

72
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



ESTUDIO RECAPITULATIVO DE RINONEUMONITIS
EQUINA (ABORTO VIRAL EQUINO)

T E S I S
Que para obtener el Título de
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
p r e s e n t a

VERONICA ADRIANA PALMA ESTEVES

ASESOR: Carlos Guzmán Clark

Cuahtitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



U. N. A. M.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
CENTRO DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JAIQUE HELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 23 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Memorio recapitulativo de la Rinovaxonitis equina (Morbo viral

equino).

que presenta la pasante: Palm Esteves Verónica Adriana

con número de cuenta: 8102748-3 para obtener el TÍTULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser aprobada en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR NI RAER HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a ___ de ___ de 199__

PRESIDENCIA M.V.Z. Carlos Cuzán Clark

VOCAL M.C. Raúl Mar Cruz

SECRETARÍO M.C. Alejandro Martínez Rodríguez

PROFESOR SUPLENTE M.V.Z. Eugenio Bravo Quintanar

PROFESOR SUPLENTE M.V.Z. Aurelio Córdoba Ponce

Papá:

Gracias, porque lo que soy te lo debo a tí.

Mamá:

Eres el recuerdo más importante para lograr
continuar mi camino, porque aunque no estás
presente, existes en mi corazón.

LOS AMO.

Para Mary:

Por su comprensión y su apoyo.

Para mis hermanos Laura, Abel, Rodrigo y Miguel:

Por el cariño y la unión que nos ha hecho salir adelante.

Para la Sra. Mayola:

Por su apoyo e infinita ayuda incondicional.

Para mi familia Vázquez Plascencia:

Con mucho cariño.

Para mi Facultad:

Por mi raza hablará el espíritu, por mi espíritu
trabajaré por México.

Para la clínica Vetequi:

Por su valiosa enseñanza y en especial al Dr. Clark
y al Dr. Jiménez, por su interés en mi formación
como profesionista.

A todos mis grandes amigos en especial a Germán y Pamela
que me ayudaron a la realización de esta tesis.

Para ROBERTO:

Con todo mi AMOR

Mil Gracias

(Para seguir creciendo juntos)

I N D I C E

| | | |
|------|--|----|
| I. | RESUMEN | 1 |
| II. | OBJETIVOS | 2 |
| III. | INTRODUCCION | 3 |
| IV. | DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD | |
| | 1. Historia | 6 |
| | 2. Etiología | 6 |
| | 3. Patogenia | 8 |
| | 4. Periodo de incubación | 9 |
| | 5. Diagnóstico | 15 |
| | 6. Toma y envio de muestras para laboratorio | 17 |
| | 7. Técnica para el aislamiento del virus | 18 |
| | 8. Inmunidad utilizando la vacuna | 23 |
| V. | ANALISIS DE LA INFORMACION | |
| | 1. Importancia de la enfermedad en México | 31 |
| | 2. Recomendaciones | 34 |
| VI. | BIBLIOGRAFIA | 37 |

I. RESUMEN

La Rinoneumonitis Equina (aborto viral equino), es una enfermedad infecto-contagiosa, ocasionada por un herpes virus tipo 1, que presenta tres tipos de síndromes: Respiratorio, abortivo y paralítico.

La transmisión es en forma directa; su periodo de incubación es de 2 a 10 días, pero puede ser de 3 semanas a 4 meses.

La importancia de la enfermedad es debido a las pérdidas económicas que ocasiona, aunque no provoca la muerte, produce una alta morbilidad y aborto. Lo que ocasiona problemas en la reproducción equina.

Los clínicos dedicados a los equinos, aseguran la presencia de la enfermedad en México, pero la SARH reporta la enfermedad como exótica; de ahí la necesidad de lograr un diagnóstico certero con la ayuda de las recomendaciones de este trabajo para la toma y envío de muestras a el laboratorio.

II. OBJETIVOS

1.- Proporcionar a los médicos veterinarios y personas relacionadas con los equinos, un conocimiento más amplio a cerca de la enfermedad de Rinoneumonitis equina.

2.- Recomendaciones en la toma y envío de muestras para laboratorio, con el fin de obtener un diagnóstico definitivo.

3.- Dar a conocer la importancia de la enfermedad, las medidas profilácticas y evitar las pérdidas económicas que provoca.

III. INTRODUCCION

El aborto viral equino (rinoneumonitis), es una enfermedad infectocontagiosa causada por el herpes virus equino EHV-1 (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12...).

El término influenza se había utilizado por mucho tiempo para denominar la rinoneumonitis, la arteritis y la pleuroneumonía contagiosa y más rara vez para la influenza verdadera (13). Al comienzo de la década de 1930 Dimock y Edwards (1933), aislaron el virus responsable y más tarde Doll con sus colaboradores lo denominaron Virus de la Rinoneumonitis (33).

El síndrome aborto equino se empezó a describir en 1931 examinando los fetos abortados. En 1954 investigadores determinaron que el virus del aborto equino y el virus de la Rinoneumonitis eran el mismo agente etiológico. Después las manifestaciones neurológicas fueron asociadas con el aborto por 1940, hasta 1966 el EHV-1 fue aislado en tejido nervioso (20).

Esta enfermedad se presenta en formas o cuadros diferentes:

El respiratorio, el abortivo y el paralítico. La incubación es de 2-10 días, presentándose fiebre continua de 3 a 7 días (31).; la transmisión es en forma directa a través de secreciones respiratorias, agua y alimento contaminados; fetos abortados, sus membranas y fluidos, así como la cópula. Debido a que se encuentra altamente diseminado la propagación es muy rápida de rancho a rancho o de una caballeriza a otra caballeriza; por lo tanto, la enfermedad

se extiende entre las yeguas en forma inaparente y vertiginosa, donde la mayoría no presenta un cuadro clínico (19).

El aborto puede ocurrir desde el quinto mes de la gestación, pero más frecuentemente del octavo al décimo-primer mes (10). Cuando el aborto sucede después del sexto mes de gestación el feto no está autolizado, diferencia muy clara de lo que sucede en abortos bacterianos, considerándose una lesión patognomónica (7).

Con frecuencia hay una reinfección como consecuencia de la enfermedad respiratoria, presentándose infecciones subclínicas repetidas (33).

En México la rinovirusmonitis se manifestó por primera vez en 1966-1967, en granjas de cría de caballos Pura sangre y Cuartos de milla, en los estados de México, Puebla y Sonora (15).

Uno de los aspectos más importantes de la enfermedad es la morbilidad masiva y principalmente los abortos, ya que repercute fuertemente en la economía equina, por el pago de maquilas, alimentación de la yegua durante la gestación y la pérdida del producto (15).

