina entre el antígeno de la AIE y el suero problema, y se confirman por ser idénticas a la reacción que se da entre el antígeno y el suero estándar positivo.

Están disponibles comercialmente reactivos para la IGDA de diversas compañías. Alternativamente, el antígeno para la IGDA y el suero de referencia se pueden preparar como se describe a continuación.

2.1.1. Preparación del antígeno

El antígeno de la AIE puede prepararse a partir del hígado de caballos con la enfermedad en fase aguda (Coggins *et al.*, 1973), del cultivo de tejidos de caballos infectados (Malmquist *et al.*, 1973), de una línea celular de timo canino con infección permanente (Bouillant *et al.*, 1986) o de proteínas recombinantes expresadas en bacterias o en baculovirus utilizando la técnica del ADN recombinante (Archambault *et al.*, 1989; Kong *et al.*, 1997). La preparación del antígeno a partir de cultivos infectados o mediante la técnica de ADN recombinante, proporciona un resultado más uniforme que utilizando las células del bazo, y permite una mejor estandarización de los reactivos.

Para obtener un antígeno satisfactorio a partir del bazo, debe infectarse un caballo con una cepa muy virulenta del virus de la AIE. El período de incubación resultante debería durar entre 5 y 7 días, y el bazo debe recogerse 9 días después de la inoculación, cuando más alto es el título del virus y antes de que se produzca cualquier cantidad de anticuerpos precipitantes. La pulpa del bazo, sin diluir, se utiliza como antígeno en la prueba de inmunodifusión (Coggins *et al.*, 1973). La extracción del antígeno del bazo con una solución salina y una concentración con sulfato amónico no proporciona un antígeno tan satisfactorio como una selección de bazos con un título alto del antígeno de la AIE.

Alternativamente, se infectan células de riñón fetal equino, células dérmicas o células del timo canino con una cepa del virus de la AIE adaptado para crecer en un cultivo de tejido (*American Type Culture Collection* o cepa china adaptada a células dérmicas de feto equino). El virus se recoge de los cultivos mediante la precipitación con polietilenglicol al 8%, o mediante la precipitación por ultracentrifugación. El antígeno de diagnóstico, p26, se separa del virus mediante tratamiento con detergente o con éter (Malmquist *et al.*, 1973). Las proteínas del núcleo del virus de la AIE, expresadas en bacterias o baculovirus, están disponibles comercialmente y se utilizan como antígenos de alta calidad para el diagnóstico serológico.

La p26 es una proteína estructural interna del virus que está codificada por el gen *gag*. La proteína p26 es antigénicamente más estable en cepas del VAIE que las glicoproteínas de virión gp45 y gp 90 (Montelaro *et al.*, 1984). Existen pruebas de una variación menor de las

cepas en la secuencia de aminoácidos de la p26; sin embargo no hay pruebas de que esa variación influya en ninguna de las pruebas serológicas de diagnóstico (Zhang *et al.*, 1999)

2.1.2. Preparación del antisuero estándar

Se debe recoger un antisuero positivo conocido procedente de un caballo previamente infectado con el virus de la AIE. Este suero debe producir una única línea de precipitación densa, que es específica para la AIE, tal como se ha demostrado mediante una reacción de identidad en comparación con un suero estándar conocido. Es esencial equilibrar las concentraciones de antígeno y de anticuerpos, con el fin de garantizar la sensibilidad óptima de la prueba. Las concentraciones del reactivo deben ajustarse para formar una línea de precipitación estrecha aproximadamente equidistante de los dos pocillos que contienen el antígeno y el suero.

2.1.3. Procedimiento analítico (Association Française de Normalisation [AFNOR], 2000; Coggins *et al.*, 1973; Pearson & Coggins, 1979)

