



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Diagnóstico da Anemia Infeciosa Equina: análise  
comparativa de sistemas comerciais de diagnóstico por  
imunodifusão**

**ANTONIA REGINA SESSA DA SILVA**

**Seropédica, RJ**  
**Março de 2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
VETERINÁRIA**

**Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina: análise  
comparativa de sistemas comerciais de diagnóstico por  
imunodifusão**

**ANTONIA REGINA SESSA DA SILVA**

*Sob orientação do professor*  
**Dr. CARLOS MAZUR**  
*e Co-orientação da professora*  
**Dra. MARIA DAS GRAÇAS DANELLI**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências** em  
Microbiologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Março de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
VETERINÁRIA**

**ANTONIA REGINA SESSA DA SILVA**

**Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de *Mestre em Ciências* no curso de pós-graduação em Microbiologia Veterinária.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Dr. Ana Maria Jansen, Ph. D, IOC-FIOCRUZ

---

Dr. Francisco Benedito Rangel Filho, Ph. D, UFRRJ

---

Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, UFMG.

## *Dedicatória*

*A Deus,*

*Pelo infinito amor de Paí.*

*Pelo motivo e razão de nossa existência.*

*Pela compreensão de nossa pequenez.*

*Venho neste momento, agradecê-lo pela oportunidade recebida, e  
Oferecer esta conquista, que do alto me foi concedida, fruto de meu  
Trabalho e recompensa D'aquele que iluminou todos os passos desta  
Vitória, lembrando sempre, de todos que contribuíram e permitiram  
A concretização de mais uma fase da minha vida.*

*Muito Obrigado Paí...*

## *Dedicatória*

*Ao meu filho Celso Júnior,  
Cujá pureza e clareza de pensamentos  
A mim revitaliza a todos os instantes,  
Enfim,  
Por ser a razão de todos os meus ideais...  
Por ser a razão do meu viver...*

*Aos meus pais, Ivanildo e Elisa (in memoriam)*

*Por permitirem a minha existência na plenitude de seu lar,  
Que com muito amor, dedicação e esforço,  
Ensínaram-me a amar ao próximo e os valores morais,  
Que sem os quais, sei que não estaria aqui hoje,  
Os retribuo com este momento especial de minha vida.*

*Ao meu esposo Celso Gomes  
Com quem compartilho desta vitória, árdua  
e conflitante, que hoje consigo vencer...*

*A minha sogra Maria do Perpetuo Socorro Gomes e todos os  
familiares, que por menor que tenha sido a ajuda nesta  
jornada, hoje consigo nestas linhas expressar um pouco do  
meu carinho.*

*Aos meus irmãos,  
Ivanildo, Paulo, Graziela, Elis, Antonio, Cristina, e João,  
Estes e outros que durante as minhas existências*

*Puderam comigo conviver e sobre tudo me ensinar a  
respeitar as diferenças de nossos pensamentos e ideais...  
Obrigado pela oportunidade...*

### *Dedicatoria Especial "in memoriam"*

*A minha querida avó Antonia,  
que, da qual não só herdei o nome,  
mas todos os ensinamentos milenares.  
Como também a minha querida mãe LISETTA,  
Que apesar da breve jornada entre nós  
Foram ambos os exemplos de dedicação e amor;  
Ensinando-me a cada dia a trilhar  
os caminhos da fé, da esperança e do amor ao próximo,  
do desprendimento dos bens materiais  
e mais importante ainda, lembrando-me sempre de suas  
palavras, que o passado nós não poderíamos mudar,  
o hoje, poderá ser melhor que ontem  
e o amanhã, melhor ainda poderá ser.  
Ofereço esta vitória em sinal de respeito e carinho.*

*Ao meu Irmão Francisco Carlos,  
Que sempre me apoiou e sinto apoiar  
Com seu sorriso infantil e singelo....  
Suas palavras de harmonia ....*

*Seu olhar confortante...*

*Muitas saudades .....*

*A todos os meus amigos que se foram,*

*Desta e de outras existências....*

*Obrigado....*

*Um dia nos encontraremos....*

*E quem sabe compartilharemos*

*A mesma alegria....*

## Agradecimentos

Aos meus Orientadores

Prof. Dr. Carlos Mazur

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria das Graças Miranda Danelli.