Según los médicos veterinarios que practican la clínica equina la enfermedad existe en el país, de ahí la necesidad de prevenirla mediante la aplicación del biológico, estableciendo un calendario de vacunación, previamente estudiado de acuerdo a la localización y manejo del rancho (15).

En el mercado se producen distintos tipos de vacunas con diferentes subtipos, que son responsables de cada uno de los cuadros clínicos de la enfermedad (19).

En equinos hay tres tipos de herpesvirus: El EHV-1, el EHV-2 y el EHV-3; éste último produce pústulas papulares en la mucosa vulvar y en la mucosa prepucial. El tipo EHV-1 es el más común, caracterizado por presentar los cuadros respiratorio, abortivo y paralítico; cuando éste último se manifiesta es altamente contagioso. El EHV-2 aun no se sabe con certeza que ocasiona (19,27,7).

Algunos autores mencionan un virus EHV-4 causante de aborto (27).

La inmunidad se consigue al presentarse la enfermedad, pero los anticuerpos elaborados desaparecen después de tres a cuatro meses (3,33).

Hay dos tipos de biológicos: Una vacuna es originada de la línea celular equina, es un virus vivo modificado y la otra es una vacuna inactivada. Ambas protegen contra la forma respiratoria y se cree que hay una sólida protección contra la forma abortiva, pero no se ha demostrado adecuadamente, porque ha sido difícil realizar una prueba satisfactoria (19,29).

IV. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

1. Historia

Al comienzo de la década de 1930 Dimock y Edwards (1933) aislaron el virus responsable del aborto viral equino (33).

En 1948 Jones et al en Los Estados Unidos de América descubrió que el virus que producía la influenza era el mismo que provocaba el aborto (19).

Más tarde Doll y sus colaboradores en 1957 lo denominaron virus de la Rinoneumonitis (33).

2. Etiología

Es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el Herpes Virus Equino EHV-1. Se le relaciona con los síndromes respiratorio, abortivo y paralítico. La enfermedad inicia con la inflamación de vías respiratorias, catarro y es altamente contagiosa en caballos jóvenes (3,33,18,19,32,1).

En yeguas se manifiesta con abortos y parálisis. Rara vez se presenta la muerte, pero produce pérdidas económicas masivas (7,15,1).

En caballos jóvenes la enfermedad esta caracterizada por fiebre, anorexia y una secreción nasal. Usualmente el periodo de incubación

es de 2 a 10 días, pero en general es mayor, puede ser hasta de cuatro meses. Si la enfermedad llega a complicarse con organismos secundarios bacterianos, la infección puede llegar a una bronconeumonía (19, 20, 32).

La transmisión de la enfermedad es el resultado de un contacto directo entre los animales infectados por medio de las secreciones nasales y aerosoles. También se puede transmitir por el agua, el pienso e implementos de aseo contaminados. Los fetos afectados, sus membranas, fluidos y tejidos que contienen el virus, pueden ser la fuente para el origen de un brote (15).

El virus está clasificado entre el grupo de los herpes y se conocen tres tipos serológicos del mismo, denominados respectivamente: Virus Herpes Equino I; representado por la cepa D de Kentucky (11) y ampliamente distribuido por el hemisferio norte; el Herpes Virus Equino II, aislado en Inglaterra y el Herpes Virus Equino III, de Japón (27).

AISLAMIENTO

| Género | Lugar | Año | Cultivo |
|-------------|--------|------|-------------------------|
| EHV-1 K y D | U.S.A. | | Adaptado a Hamster |
| EHV-1 HH-1 | Japón | 1967 | Adaptado a células BHK. |
| EHV-1 2064 | Japón | 1986 | 3. pase en células EK |

| Genero | Lugar | Año | Cultivo |
|------------|-------|------|------------------------------|
| EHV-1 1965 | Japón | 1986 | 3. pase en células EK. |
| EHV-4 TH-4 | Japón | 1959 | 10. pase en células EK ED. |
| EHV-4 H-45 | Japón | 1957 | 10-15 pase en células EK ED. |

Las pruebas de fijación de complemento muestran cierta superposición antigénica entre los virus, los cuales pueden distinguirse por neutralización cruzada. Se piensa que los tres serotipos conocidos son capaces de producir el mismo tipo de enfermedad en equinos, comportándose con la misma actividad patógena en los sistemas de laboratorio. El virus se puede aislar en líneas celulares procedentes de riñón equino, ovino y porcino, en las cuales produce degeneración celular, que se inicia a los dos días y va acompañada por la formación de corpúsculos de inclusión intranucleares acidófilos. También puede aislarse por la incubación experimental de hamsters lactantes, en los que produce una hepatitis mortal, con inclusiones intranucleares en las células hepáticas (27).

Ambos sistemas permiten precisar pruebas de neutralización in vitro (18).

3. Patogenia

El virus Herpes Virus-1 es un patógeno respiratorio, existen

por lo menos cuatro síndromes identificables que se pueden atribuir a este virus en el caballo:

- * Infecciones en las vías respiratorias altas, en especial en potros añales.

- * Abortos en yeguas de crianza, la infección no se asocia siempre con aborto.

- * Septicemia y viremia de alta mortalidad en potros recién nacidos menores de una semana.

- * Encefalomielopatía: El síndrome paralítico en caballos adultos (3,27,20).

4. Periodo de incubación

El periodo de incubación es muy variable de 2 a 10 días, pero en ocasiones entre la inoculación nasal y el aborto varía de 3 semanas a cuatro meses (7).

Las epizootias de la infección respiratoria se presentan anualmente en áreas de crianza, principalmente durante los meses de octubre, noviembre y diciembre. La reinfección puede presentarse en tres o cuatro meses, pero menos patógena o asintomática (3,3).

Las yeguas gestantes adquieren la infección al mismo tiempo que se presenta la epizootia en potros. Ellas rara vez manifiestan

síntomas respiratorios clínicos, pero pueden abortar de tres a cuatro meses posterior a la infección. Algunos estudios han demostrado que el aborto por rinoneumonitis se presenta raramente en el quinto mes de gestación, y aumenta del octavo al décimo primer mes (95%) (4,19). Datos en 623 abortos demuestran que el 11% ocurrieron en el octavo mes, 30% en el noveno mes, 36% en el décimo mes y 19% en el onceavo mes (7). En algunos artículos realizados, se creyó que los niveles hormonales como la progesterona y la prolactina influían en el desarrollo de la enfermedad causada por el EHV-1, pero se concluyó que las muestras endócrinas en el torrente sanguíneo materno con fetos infectados con EHV-1, son similares a los niveles de las yeguas con fetos normales y probablemente la cantidad de liberación de dichas hormonas, solo esta relacionado con el tiempo de gestación (28,23,26,17). La expulsión del feto y la placenta es rápida, no se observa autólisis (siempre y cuando el aborto se presente después de los seis meses, si es antes, si presenta necrosis con cuerpos de inclusión) diferencias muy clara de lo que sucede en abortos bacterianos citado como signo patognomónico de la enfermedad. Es posible que algunos potrillos nazcan vivos pero muchos mueren en los primeros días con grave neumonía intersticial y septicemia bacteriana secundaria (19,33).