- i) Las reacciones de inmunodifusión se llevan a cabo en una capa de agar en placas de Petri de plástico, puesto que las placas de vidrio pueden dar lugar a fracasos en la prueba. Para placas de Petri de 100 mm de diámetro, se utilizan 15–17 ml de agar Noble al 1% en tampón borato (9 g de H_3BO_3 , más 2 g de NaOH por litro) 0,145 M, pH 8,6 (\pm 0,2). Se utiliza un punzón de metal para crear varias “rosetas”, cada cual de seis pocillos en torno a un pocillo central del mismo diámetro. Los pocillos serán de 5,3 mm de diámetro y se dejará una separación de 2,4 mm entre ellos. Cada pocillo debe contener el mismo volumen de reactivo y deben llenarse por completo, pero sin que se produzca derrame.
- ii) Se coloca el antígeno en el pocillo central y el antisuero estándar en uno de cada dos pocillos exteriores. Las muestras del suero problema se colocan en los tres pocillos restantes.
- iii) Se mantienen las placas a temperatura ambiente en un ambiente húmedo (se recomiendan 18–26°C).
- iv) Transcurridas 24–28 horas, se examinan las reacciones de precipitación con un haz estrecho de luz oblicua e intensa frente a un fondo negro. Las líneas de referencia deben ser claramente visibles a las 24 horas y, en ese momento, cualquier suero problema que sea fuertemente positivo también puede haber formado líneas idénticas a las que se dan entre los reactivos estándar. Una reacción positiva débil puede tardar 48 horas en formarse, y se indica mediante una pequeña inclinación de la línea de precipitación del suero entre el pocillo del antígeno y el pocillo del suero problema. En el caso de la AGID para la AIE, la curva causada por una reacción débilmente positiva tiene aspecto de gancho muy pequeño o de redondeo hacia el interior del pocillo que contiene la muestra. Los sueros con títulos de anticuerpos de precipitación altos formarán una línea completa de identidad o bien pueden formar bandas anchas de precipitina que tienden a extenderse. Tales reacciones pueden confirmarse como específicas de la AIE por dilución al 1/2 o 1/4 antes del contra-análisis; estas pueden ofrecer una línea de identidad más marcada. Los sueros libres de anticuerpos de la AIE no formarán líneas de precipitación y no tendrán efecto alguno sobre las líneas de reacción de los reactivos estándar. Pueden aparecer líneas de precipitación inespecíficas. Estas líneas inespecíficas pueden cruzar las líneas control, y lo habitual es que no aparezca línea de identidad en las líneas control.
- v) *Interpretación de los resultados:* Es posible que los caballos que están en las primeras etapas de la infección no den una reacción serológica positiva en la prueba AGID. Tales animales deberían sangrarse de nuevo después de 3–4 semanas. Con el fin de realizar un diagnóstico en un potro joven, es necesario determinar el estado de los anticuerpos procedentes de la madre. Si la yegua transmite los anticuerpos de la AIE al potro a través del calostro, entonces será necesario un período de 6 meses o más después del nacimiento para que disminuyan los anticuerpos maternos; para llegar a la conclusión de que un potro no está infectado, debe obtenerse un resultado negativo (tras un resultado positivo inicial) al menos dos meses después de interrumpir el contacto del potro con una yegua positiva a la AIE o con cualquier otro caballo que sea positivo. Debe destacarse que los anticuerpos maternos a menudo solo pueden detectarse hasta los 12 meses de edad y que, por lo tanto, deberán plantearse otros métodos de diagnóstico; así, por ejemplo, podría utilizarse PCR para determinar la presencia/ausencia de AIE en la sangre del potro.

2.2. Enzoinmunoanálisis

En varios países están autorizados distintos kits de diagnóstico de la AIE, como el de AGID y el de ELISA, destinados al diagnóstico de la anemia infecciosa equina, y se pueden conseguir a nivel internacional. Los ELISA en general tienen por diana el anticuerpo producido contra el antígeno de la proteína central p26, pero también pueden tener un segundo anticuerpo diana, el que se produce contra el antígeno gp45. Estos antígenos también pueden ser proteínas de fusión sintéticas o antígenos recombinantes. Los protocolos típicos del ELISA se utilizan en todas las pruebas. Si los materiales comerciales del ELISA no están disponibles, puede emplearse un ELISA no de competición utilizando antígeno p26 purificado procedente del material de cultivo de células (Shane *et al.*, 1984).

Un resultado positivo obtenido mediante el ELISA debe confirmarse utilizando la prueba AGID debido a que se han detectado falsos positivos mediante el ELISA. También se puede confirmar el resultado por la técnica de inmunoelectrotransferencia. Los Laboratorios de Referencia de la OIE tienen un antisuero estándar para inmunodifusión que contiene anticuerpo detectable (véase la Tabla de la parte 4 de este *Manual Terrestre*). Este estándar no debe utilizarse como referencia para determinar los límites inferiores de detección de la prueba ELISA. Se han publicado métodos uniformes para el control de la AIE (USDA, 2007).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Se han probado vacunas contra el VAIE inactivadas y de subunidad en distintos laboratorios, que han mostrado capacidad de protección solo contra infecciones de cepas prototipo homólogas. Entre 1975 y 1990, en China (Rep. Pop. de) se utilizó mucho una vacuna viva atenuada que se había desarrollado a principios de los años 1970, y resultó eficaz para el control de la prevalencia de la AIE. Con prevalencia baja desde 1990, la estrategia de control de la AIE ha pasado de la vacunación a la cuarentena, para evitar que los anticuerpos contra la vacuna interfieran con las pruebas de diagnóstico.

Aunque en China no han surgido preocupaciones relativas a la seguridad con el uso de la vacuna atenuada contra el VAIE, es importante destacar que, como ocurre con otros lentivirus, el VAIE es altamente mutable y puede integrarse en los genomas de los hospedadores. La vacuna viva contra el VAIE debe plantearse solo tras una evaluación exhaustiva del riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) (2000). Animal Health Analysis Methods. Detection of Antibodies against Equine Infectious Anaemia by the Agar Gel Immunodiffusion Test. NF U 47-002. AFNOR, 11 avenue Francis de Pressensé, 93571 Saint-Denis La Plaine Cedex, France.