Pela valorosa orientação, amizade, disponibilidade, oportunidade e imprescindível colaboração para a concretização deste trabalho, contribuindo inestimavelmente para a minha formação e enriquecimento científico e moral, permitindo não só a realização de um sonho, mas a certeza do início de uma nova e árdua meta profissional a cumprir.

Todo o meu respeito, admiração e amizade



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Sieberth do Nascimento Brito, pelo incentivo, calma e inesgotável boa vontade.

À equipe do Laboratório de Vírus Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

À equipe do Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, em especial aos Professores Rômulo Cerqueira e Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, a Doutoranda Elizangela Maiara dos Santos, a bolsista de Iniciação científica Fernanda Gonçalves de Oliveira.

À amiga Fiscal Federal Agropecuário, Dra. Georgina Lages pelo carinho e incentivo.

Aos Laboratórios Bruch do Brasil e Idexx pela doação dos *kits*.

Aos membros da Delegacia Federal de Agricultura no Rio de Janeiro em especial aos coordenadores do Serviço de Sanidade Animal, aos Fiscais Federais Agropecuários Dr. Everardo Duarte Machado – Coordenador da CECAIE- RJ e ao Dr. Luis Carlos – PSA – Seropédica.

A toda equipe do Laboratório de Virologia do LANAGRO/MG, em especial aos Drs. Áladio Lopes de Jesus (“O Despertar das Ilusões”), Anapolino Macedo de Oliveira e ao colega Anselmo Rivetti.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, Instituto de Veterinária da UFRuralRJ e colegas de turma pelo apoio e amizade.

Aos Professores Dra. Gloria Maria Direito e Francisco de Assis Baroni pela imensa boa vontade, carinho e incentivo.

Aos funcionários do DPPG da UFRRJ em especial a atenção e carinho da Decano de Pesquisa e Pós-Graduação Professora Áurea Echevarria.

À responsável técnica pelo Laboratório de AIE da PESAGRO – RJ, Dra. Jane Garcia Pinheiro; Dr. Eduardo Gonçalves A. Batista, responsável técnico pelo Laboratório de AIE da FUNDENOR – Campos; a Dra. Bianca Eloísa J. Barbosa, responsável técnico pelo LAVET – Laboratório Vet (Três Rios) e ao Dr. André Vianna Martins, responsável técnico pelo Laboratório do Posto de Fomento de Teresópolis, pelo fornecimento dos soros.

A CAPES pelo financiamento deste experimento.

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	4
2.1. A Eqüinocultura no Brasil	4
2.2. A Anemia Infecciosa Eqüina.	5
2.3. O Vírus da AIE	7
2.4. Epidemiologia	8
2.4.1. Transmissão	11
2.5. A AIE no Brasil	12
2.6. Aspectos legais do Diagnóstico da AIE	13
2.7. O Diagnóstico laboratorial da AIE	15
2.7.1. A Prova de Coggins	18
2.7.2. Prova de ELISA	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
3.1. Soros de eqüídeos	20
3.2.2. Sistemas comerciais de diagnóstico da AIE ( <i>kits</i> )	20
3.3. Imunodifusão em ágar gel (IDGA)	21
3.4. A Prova de ELISA	22
<b>3.5. ANÁLISES DA REPRODUTIBILIDADE</b>	23
3.5.1. Experimento 1.	23
3.5.2. Experimento 2.	23
3.5.3. Experimento 3.	24
3.6. Análises comparativas da visibilidade das linhas de precipitação	24
3.6.1. Análise da identificação dos <i>kits</i>	24
3.6.2. Caracterização da visibilidade das linhas de precipitação	24
3.8. Titulação dos antígenos A, B e C.	25

<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Prova de ELISA	25
4.2. Análises da reprodutibilidade	25
4.2.1. Experimento 1.	25
4.2.2. Experimento 2.	25
4.2.3. Experimento 3.	26
4.3. Análises comparativas da visibilidade das linhas de precipitação .	26
4.3.1 Análise da identificação do <i>kit</i>	26
4.3.2. Análise da visibilidade das linhas de precipitação	26
4.4. Detecção de reações inespecíficas	26
4.5. Titulação dos antígenos A, B e C	27
<b>5. DISCUSSÃO</b>	43
<b>6. CONCLUSÕES</b>	48
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b>	49
Anexo 1	64