La enfermedad vírica nunca es mortal por si misma, ni en los casos más graves. Los casos mortales se deben a complicaciones bacterianas (22).

Durante la viremia el EHV-1 infecta trasplacentariamente a el feto, célula por célula (4).

Se demostró en un experimento en Nueva Zelanda que no todos los fetos llegan a infectarse congénitamente (14).

Los estudios serológicos de este experimento demostraron que la mayoría de las yeguas de los grupos infectados presentaron títulos positivos a EHV-1. No todas las hembras positivas infectaron a sus productos (14).

Pero el virus puede alcanzar al feto aun cuando la madre tenga anticuerpos neutralizantes en la sangre. La yegua igualmente llega a sufrir viremia, el virus escapa de los anticuerpos cuando está en el interior de leucocitos y macrófagos. Los leucocitos infectados generalmente son provenientes del anillo linfático faringeo. El agente causal tiene que superar en la yegua el sistema de defensa nasofaríngeo; por ello nunca es predecible si una yegua va a abortar o no, la efectividad de la barrera linfática, parece depender en cierta medida del título de anticuerpos neutralizantes en el suero, así como de la inmunidad celular (33,4).

Experimentalmente y clínicamente las evidencias indican que los abortos ocurren seguidos de la infección reciente o la enfermedad latente. El virus infecta al feto de 15 a 90 días post-infección en las yeguas (4).

En algunas yeguas gestantes infectadas con Herpes Virus Equina-1 en los Estados Unidos América y Europa han presentado síndrome paralítico, inicialmente se manifiesta con ataxia, terminando con parálisis completa. Generalmente no se observa fiebre, rinitis o

parálisis de la vejiga antes de presentar síndrome paralítico y abortando hay recuperación de movimientos (19).

Otros autores mencionan que la encefalomiелitis se manifiesta raramente en caballos infectados con EHV-1, produce signos clínicos de ataxia, dificultad de movimientos, se caen, más tarde presentan parálisis y otras numerosas anomalías asociadas con el virus. La isquemia y la inflamación son cambios en el sistema nervioso central, se cree que es una respuesta secundaria de una inmunidad-mediata (antígeno-anticuerpo-complemento) y la vasculitis típica es una hipersensibilidad tipo III (20).

La encefalomiелitis es la manifestación más difícil de EHV-1 de diagnosticar (20).

El aislamiento de EHV-1 se toma de cerebro, tejido de médula espinal y líquido cefalorraquídeo de los caballos afectados (20).

La inmunidad clínica de los caballos a la infección de Herpes virus equina-1, es una protección contra el desarrollo de una enfermedad respiratoria y abortigénica, aunque la invasión e infección viral es posible. La inmunidad dura poco menos de tres meses. La reinfección es una consecuencia de la enfermedad respiratoria y se manifiestan infecciones subclínicas repetidas. La presencia de un suero de anticuerpos neutralizantes puede disminuir la frecuencia de infecciones adicionales, pero el aborto continúa (30).

Las yeguas con anticuerpos séricos con el virus de la rinoneumonitis viral equina secretan los anticuerpos en calostro, lo que crea inmunidad pasiva en los potros y en promedio los anticuerpos se reducen al nivel 0 a los 180 días de edad. Por desgracia, los anticuerpos neutralizantes del virus no necesariamente indican que hay resistencia a la infección. La inmunidad mediada por células es una característica importante de la resistencia de los virus herpéticos, y se dispone de la prueba de transformación de linfocitos para medir lo anterior. La inmunidad mediada por las células se deprime a un grado significativo durante la gestación, y esto tal vez explique la aparición de aborto al haber altos títulos de anticuerpos neutralizantes del virus (3).

En los centros de cría donde se presentan epizootias anuales en potrillos, raramente las yeguas abortan. Se piensa que hay un grado de resistencia abortígena gracias a la inmunidad creada, sin saber cual es la duración de ésta (19). Pero la enfermedad también se ha presentado anualmente en caballos jóvenes en granjas que no han tenido introducción de nuevos caballos; esto sugiere la presencia de portadores sanos entre caballos adultos (7).

El efecto principal del virus esta en el sistema linfoide, inicialmente se produce una disminución rápida de los linfocitos en todos los tejidos linfoides, produciendo una linfopenia precoz que coincide con aumento de la temperatura. Esta supresión inicial de producción linfocítica es seguida de una linfocitosis, que dura los dos primeros días de fiebre. Los linfocitos regresan al nivel normal de 5 a 10 días (7).

Hay proliferación de leucocitos, junto con hiperplasia e infiltración con macrófagos dentro de las paredes de los vasos sanguíneos. También el virus ocasiona cambios vasculares y degenerativos en los órganos parenquimatosos, así como en el epitelio utáneo, mucoso y tejido nervioso (18).

Los fetos abortados presentan a la necropsia edema del músculo subcutáneo y de las fascias, hay acúmulo de líquidos en las cavidades orgánicas. A menudo se observa ictericia general y el meconeo mancha las extremidades y el amnios. Las lesiones macroscópicas más persistentes se manifiestan en los pulmones que aparecen congestionados y edematosos en los septos interlobulares, los bronquios suelen presentar tapones de fibrina y en un 50% de los fetos abortados se observa bajo la cápsula del hígado focos gris-blanquecinos (necrosis coagulativa). También hemorragias epicárdicas. Histopatológicamente las células que rodean los focos necróticos del hígado contienen corpúsculos de inclusiones intranucleares acidófilas, granulares y homogéneas. Inclusiones similares se presentan en las células epiteliales de los bronquios, bronquiolos y alveolos (18).

El bazo aparece con hemorragias petequiales en la cápsula y una prominencia anormal de los folículos. En la mucosa de las vías respiratorias altas hay hemorragias petequiales o equimóticas, puede presentar necrosis hemorrágica de la corteza renal (18).

Los septos interlobulares pulmonares se encuentran edematosos y con un infiltrado inflamatorio mononuclear, el edema y las

hemorragias diseminadas afecta a todo el organismo uniformemente, hay un exudado fibrinoso alveolar, necrosis de las células bronquiales y del epitelio alveolar (18,7).