ARCHAMBAULT D., WANG Z., LACAL J.C., GAZIT A., YANIV A., DAHLBERG J.E. & TRONICK S.R. (1989). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1167–1173.

BOUILLANT A.M.P., NELSON K., RUCKERBAUER C.M., SAMAGH B.S. & HARE W.C.D. (1986). The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods*, **13**, 309–321.

CAPPELLI K., CAPOMACCIO S., COOK F.R., FELICETTI M., MARENZONI M.L., COPPOLA G., VERINI-SUPPLIZI A., COLETTI M. & PASSAMONTI F. (2011). Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anaemia virus. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 27–33.

CHEEVERS W.M. & MCGUIRE T.C. (1985). Equine infectious anaemia virus; immunopathogenesis and persistence. *Rev. Infect. Dis.*, **7**, 83–88.

COGGINS L., NORCROSS N.L. & KEMEN M.J. (1973). The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. *Equine Infect. Dis.*, **III**, 177–186.

COGGINS L., NORCROSS N.L. & NUSBAUM S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, **33**, 11–18.

COOK R.F., COOK S.J., LI F.L., MONTELARO R.C. & ISSEL C.J. (2002). Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *Viol. Methods*, **105**, 171–179.

ISSEL C. J., COOK S. J., COOK R. F. & CORDES T.R. (1999) Optimal paradigms for the serological diagnosis of equine infectious anemia. *J. Eq. Vet. Sci.* **19**, 720-724.

ISSEL C.J., SCICLUNA M.T., COOK S.J., COOK R.F., CAPRIOLI A., RICCI I., ROSONE F., CRAIGO J.K., MONTELARO R.C. & AUTORINO G.L. (2013) Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet Rec.*, **172**, 210.

KEMEN M.J. & COGGINS L. (1972). Equine infectious anaemia: transmission from infected mares to foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **161**, 496–499.

KONG X. K., PANG H., SUGIURA T., SENTSUI H., ONODERA T., MATSUMOTO Y. & AKASHI H. (1997). Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 975–980.

MALMQUIST W.A., BARNETT D. & BECVAR C.S. (1973). Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **42**, 361–370.

MCCONNICO R.S., ISSEL C.J., COOK S.J., COOK R.F., FLOYD C. & BISSON H. (2000). Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares. *J. Eq. Vet. Sci.* **20**, 387–392.

MONTELARO R.C., PAREKH B., ORREGO A. & ISSEL C.J. (1984). Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, **16**, 10539–10544.

NAGARAJAN M.M. & SIMARD C. (2001). Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **94**, 97–109.

NAGARAJAN M.M. & SIMARD C. (2007). Gag genomic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada: implication on EIA diagnosis and peptide-based vaccine development. *Virus Res.*, **129**, 228–235.

PEARSON J.E. & COGGINS L. (1979). Protocol for the immunodiffusion (Coggins) test for equine infectious anaemia. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, **22**, 449–462.

QUINLIVAN M., COOK F.R. & CULLINANE A. (2007). Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Vet. Rec.*, **160**, 611–618.

RUSVAI M., BAKONYI T., HORNYÁK A., BALKÁ G., HANS A. & NOWOTNY N. (2009). RT-PCR detection and phylogenetic analysis of Hungarian equine infectious anaemia virus strains. *In: Proceedings of the 8th International Congress of Veterinary Virology, 23–26 August 2009, Budapest, Hungary.* Veterinary Medical Research Institute, Hungarian Academy of Sciences Budapest Hungary.

SCICLUNA M.T., ISSEL C.J., COOK F.R., MANNA G., CERSINI A., ROSONE F., FRONTOSO R, CAPRIOLI A., ANTONETTI V. & AUTORINO G.L. (2013). Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Vet. Microbiol.*, **165**, 123–134.

SHANE B.S., ISSEL C.J. & MONTELARO R.C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 351–355.

SUZUKI T., UEDA S. & SAMEJINA T. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.*, **7**, 307–316.

TOMA B. (1980). Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée. *Rec. Med. Vet.*, **156**, 55–63.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2007). Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules. Animal and Plant Health Inspection Service, USDA:
http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/eia/

WEILAND F., MATHEKA H.D. & BOHM H.O. (1982). Equine infectious anaemia: detection of antibodies using an immunofluorescence test. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 347–350.

ZHANG W., AUYONG D.B., OAKS J.L. & MCGUIRE T.C. (1999). Natural variation of equine infectious anemia virus Gag-protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virology*, **261**, 242–252.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia para la anemia infecciosa equina (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>) Para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la anemia infecciosa equina, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.