## Lista de Abreviaturas

$\mu\text{L}$  – microlitros  
ABCCM – Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga  
ABCCMM- Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador  
AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*  
AIE – Anemia infecciosa eqüina  
AM – Amazonas  
CECAIE – Comissão Estadual de Controle da AIE  
CNAIE – Comissão Nacional de Anemia Infecciosa Eqüina  
CNC- Comissão Nacional do Cavalo  
CRMV-RJ – Conselho Regional de Medicina Veterinária – Rio de Janeiro  
DDSA - Divisão de Defesa Sanitária Animal  
DER – Departamento de Estradas e Rodagem  
DOU – Diário Oficial da União  
EIAV – *Equine infectious anemia virus*  
ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*  
FAIDS- feline acquired immunodeficiency syndrome  
FCD – fixação de complemento direta  
FCI – fixação de complemento indireta  
FIV – Vírus da imunodeficiência felina  
Gp45- glicoproteína 45  
Gp90 – glicoproteína 90  
GTA – guia de trânsito animal  
HI- inibição da hemaglutinação  
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IDGA – imunodifusão em gel de Agar  
IF- imunofluorescência  
IgG – imunoglobulina G  
LDAIE – Laboratório de Diagnóstico da Anemia Infecciosa Eqüina  
LVV – Laboratório de Virologia Veterinária  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
mg/mL – miligrama por mililitro  
mL – mililitro  
mm – milímetro  
mM – milimolar  
MS – Mato Grosso do Sul  
MT – Mato Grosso  
nm – nanômetros  
OIE - Office International des Epizooties  
OPD – ortofenilenodiamino  
p26 - Proteína 26  
PBS - Solução Salina Tamponada (phosphate buffered saline)  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (polimerase chain reaction)  
PIB - Produto Interno Bruto  
PSI – Puro Sangue Inglês  
RETROLAB – Laboratório de Retrovírus  
rgp90 - proteína gp90 recombinante  
RNA – ácido ribonucléico  
SIV - Vírus da Imunodeficiência dos Símios  
SN – Soro Neutralização  
VAIE – Vírus da Anemia Infecciosa Eqüina  
VCAE – Vírus da artrite encefalite caprina

## RESUMO

O Brasil possui atualmente o segundo maior rebanho de eqüídeos do mundo e a Eqüideocultura Brasileira desempenha um importante papel no desenvolvimento do setor de agronegócios. Entre as doenças infecciosas que afetam a eqüinocultura nacional, a Anemia Infecciosa dos Eqüinos (AIE) tem se mostrado de difícil controle. A AIE é causada por um retrovírus, apresenta uma distribuição mundial, e é reconhecida como a mais importante doença dos eqüinos. Entre os sinais clínicos mais comuns, na fase aguda da doença, encontram-se a anemia seguida de icterícia nas mucosas, edema ventral, mioglobínúria, caquexia e, principalmente, febre intermitente. Como não há tratamento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina, através de mecanismo legais, uma política de exame obrigatório em laboratórios credenciados, para o transporte e comercialização de eqüídeos no País. O exame é baseado na prova de Coggins, uma imunodifusão em ágar gel do soro do animal testado contra antígeno do vírus da AIE. Como a infecção é vitalícia, animais soropositivos são eutanasiados por Médicos Veterinários do MAPA. Considerando que a precisão dos resultados é crítica, posto que animais falso positivos podem ser sacrificados inutilmente, e falso negativos preservados como fonte de infecção, surgiu o interesse de um análise sistemática da reprodutibilidade dos *kits* e possíveis fontes de erro no diagnóstico. Para esta finalidade, soros positivos e negativos, referenciados pela repetição dos testes de Coggins e ELISA, foram avaliados pela prova de IDGA, comparativamente com três *kits* de diferentes fabricantes. Nos experimentos de reprodutibilidade, observou-se uma grande distinção na qualidade da linha de precipitação promovida pelos soros positivos nos testes nos diferentes *kits*. Este fenômeno pode ser justificado pela utilização das condições técnicas legais, determinadas por portaria do MAPA, que são distintas das recomendações dos fabricantes de dois dos *kits* analisados. Mesmo assim, a avaliação da reprodutibilidade dos resultados dos *kits* com os soros referenciados mostrou elevada correlação.