Son específicos los corpúsculos de inclusión acidófilos que se encuentran en los núcleos del epitelio bronquial y alveolar; hay edema en hígado e infiltraciones leucocitarias (18).

Ocasionalmente se aprecia hepatitis difusa sin necrosis focal, también se presenta hiperemia y degeneración grasa del hígado. La placenta no presenta cambios patológicos aparentes (18).

5. Diagnóstico

Diagnóstico clínico en animales enfermos:

1. Catarro respiratorio
2. Fiebre
3. Análisis cuantitativo de las células blancas disminuido (3,18,19,7).

En el feto abortado, se puede hacer el diagnóstico a la necropsia :

1. Fluido seroso en la cavidad torácica y abdominal
2. Pulmones edematosos con hemorragias petequiales
3. Focos necróticos en el hígado (3,18)

Y en histopatología se observa:

1. Cuerpos de inclusión acidófilos intranucleares en el epitelio broquial y alveolar.

Cultivos negativos en analisis bacteriales.

En pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa:

Se realiza tiñendo células endoteliales de placenta y cordón umbilical de los fetos abortados (11).

En cuatro casos experimentales y otros dos casos de campo se detectó EHV-1 positivo por medio de inmunofluorescencia inmunoperoxidasa en las muestras ya mencionadas, pero no en otros tejidos fetales (11).

En pruebas de fijación de complemento:

Se puede descubrir infección previa. El aumento en el título de anticuerpos en varios sueros colectados con varias semanas de intervalo tiene más valor, pero el único método de diagnóstico definitivo es el aislamiento del virus a partir de fetos abortados (3,33,24).

El diagnóstico en yeguas que presentaron aborto es difícil porque:

1. La yegua fue contagiada de 1-4 meses antes del aborto y los niveles de anticuerpos ya no se detectan en el momento del aborto (7).

2. Historia clínica. a) El aborto puede presentarse después de los 5 meses de gestación, pero generalmente se presenta entre el octavo al décimo primer mes. b) La yegua no manifiesta otros signos clínicos, excepto el aborto. c) La expulsión del feto es rápida sin señales de aborto previamente. d) Los fetos no presentan autólisis,

contrario de lo que sucede en los abortos bacterianos (3,19,7,15).

6. Toma y envío de muestras para laboratorio.

El virus es muy inestable, y frecuentemente no se puede aislar por una muestra mal manejada, ya sea por el clínico o por el laboratorio, trayendo como consecuencia un diagnóstico erróneo (16).

El Consejo Nacional de Sanidad Animal a fin de hacer un estudio sobre la presencia del virus herpes equino en México, recomiendan para un mejor resultado de estos estudios la siguiente técnica de muestreo:

- Muestras de abortos. Tejido fetal del pulmón, hígado, bazo y timo (3cm x muestra de c/u) (16).
- Poner las muestras en frascos de vidrios limpios e inmediatamente colocar los frascos cerrados en hielo para conservarlos a 5° C., para transportar urgentemente al laboratorio.
- El tiempo entre el muestreo y la llegada de las muestras al laboratorio de referencia no debe exceder de 5 hrs.
- La recolección de muestras para exudado nasal se realiza con un hisopo estéril y se toma de la región nasal, o de la zona lagrimal. El hisopo se coloca inmediatamente en un tubo de prueba que contenga 1.5 ml de DMEM (Medio esencial mínimo) con 100 g de

gentamicina/ml y se transporta al laboratorio. El tubo prueba que contiene el hisopo puede ser congelado a -70°C , solo cuando los fluidos puedan ser inoculados en un cultivo de tejido celular.

El diagnóstico definitivo es solamente por aislamiento del virus y las lesiones características de vasculitis.

Los anticuerpos en líquido cefaloespinal también confirma un diagnóstico de encefalomiелitis causada por EHV-1 (16).

7. Técnica para el aislamiento del virus.

Propósito:

Aislamiento de Herpes Virus Equino tipo 1 de especímenes equinos utilizando técnicas de cultivo celular.

Muestras:

Aborto: Tejidos de pulmón fetal, hígado, bazo y timo.

Respiratorio: Exudado nasal, tejido pulmonar.

Neurológico: Tejido cerebral y líquido cerebro-espinal.

Manejo de las muestras:

Las muestras deberan ser refrigeradas inmediatamente y transportadas al laboratorio sin retraso. No se recomienda congelar las muestras para aislar el virus.

Material:

- Cultivos celulares. Células epiteliales equinas (ED), células de riñón de conejo-13 (RK-13), medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle's, Medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle's y 10% de suero fetal bovino (SCF), solución antibiótica.
- Set de titulación con 24 pozos estériles.
- Incubadora a 37°C y 5% de CO₂
- Campana de flujo laminar
- Homogenizador y bolsas.
- Microscopio invertido
- Centrífuga.
- Mezclador vortex
- Tijeras y forceps estériles
- Tubos de ensayo estériles 4ml.
- Pipetas estériles
- Micropipetas (100-200 ul)
- Hisopos estériles
- 4 portaobjetos para la cámara desprendible
- Antisuero de Herpes viral equino 1, conjugado FITC.
- Microscopio con filtro ultravioleta.
- Acetona.
- Solución buffer fosfato
- Jarra de Coplin
- Glicerol buferado.

Método:

La técnica estéril debe de realizarse bajo este procedimiento. El manejo de las muestras y las inoculaciones del cultivo deben de

hacerse en una campana de flujo laminar.

1) PREPARAR LAS MUESTRAS PARA EL PROCEDIMIENTO PARA DEL AISLAMIENTO DEL VIRUS

Tejidos:

a) Prepare un tubo con antibiótico para cada muestra en un tubo de ensayo graduado agregue lo siguiente: 0.2 ml. de solución pen/strep/fungicina (PSF), 1ml. de solución de gentamicina.

b) Preparación de las muestras: Prepare una bolsa con el número de identificación del laboratorio y el tipo de tejido, añada 5 ml de MEM a cada bolsa, cuidadosamente macere aproximadamente 1 cc. de tejido y añadalo a la bolsa apropiada y se homogeniza por dos o tres minutos.

Añada dos ml. de la suspensión tisular al tubo de la solución antibiótica. Incube a temperatura ambiente por cuatro a seis horas o durante la noche a 4°C antes de inocular en el cultivo celular.

Exudados nasales:

a) Prepare un tubo con antibiótico para cada muestra, en un tubo de ensayo graduado añada lo siguiente: 1ml. MEM, 0.2ml de solución PSF, 0.5 ml. de Solución gentamicina.

b) Ponga el exudado en el tubo de antibiótico, mezcle perfectamente. incube de 4 a 6 hrs. a temperatura ambiente o toda una

noche a 4°C. Presione el exudado en el interior del tubo para sembrar el medio y caiga el exudado.

2) CULTIVO CELULAR

a) Prepare el Set de titulación, se requiere un pozo para cada muestra y un pozo para grupo control. Prepare una suspensión de cien mil a doscientas mil cel/ml de RK-13 y/o cultivo celular ED en MEM más 10% de SCF. 1 ml se adiciona a cada pozo.

b) Incubar a 37°C y 5% de CO₂, los sets deben usarse dentro de 24 hrs.

3) AISLAMIENTO

a) centrifugar los tubos de la muestra con antibiótico a 100 RPM por cinco minutos.

b) Inocular 200 ul del sobrenadante en un pozo del set. identificar el pozo y regresar el pozo a la incubadora.

c) Congelar el tubo a -70° C hasta que el aislamiento se complete.

d) Observar diariamente por siete días. Anotar efectos citopáticos (CPE), toxicidad y contaminación bacteriana o por hongos. Las muestras demasiado contaminadas deberan ser filtradas con un filtro de .45 nm y deberá repetirse el aislamiento.

e) Realice tres series de pases transfiriendo 100 ul de sobrenadante a un nuevo set al final de los siete días de la incubación.

f) Almacene el sobrenadante de los pozos con CPE, congele a -70°C, identifique.

4) IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS POR LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

a) Preparar 4 pozos del portaobjetos con camara. Inocule 1 ml de cultivo celular de 100 mil cel./ml en cada pozo.

b) Inocule la cámara desprendible con 100 ul de el sobrenadante aislado, incubar a 37°C 5% de CO2 hasta que se note el efecto citopático.

c) Arregle el portaobjetos de la siguiente manera.

1) Quite la unidad de la cámara superior del portaobjetos y deséchelo en una solución desinfectante.

2) Coloque el portaobjetos en una jarra de Coplin, llene la jarra con PBS para remover el medio del portaobjetos. Vierta el PBS en la solución desinfectante, repita.

3) Vierta acetona en la jarra de Coplin, inmediatamente retírela, vuelva a llenar la jarra con acetona e incube por 10 min.

4) Seque al aire el portaobjetos y proceda a congelar a 70°C hasta que se manche.

d) Contamine con antisuero EHV-1 conjugado con FITC.

1) Diluya con antisuero en SCF, cubra el cultivo celular con la solución, incubar en un recipiente húmedo por 30 min. a 37°C.

2) Coloque el portaobjetos en una jarra de Coplin y llénela con PBS incube por 10 min. repita.

3) Cubra con glicerol buffer hasta la mitad.

4) Observe con un microscopio con un filtro ultravioleta en 10 X. Distinguir células con fluorescencia nuclear es considerado positivo para EHV-1 (34).

8. Inmunidad utilizando la vacuna.

Prevención de la enfermedad rinoneumonitis con la utilización de la vacuna.

La infección herpes virus equina 1 está presente continuamente en los caballos. En análisis serológicos la incidencia de infección en potrillos puede aumentar hasta el 100%. La fuente de la enfermedad es un caballo infectado, además un estado de estrés como en el destete, transportación, venta, carreras, exhibiciones, etc., predisponen a la infección (3,33,19,15,7).

La manifestación Herpes virus equino 1, en particular la variedad aborto es endémico en el Reino Unido. Por varios años se ha vacunado con virus muerto a yeguas preñadas y animales en contacto (pneumoabort Fort Dodge Laboratories, U.S.A.) Sin embargo en ocasiones había reportes de aborto causados por EHV-1, a pesar de haberse vacunado con las recomendaciones de los laboratorios (29).

Los tipos comunes de vacunas comercialmente eficaces consistía de un virus EHV-1 modificado vivo o inactivo. La limitada eficacia de estas vacunas en prevenir EHV-1 y EHV-4 inducía enfermedades en caballos, fue demostrado por los continuos brotes de herpesvirus ya que se presentan abortos, enfermedades respiratorias y neurológicas, a pesar de programas intensivos de vacunación. Así que los investigadores iniciaron con el mejoramiento de las vacunas con alteraciones genéticas. Una de estas vacunas es una subunidad viva, para crear esta vacuna los investigadores insertaron genes que

codifican para las dos glucoproteínas del EHV-1, siendo estas las que proporcionan la inmunidad (20). La segunda vacuna experimental esta hecha por química un virus con genes más virulentos, quinasa de timidina (TK) del gen DNA. esta vacuna se llama TK-Negative EHV-1 vacuna mutante (20,8).

Cuando se probó vía intravenosa e intramuscular en ocho caballos la vacuna TK-negativa resultó ser segura y eficaz en animales de un año desafiados con EHV-1 virulento (20).

Entonces se observó las características y circunstancias de las hembras vacunadas, una de las características era que con la vacunación favorecía el decremento de la incidencia del aborto. Siguiendo incidentes de aborto en yeguas vacunadas, la vacuna debe de ser frecuentemente examinada sin excepción por los criadores y los miembros de la profesión veterinaria (29).

Los conocimientos de inmunología de la enfermedad sugiere que el virus estimula una inmunidad que posee una pobre respuesta anamnésica (29).

Además los anticuerpos responsables de la inmunidad humoral tienen una vida relativamente corta, ya sea por un virus de campo o por una vacuna (29).

Estos disminuyen a niveles bajos después de 90 días aproximadamente, en teoría, un programa de vacunación requiere

regularidad y una administración repetida para proporcionar continua protección (29).

El aborto puede producirse 150 días después de la infección. Esta situación explica que una yegua vacunada aborte (29).

La experiencia muestra que en la práctica se debe administrar la vacuna con dos meses de intervalo a todas las yeguas preñadas a partir del quinto mes de gestación y adicionalmente a todos los animales en contacto (29).

Se realizó un experimento durante cuatro años con 300 caballos Lipizanos, de los cuales 180 fueron caballos adultos, se vacunaron sistemáticamente contra EHV-1 y con los grupos representativos fueron monitoriados serológicamente para observar su respuesta inmunológica (anticuerpos).

Una vacuna de virus vivo fue inefectiva en presencia de anticuerpos humorales, otra vacuna con aceite como adyuvante tuvo la más alta inmunogenicidad antiviral, pero después de varias revacunaciones causó reacciones severas tan frecuentes que se descontinuó en adultos. Se piensa que el suero fetal bovino originado de cultivos celulares que se utilizó para la propagación viral, no fue eliminado del producto vendido, siendo este el responsable de las incompatibilidades.