**Palavras chave:** anemia infecciosa eqüina, eqüinos, eqüídeos, lentivirus, retrovirus, diagnóstico e IDGA.

## ABSTRACT

Brazil has currently the second biggest flock of equines of the world and the Brazilian equine breeding plays an important role in the development of the sector of agribusiness. Among the infectious diseases that affect the national equine breeding, the Equine Infectious Anemia (EIAV) has been shown to be difficult to control. The Equine Infectious Anemia is caused by a retrovirus, it has a worldwide distribution, and it is recognized as the most important disease of equines. The most common clinical signals in the acute phase, are anemia followed by jaundice in the mucosae, ventral oedema, myoglobinuria, cachexia and, mainly, intermittent fever. Once it has no treatment, the Ministry of Agriculture, Cattle and Supplying determines, through legal mechanisms, a policy of obligatory examination in accredited laboratories, for the transport and commercialization of equines in the country. The examination is based on the test of Coggins, an immunodiffusion in agar gel (IDGA) of the serum of the animal tested against the antigen of the EIAV. As the infection is lifetime, positive animals are euthanized by Veterinarians of the Ministry of Agriculture. Considering that the precision of the results is critical, since false positive animals could be uselessly sacrificed, and false negatives will be preserved as infection sources, diverse problems may occur, there is interest in a systematic analysis of the reproducibility of kits and on possible sources of error. For this purpose, positive and negative sera, referred to by the repetition of the tests for Coggins and ELISA, were evaluated by IDGA comparatively with three kits of different manufacturers. In the experiments of reproducibility, it was observed a great distinction in the quality of the precipitation line promoted for the positive sera in the tests. This phenomenon may be justified by the use of the conditions techniques legal, determined for would carry of the Ministry of Agriculture that is distinct of the recommendation of the analyzed manufacturers of two of kits. Exactly thus, the evaluation of the reproducibility of the results of kits with the referred sera showed high correlation.

Key words: Equine infectious anemia , equines, lentivirus, retrovirus, AGID.

## LISTA DE QUADROS

		<b>Página</b>
<b>Quadro 1</b>	Relação de animais testados para AIE de 1974 a 2004	10
<b>Quadro 2</b>	Comparação entre os vários testes sorológicos em Anemia Infeciosa Equina	17

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Porcentagem de soros positivos e negativos nos testes de IDGA e ELISA	25
<b>Tabela 2</b>	Reprodutibilidade das leituras de 90 soros positivos feita pelos técnicos, com o uso dos diferentes <i>kits</i> .	25

## **1. INTRODUÇÃO**

---

O Brasil possui atualmente o segundo maior rebanho de eqüídeos do mundo, com diversas raças nacionais como a Mangalarga, a Mangalarga Marchador, a Campolina, o Pantaneiro e o Pampa (em formação), entre outras. A Eqüideocultura Brasileira desempenha um importante papel no desenvolvimento do setor de agronegócios. Cerca de um milhão e meio de pessoas estão registradas em associações eqüestres, representando cerca de 700 mil empregos diretos e indiretos (Censo IBGE - 2002). O aquecimento da indústria eqüestre se traduziu em um crescimento médio de 8%, nos últimos dez anos, acima do desenvolvimento do PIB brasileiro, no período. Diante desses números expressivos, em 1979, foi criada a Comissão Nacional do Cavalo (CNC), com o intuito de reunir as associações de criadores de todo o País, e com isso promover uma política que valorize cada vez mais este importante segmento.

Atualmente, o mercado brasileiro do cavalo vem sendo analisado com interesse crescente. A atração que estes animais exercem movimentou a indústria do setor, ligada inclusive às suas necessidades inerentes como equipamentos, medicamentos, suplementos alimentares e recursos humanos no manejo das criações. O cavalo hoje não é só considerado um animal de serviço, para muitos hoje é fonte de renda e até mesmo de terapia. Na última década houve um crescimento em todos os segmentos, desde insumos, até a própria valorização dos animais e o volume de eventos eqüestres realizados (<http://www.crmvrj.com.br/editorial/II/2004>).