Una vacuna de virus vivo fue de baja antigenicidad con

respecto a su componente EHV-1 (aunque muy buena con respecto a los virus de influenza), de tal manera, que resultó insatisfactoria para la inmunización primaria. De cualquier manera era lo suficientemente potente y clínicamente bien tolerada para mantener niveles aceptables de anticuerpos en caballos que habían sido inicialmente vacunados con la vacuna de aceite como adyuvante. La vacuna TK EHV-1 mutada del aislamiento de TK+ EHV-1 (RQ), en las pruebas de suero neutralizante de anticuerpos pre y post vacunación, antes y después de la inoculación experimental con EHV-1. En una prueba de microtitulación usando cultivo celular Vero y un RQ TK-strain de EHV-1 determinó la titulación de anticuerpos:

Titulación de anticuerpos en suero neutralizado

Días post-inoculación

| Gpo. | Caballo | 0 | 14 | 21 | 25 |
|------|---------|---|-----|-----|----|
| # | 1 b | N | 64 | 64 | 16 |
| # | 9 c | N | 128 | 32 | 16 |
| # | 14 c | N | 32 | 16 | 32 |
| # | 27 c | N | 128 | 128 | 32 |
| # | 29 c | N | 64 | 32 | 16 |
| # | 31 c | N | 128 | 64 | 32 |
| # | 37 c | N | 128 | 64 | 32 |
| # | 54 b | N | 64 | 64 | 64 |

Caballos utilizados experimentalmente con inoculación intranasal con EHV-1 en el día 0.

La titulación de anticuerpos es recíproca al nivel más alto de dilución del suero que neutraliza al virus.

b : Vacunación intravenosa

c : Vacunación intramuscular

n : Negativo (22).

En otro experimento se vacunó a 18 caballos en varias ocasiones durante 12 a 20 meses con virus vivo e inactivado, fueron desafiados por inhalación con el EHV-1 aislado de un brote de aborto y parálisis en Austria (5).

No hubo diferencias obvias entre los dos tipos de vacuna, ya que todos los caballos desarrollaron viremia y un grado de la enfermedad clínica (fiebre, descarga nasal y ocular); 5 de 10 hembras abortaron (5).

Los autores sugieren que para una mayor protección se puede lograr con un virus modificado subtipo 2 (5).

Existe otra vacuna viva (Prevaccinol) que desarrolla inmunidad humoral y también celular. El virus se atenúa por pasaje en cultivo de riñón de lechón (para que pierda la patogenicidad se requiere 250 a 300 pasajes). La vacuna no tiene el mismo efecto inmunizante que el virus del campo. El virus vacunal se multiplica en el animal inoculado y se excreta durante 2 a 4 días. Esta primera vacunación provoca fiebre difásica el 1, 2 y el 8 y 9 días post-inoculación. La

vacunación provoca un título modesto que persiste unos seis meses (3).

Hay una vacuna muerta (Pneumoabort) que protege contra la forma respiratoria y abortígena sin causar los efectos secundarios indeseables (19,3).

Las recomendaciones de vacunación son las siguientes:

En México las vacunaciones deben de realizarse con vacuna de virus muerto (15).

1. Vacunación a yeguas gestantes en el quinto, séptimo y noveno mes de gestación.

2. Vacunar a caballos adultos que hayan estado expuestos al virus EHV-1 antes de aumentar las condiciones de estrés, incluyendo el embarque de los caballos a las exhibiciones, carreras, eventos y granjas de crianza (15,7).

3. En las granjas de crianza todas las yeguas vírgenes, estériles y sementales deben recibir una dosis de vacuna inactivada antes de la exposición con los potrillos recién nacidos (15,7).

4. Los recién nacidos deben recibir la vacuna primaria a las tres semanas de edad, aplicando una segunda dosis seis meses después (15,7).

5. La vacunación a los caballos vírgenes que han estado expuestos al EHV-1 se hace anualmente, antes de las épocas de lluvia (8,10).

6. Yeguas gestantes recién llegadas a la granja de crianza deben ser vacunadas inmediatamente (15,7).

La inmunidad lograda con la vacuna virus muerto no dura más de cuatro meses, tampoco si el animal enfermó el año anterior o simplemente estuvo expuesto a la enfermedad (3,8,7)

Hay vacunas en el mercado extranjero con amplia seguridad, ya que han sido inactivadas, probándolas con anterioridad en animales de laboratorio, comprobando que no produce la enfermedad paralítica, ni las infecciones abortígenas (19).

La eficacia de la vacuna ha sido estudiada durante dos años, en 1,943 yeguas gestantes en 26 granjas de crianza en los Estados Unidos de América, el porcentaje de aborto causado por EHV-1 solamente fue del 0.4% (19).

Los laboratorios que producen la vacuna virus muerto aseguran:

1. La vacuna es incapaz de producir la enfermedad.
2. No se origina la infección abortígena.
3. Estudios indican que no produce el síndrome paralítico en yeguas.
4. Se puede utilizar en caballos jóvenes para lograr resistencia contra la enfermedad.

5. Se presenta una fuerte reacción inmune.
6. No es necesario aislar a las yeguas.
7. Se puede administrar en cualquier periodo de la gestación (sin olvidar las recomendaciones).
8. La vacuna tiene estabilidad hasta 24 meses (19).

Se realizó una estimulación inmune compleja (ISCOM) de Herpes viral equino tipo 1, género V592 preparada, adicionando Quil A de detergente virus-solubilizado (25). La vacuna ISCOM, contiene 25 mg de virus intacto por dosis, fue usada intramuscularmente en ponys preñadas en el quinto, sexto y noveno mes de gestación. Las hembras fueron inoculadas intranasalmente 3 semanas después de la tercera dosis de vacuna con el género AB4 de EHV-1. Las hembras control no vacunadas y todas las yeguas vacunadas, desarrollaron fiebre y viremia y 8 de 9 hembras control y 1 de 10 yeguas vacunadas abortaron (25).

Otros autores trataron de realizar un efecto inmunoterapéutico con una dosis baja de alfa-interferón en la enfermedad clínica, evaluando a caballos inoculados con Herpesvirus-1; Se realizó monitoreos de concentración en suero de IgG e IgM, títulos de Ac. de EHV-1, así como, de la respuesta febril y la descarga nasal.

Se observó un incremento en los títulos de anticuerpos de EHV-1 en todos los caballos después de el desafío, pero no hubo diferencia significativa (12,10,9).

V. ANALISIS DE LA INFORMACION

1. Importancia de la enfermedad en México.

Oficialmente no esta reconocida su existencia en México, ya que la rinoneumonitis en la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos por la dirección general de salud animal enfermedades de notificación obligatoria en México, esta clasificada en el grupo I, y debería pertenecer a la clasificación del grupo II, ya que el:

Grupo I.- Enfermedades exóticas de reporte inmediato obligatorio, este grupo contiene aquellas enfermedades transmisibles con gran poder de difusión que no existe en el Territorio Nacional y cuya aparición tendría graves consecuencias de tipo sanitario, socioeconómico y de comercio internacional para el país (13).

Grupo II.- Enfermedades enzoóticas de reporte inmediato obligatorio, en este grupo se consideran aquellas enfermedades y parasitosis que se encuentran presentes o que existan evidencias en el Territorio Nacional y que tienen efectos significativos en la producción pecuaria y de importancia estratégica para las acciones de salud animal en el país (13).

Los médicos veterinarios dedicados a la clínica equina declaran que la enfermedad existe en México, pero la inestabilidad del virus no ha permitido demostrarlo a nivel laboratorio; por ello la importancia de las recomendaciones de toma y envío de muestras de este trabajo.

La lucha constante de los clínicos para demostrar la existencia de la enfermedad en México, continúa.

La rinoneumonitis afecta considerablemente la producción equina en nuestro país. El Stud Book de la raza pura sangre tiene registrados en el año 1991: 2,500 yeguas de las cuales 1,271 están dedicadas a la reproducción, 120 sementales y 826 potrillos nacidos en este año. Mientras que en 1992, hasta el momento se han registrado 700 potrillos (2).

Se presentan alrededor de 20 yeguas muertas gestantes en un año en promedio. Y treinta abortos máximo (2).

Se considera que la mortalidad de los potrillos menores de un año es del 2.4% (2).

En los registros de la Raza Española, en 1991 se han anotado 206 potrillos nacidos el mismo año y aproximadamente 400 yeguas registradas (2).

La raza cuarto de milla no tiene un control de los animales que existen en México, pero los ranchos de crianza hay 3,000 yeguas puras (2).

En la raza Árabe se calculan 100 yeguas máximo en el país (2).

No se puede hablar de datos exactos, ya que las fuentes de información son muy escasas, pues muchas granjas de cría no registran

el numero real de animales, ni los potrillos muertos, ni tampoco cuantos abortos se presentaron (2).

Cuando una yegua de raza pura es cruzada con un semental de diferente raza, el potrillo que nace ya no se registra en ninguna raza (2).

Tomando en cuenta lo anterior, es muy difícil saber con certeza la cantidad de caballos que hay en el país, así que es imposible conocer las pérdidas económicas reales por causa de los abortos.

La enfermedad clínicamente existe en México y es muy importante que se acepte oficialmente. Las vacunas que se utilizan en el país, son importadas y podríamos decir que de contrabando. Con esta situación surgen graves problemas, como descuidar frecuentemente la cadena fría de los biológicos, por falta de información, se vacunan caballos que no necesitan la vacunación, provocando la enfermedad y por consecuencia subiendo la incidencia de la enfermedad.

Como se ha mencionado en otro capítulo, una yegua expuesta a la enfermedad, necesitará la aplicación de la vacuna en el quinto, séptimo y noveno mes de gestación, para evitar una infección con el virus EHV-1 y produzca el aborto.

La rinoneumonitis ocasiona otro tipo de pérdidas económicas, no provoca mortalidad en los animales, pero en los potrillos se presenta un problema en vías respiratorias, altamente contagiosa, presentando un gran desgaste corporal, la conversión alimenticia

disminuye y en consecuencia hay una baja de peso. Se realizó un estudio en Hong Kong en caballos pura sangre en entrenamiento, infectados por EHV-1 subtipo 1 género aborto. Dos de los caballos infectados con EHV-1 fueron monitoreados realizando exámenes sanguíneos en el periodo de 4 semanas y medición de evaluación hematológica.

Se observó un aumento en el conteo monocítico en los primeros días y disminuyó regularmente en un caballo, pero el otro tuvo un segundo pico monocítico después del periodo de ejercicio, esto demostró la importancia de no ejercitar a los animales en los estadios de enfermedad (21,6).

Se recomienda la utilización de antibioticos para contrarrestar las infecciones bacterianas secundarias, etc.

2. Recomendaciones

Este trabajo tiene la finalidad de dar una información más amplia y certera de la Rinoneumonitis equina, además conocer el problema real que existe en México.

La enfermedad no esta reconocida oficialmente en el país pero se asegura la existencia y continúa cumpliendo los requisitos para que la enfermedad este dentro de el grupo II en la SARH.

Los beneficios estan basados en evitar el deterioro de la producción equina realizando correctamente las medidas preventivas y profilácticas, disminuyendo las causas y pérdidas económicas que provoca la enfermedad.

Es un hecho que se están cometiendo graves errores en los brotes de rinoneumonitis equina. Si la enfermedad oficialmente no existe en México y los clínicos de equinos aseguran la presencia de ésta, sería importante realizar una investigación a fondo.

Estamos concientes que el reporte es obligatorio; y la pregunta es ¿quien la reporta?, tal vez el principio de la manifestación en México los clínicos la reportaban, pero su información era invalida por que en sus muestras de laboratorio el virus no existía y daban los resultados como negativo a rinoneumonitis. Entonces el reporte dejó de ser frecuente y ellos por su parte intentaron solucionar el problema. Programaron su vacunación anual como se mencionó con anterioridad, aunque esa no es la solución.

Es preciso tomar cartas en el asunto y si se presenta un brote de rinoneumonitis; primero, reportar oficialmente el brote, después tomar las muestras para el laboratorio con las recomendaciones de este trabajo e iniciar el tratamiento con los animales afectados.

Si se aceptara que la enfermedad existe oficialmente en México, se lograría que las medidas profilácticas fueran correctas, la vacuna se conseguiría fácilmente, se controlaría la importación del biológico protegiendo así la cadena fría, no habría riesgos de una mal manejo ni riesgos de que la vacuna esté inactiva. La información de la enfermedad sería más amplia, verídica y correcta.

Publicaciones de artículos clínicos con experiencia en la

enfermedad, describir la situación del país, la frecuencia de los brotes, el porcentaje de la morbilidad, el porcentaje de los abortos causados por la enfermedad, prevenir conociendo los factores predisponentes, etc.

Hay mucho que hacer para proteger la producción equina en México. No pueden seguir las pérdidas económicas por la falta de información. Se debe tomar conciencia para lograr el control de la enfermedad, se debe demostrar oficialmente en México.

El calendario de vacunación y otras recomendaciones fueron proporcionadas por clínicos equinos, que a lo largo de la práctica han tomado medidas profilácticas, preventivas y tratamientos.