A rápida evolução da importância sócio-econômica da Eqüideocultura Brasileira aumentou o interesse e o investimento em Medicina Eqüina e em suas principais doenças. A Anemia Infecciosa dos Eqüinos (AIE) é reconhecida como a mais importante doença dos eqüinos e apresenta uma distribuição mundial. A AIE é uma doença viral crônica, cosmopolita, que acomete eqüídeos de todas as idades. O vírus da AIE (VAIE) se replica em macrófagos, monócitos e, após sua multiplicação na porta de entrada, desenvolve uma viremia associada a células, que leva a generalização da infecção (OAKS et al., 1998). Entre os sinais clínicos mais comuns, na fase aguda da doença, encontram-se a anemia seguida de icterícia nas mucosas, edema ventral, mioglobinúria, caquexia e, principalmente, febre intermitente (LEROUX et al., 2004).

A Comissão Nacional de Anemia Infecciosa Eqüina (CNAIE) foi criada em 1979, no Brasil, visando o combate à AIE, que representa sérias implicações produtivas, comerciais e políticas, como perda de peso e morte dos animais, prejuízo na capacidade de trabalho, diminuição do valor de mercado dos animais.

Preocupado com a disseminação desta virose, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu uma política de controle através de Portaria, normatizando diversos aspectos do diagnóstico e controle da AIE. A Portaria Ministerial nº 71 de 11/03/74 determina o diagnóstico laboratorial através da prova de Coggins, detalhando seus aspectos técnicos, normas para credenciamento de técnicos e laboratórios. Basicamente, a prova de Coggins é uma imunodifusão dupla entre o antígeno do VAIE e os soros dos animais testados. O exame passou a ser obrigatório para transporte e comercialização de eqüídeos em todo País e animais positivos devem ser sacrificados por veterinários do MAPA (MAPA – BDSA -1974)

Os eqüídeocultores do Estado do Rio de Janeiro contam, atualmente, com 29 laboratórios credenciados para realização do diagnóstico da AIE, sendo que deste total apenas cinco são ligados a órgãos oficiais. Devido ao aumento da importância econômica dos eqüídeos, a grande maioria dos laboratórios é particular, que estão distribuídos por diversas regiões do Estado. Na década de 70, apenas o laboratório do Jóquei Club do Rio de Janeiro realizava este exame (MAPA – BDSA -1974).

O Laboratório de Diagnóstico da Anemia Infecciosa Eqüina do Instituto de Veterinária da UFRRJ (LDAIE/UFRRJ) iniciou suas atividades em 1987. Em 1999, a Universidade firmou um convênio com o Departamento de Estradas de Rodagem (DER) e a Concessionária Nova Dutra, com o objetivo de viabilizar a apreensão de animais (eqüídeos e bovinos) abandonados às margens das rodovias federais. O convênio estabeleceu que os animais recolhidos pelo DER seriam encaminhados ao Curral de Apreensão da UFRRJ, para um posterior resgate por seus proprietários. A liberação dos eqüídeos ficou vinculada à realização de prova de IDGA, realizada no LDAIE/UFRRJ. Animais soronegativos foram liberados para o resgate, enquanto os soropositivos foram sacrificados, segundo normas do MAPA. Desde então, cerca de 11000 animais tiveram seus soros examinados pela prova de Coggins nas suas instalações.

Durante o período de atuação do LDAIE/UFRRJ, ocasionalmente, foram observados problemas na interpretação dos resultados da prova de IDGA (Coggins), essencialmente, dificuldades na observação correta (leitura) da linha de precipitação do complexo antígeno-anticorpo. Através de contatos pessoais com outros veterinários credenciados, também foram assinalados problemas como reações inespecíficas, linhas duplas ou fracas e diferenças na formação das linhas de precipitação entre *kits* de fabricantes distintos. Além destes aspectos, os representantes comerciais nacionais oferecem produtos oriundos de importação, por vezes, com tecnologias distintas de produção dos reagentes dos sistemas comerciais (*kits*) de diagnóstico. Tais fatores

podem interferir na precisão do diagnóstico com consequências significativas para o controle da AIE e questões bioéticas.

Como objetivo, dentro deste contexto, este trabalho pretendeu avaliar os vários *kits* comercializados no País, promovendo um estudo comparativo, de acordo com as normas técnicas preconizadas pelo MAPA para a prova de Coggins. Especificamente, a análise foi baseada na observação da reprodutibilidade das leituras dos três técnicos credenciados do LDAIE-UFRRJ, em relação a soros com leituras referenciadas, considerando também a visibilidade das linhas de precipitação obtidas pelo uso sistemas comerciais, visando determinar a melhor relação custo benefício, por animal testado.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

### **2.1. A Equideocultura no Brasil**

Os primeiros cavalos do Brasil (*Equus caballus*) foram introduzidos no País no século XVI, pelos colonizadores portugueses. Derivados das quatro raças então existentes na Península Ibérica (Marismenho, Garrano, Andaluz e Berbere), os cavalos foram levados, inicialmente, para Pernambuco e depois Bahia e São Paulo. Do Nordeste, os eqüinos se disseminaram a partir de Pernambuco e Bahia, acompanhando o gado, margeando o Rio São Francisco (COSTA, 2002).

Posteriormente, a descoberta de ouro e diamantes trouxe grande afluência de pessoas e destes animais para Minas Gerais. No sul do País, a venda de animais tornou-se próspera e crescente. Imensas tropas, constituídas de cavalos, jumentos (*Equus asinus*) e muares foram direcionadas para venda aos mineradores e contratadores do ouro (COSTA, 2002). Tais animais não apresentavam nenhum tipo de padronização, a preocupação era apenas funcional e aqueles que não se prestavam para sela eram de imediato destinados à carga. Somente em 1934, foi fundada a primeira associação de criadores reconhecidamente brasileira, a Associação do Mangalarga, que deu origem a primeira raça tipicamente nacional, reconhecida pelo Ministério da Agricultura (<<http://www.abccmm.gov.br/historia>>).

O controle da AIE é baseado em estratégias inflexíveis, aplicadas a extensas regiões geográficas, sem levar em consideração as características que diferenciam a ocorrência da enfermidade em ecossistemas distintos. Estes programas, que normalmente exigem mobilização de vultuosos recursos econômicos e humanos, nem sempre resultam em solução ou alterações significativas do problema. Desta forma, programas sanitários de combate às enfermidades devem se fundamentar não mais em modelos funcionais agente-infecção-enfermidade-imunidade, mas em estudos regionais cujo enfoque social determine tratamento diferenciado, conforme suas características regionais de ocorrência. Porém, para que este programa seja executado com êxito, deverá haver uma enorme interação não somente de órgãos oficiais, veterinários de campo, criadores e principalmente daqueles que dependem destes animais como fonte de trabalho e renda (BEVILACQUA, 1993).

## **2.2. A Anemia Infecciosa Equina.**

A AIE é uma doença viral crônica, cosmopolita, que acomete eqüídeos de todas as idades. O vírus da Anemia infecciosa Equina (VAIE) replica-se em monócitos e macrófagos, após sua multiplicação desenvolve uma viremia associada a células, que leva a generalização da infecção (OAKS et al., 1998). Entre os sinais clínicos mais comuns, na fase aguda da doença, encontram-se a anemia seguida de icterícia nas mucosas, edema ventral, mioglobínúria, caquexia e, principalmente, febre intermitente (LEROUX et al., 2004).

A AIE apresenta, clinicamente, as formas aguda, subaguda crônica e inaparente ou assintomática (ISSEL & COGGINS, 1979). Na infecção persistente, o curso crônico e os freqüentes ataques febris sugeriram aos primeiros pesquisadores uma ausência ou comprometimento da resposta imune, no entanto, vários testes demonstraram a presença de anticorpos para o VAIE e também da resposta imune mediada por células (REIS, 1984). Vários estudos estão sendo feitos visando um melhor entendimento sobre imunidade celular e humoral induzida em animais infectados com o VAIE, que dependem da replicação nos macrófagos tissulares e da liberação dos virions na circulação (HAMMOND et al., 2000)

A infecção é vitalícia, apesar dos animais acometidos apresentarem uma forte resposta imune. A persistência da infecção pode ser compreendida em função da inserção do material genético no genoma de células hospedeiras (integração). Alguns animais morrem durante a fase aguda ou crônica da doença. Nos sobreviventes, os episódios de doença tornam-se menos freqüentes e intensos e, depois de um ano, o animal entra no estágio de portador assintomático (SELLON et al., 1996c; COOK et al., 2001; LEROUX et al., 2004).

As infecções pelo VAIE resultam em altos títulos virêmicos dentro de três semanas após a infecção. Várias evidências sugerem que as respostas celulares e humorais específicas são necessárias para o término da viremia inicial e a replicação viral é reduzida a níveis baixos, em animais que evoluem do estágio crônico para portador inaparente.