Espero que este trabajo cumpla con los objetivos deseados.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Allen, -G.P.; Yeargen, -M.R.; Turtinen, -L.W.; Bryans, -J.T.; In equine infectious diseases V, Proceedings of the fifth internacional conference on equine infectious diseases , edited by D.G. Powell, University press of Kentucky, Lexington, 103, 1988.
- (2) Archivos del Stud book: Hipódromo de las Américas, México 1990-1992.
- (3) Blood, -D.C.; Henderson, -J.A.; Radostits, - O.M.; Medicina Veterinaria, Ed. Interamericana, 6a. Edición, México, 1988.
- (4) Burki, -F.; Nowotny, -; Oulehla, -J.: Attempts to immunoprotect adult horses, specifically pregnant mares, with comercial vaccines against clinical disease induced by equine herpesvirus 1, Journal of Veterinary Medicine, Series B, 38:6, 432-440, 1991.
- (5) Burki, -F; Rossmannith, -W; Nowotny, -N; Pallan, -C; Mostl, -K; Lussy, -H: Viraemia and abortions are not prevent by two comercial equine herpesvirus - 1 vaccines after experimental challenge of horses, Veterinary-Quartely, 12:2, 1990.
- (6) Burrel, - M.H.; Mackintosh, -M.E.; Mumford, -J.A.; Rossdale, -P.D., Proceeding of the society of veterinary epidemiology and preventive medicine, 74, 1985.

- (7) Catcott, -E.J.; Smithcors, -J.F.: Equine Medicine and Surgency, Ed. American Veterinary Publications Inc., 2a. Edicion.
- (8) Cornick, -J.; Martens, -J; Martens, - R: Safety and efficacy of a thymidine kinase negative equine herpesvirus- 1 vaccine in young horses, Canadian Journal of Veterinary-Research, 54:2, 260-266, 1990.
- (9) Crandell, -R.A.; Drysdale, -A.; Stein, -T.L.: A comparative study of bovine herpesvirus 1247 and equine herpesvirus-1 in ponies, Canadian Journal Comparative medical, 43, 94-97, 1989.
- (10) Douglas, -R.M.; Meore, -B.W.; Miles, -H.B.: Prophylactic efficacy of intranasal alpha-interferon against rhinovirus infections in the family setting, N. England Journal medical, 314, 65-70, 1986.
- (11) Edington, -N; Smith, -B; Griffiths, -L: The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus - 1 (EHV-1) abortions, Journal of Comparative Pathology, 104:4, 379-387., 1991.
- (12) Effects of human alpha interferon on experimentally induced equine herpesvirus-1 infection in horses, Journal Veterinary Research, Vol 51, No. 12, 1990.
- (13) Enfermedades de notificación obligatoria en México: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos por la Dirección general de salud animal, Oficio, 1992.

(14) Horner, -W.G: Equine herpesvirus type 1 outbreaks, Surveillance Wellington, 16:1, 14-15, 1989.

(15) Guzmán, -C: Temas generales de veterinaria práctica del caballo, Talleres de SEI, S.A. México 1980.

(16) Guzmán, -G; Campos, -B: Circular para los médicos veterinarios que practican la clínica, Consejo Nacional de Sanidad Animal, México 1992.

(17) Jeffcott, -L.B.; Rossdale, -P.D.: Practical aspects of equide virus abortion in the United King, Veterinary records 98, 153-155, 1986.

(18) Jubb, - K.V.F.; Kennedy, - P.C.: Patología de los animales domésticos, 1971.

(19) Manual de Pneumoabort, Norden laboratory, 1985.

(20) Martens, -J.G.; Martens, -R.J.: Equine herpesvirus type 1: its classifications, pathogenesis and prevention, Veterinary medicine, 86:9, 936-940, 1991.

(21) Mason, -D.K.; Watkins, -K.L.; McNie, -J.T. Luk, -C.M.: Haematological measurements as an aid to early diagnostic and prognosis of respiratory viral infections in thoroughbred horses, Veterinary record, 126, 359-363, 1987.

(22) Merck Sharp, -Dohme Research Laboratories: Manual de Veterinaria, Ed. O.H. Segmund. México 1988.

(23) Michel, -T.H.; Rossdale, -P.D.: Equine veterinary journal studies on the efficacy of human chorionic gonadotrophin and releasing hormone for lastening ovulation in Thoroughbred mares, 18, 438-442, 1986.

(24) Mumford, -J.A.; Guidelines for vaccination of horses, Equine veterinary, 185:1, 34-37, 1984.

(25) Mumford, -J.A.; Hannant, -D; Jesset, -D.M.; O'Neill, - T.O.: Evaluation of protective efficacy of equid herpesvirus type 1 ISCOM vaccine for the abortigenic form of disease. Equine Reproduction V, Proceedings of the Fifth Internacional Symposium on Equine Reproduccion, Edited by Wade, J.F.; Allen, W.R.; Rossdale, P.D.; Rowlands, I.W.J.), 730-731, 1991.

(26) Mumford, -J.A.; Rossdale, -P.D.; Jessett, -D.; Gann, -S.J.: Serological and virological investigations of an equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985, Journal Reproduction fertility, 35, 509-518, 1987.

(27) Okazaki, -K.; Kumagai, -T.; Honda, -E.: The inmunodominant glycoprotein complex of equine Herpesvirus 1 (EHV-1) and the counterpart of EHV-4, Japanese Journal of Veterinary Science, 52:5, 1127-1130, 1990.

(28) Ousey, -J.C.; Rossdale, -P.D.; Cash, -R.S.; Worthy, -K: Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulphate and prolactin in pregnant mares subject to natural challenge with equine herpesvirus-1. Journal of reproduction and fertility LTD, 35, 519-528, 1988.

(29) Pickles, -A.C.: Vaccination of mares against equine herpesvirus-1. Veterinary Record, 130:8, 167-168, 1992.

(30) Runnells, -R.A.; Monlux, -W.S.; Monlux, -A.W.: Principios de patologia veterinaria, Ed. Continental S.A. de C.V., 1a. Edicion, Mexico, 1982.

(31) Stokes, -A; Corteyn, -A.H.; Murray, -P.K.: Clinical signs and humoral immune response in horses following equine herpesvirus type-1 infection and their susceptibility to equine herpesvirus type-4 challenge. Research in veterinary science., 51:2, 141-148, 1991.

(32) Straw, -B: Abortion due to equine rhinopneumonitis, Veterinary review, vol. 7, 1986.

(33) Wintzer, -H.J. y cols: Enfermedades del equino, Editorial Hemisferio Sur S.A. 1a. Edicion, Argentina, 1985.

(34) Virus isolation procedure, Veterinary Diagnostic Laboratory, California Davis University, August 1992.