A importância da resposta imune no controle da AIE foi demonstrada por imunossupressão experimental em animais assintomáticos, que levou ao aparecimento dos episódios da doença várias décadas, após a infecção (KONO et al., 1976). Diversos estudos sugerem que durante o curso da infecção, o hospedeiro desenvolve uma

resposta imune efetiva e duradoura, capaz de manter a replicação viral abaixo do limiar para a indução da doença (HAMMOND et al., 2000).

O desaparecimento da viremia inicial plasmática coincide com a emergência de linfócitos T citotóxicos (CD8+) e anticorpos não neutralizantes, específicos para o VAIE (McGUIRE et al., 1994; PERRYMAN et al., 1988).

Animais infectados pelo VAIE desenvolvem anticorpos para as glicoproteínas de superfície (gp90) e transmembrana (gp45), e a principal proteína do core viral, a p26. Apesar de ser a proteína viral majoritária, a resposta humoral para a p26 é de 10 a 100 vezes menor do que para a gp90 e gp45 (HAMMOND et al., 2000).

Como previamente descrito para HIV e SIV (*simian immunodeficiency virus*), a evolução do gene *env* favorece o VAIE no escape dos linfócitos T citotóxicos e dos anticorpos específicos (MEALEY et al., 2003; CARPENTER et al., 1987). Os anticorpos neutralizantes capazes de bloquear o estrato infectante, usualmente emergem somente depois de 2 a 3 meses pós-infecção, sugerindo que não são responsáveis pelo término do episódio agudo inicial. Estudos sobre o VAIE indicam que o papel dos anticorpos neutralizantes na infecção ainda é incerto. Apesar disso, a recrudescência da doença está associada com a emergência de variantes que escapam dos anticorpos neutralizantes, sugerindo que a resposta neutralizante é eficiente no controle da replicação das variantes virais (LEROUX et al., 1997; LEROUX et al., 2001; MONTELARO et al., 1984; KONO et al., 1969; 1976)

Estudos detalhados de resposta humoral na evolução de estágio crônico para portador inaparente descreveram uma evolução gradual durante os primeiros dez meses após a infecção. Durante este período, anticorpos específicos para o VAIE sofrem maturação de especificidade e avidéz, talvez por mudanças conformacionais que contribuem para a manutenção da AIE na fase assintomática (HAMMOND et al., 2000).

As lesões anatomopatológicas causadas pelo VAIE são variáveis, dependendo do estágio clínico da doença. As lesões associadas a quadros de infecção ativa incluem linfadenopatia generalizada, hepato-esplenomegalia, anemia, sufusões e edema. As lesões microscópicas mais comuns incluem a lipidose hepática, necrose hepatocelular, hemossiderose e infiltrado linfocitário perivascular na maioria dos tecidos. A necrópsia de cavalos no estágio assintomático da doença geralmente é inconclusiva (LEROUX et al., 2004).

Não há tratamento ou vacinas disponíveis, atualmente. Recentemente, uma pesquisa avaliando a eficácia de uma vacina, produzida a partir da utilização de vírus atenuados, foi reportada (CRAIGO et al., 2002).

### 2.3. O Vírus da AIE

O VAIE, membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, afeta todos os membros da família *Equidae* e está distribuído mundialmente (ISSEL & COGGINS, 1979, CLABOUGH, 1990; COOK et al., 2001). Seu virion, com 80 a 100 nm, é envelopado e apresenta um capsídeo icosaédrico envolvendo um nucleocapsídeo helicoidal com duas fitas de RNA linear, de sentido positivo (FENNER et al., 1993; SUGIURA & NAKAGIMA, 1986; LEROUX et al., 2004). Sua replicação durante os episódios febris ocorre, predominantemente, nos macrófagos teciduais, principalmente do baço, fígado, linfonodos, pulmões, rins e na glândula adrenal. No processo infeccioso, a viremia e a subsequente disseminação viral por todo o organismo animal dependem da replicação nos macrófagos tissulares e da liberação dos virions na circulação. Os altos títulos de viremia estão associados com os sinais clínicos mais característicos da doença tais como febre, depressão e trombocitopenia (SELLON et al., 1994; SANTOS, 2006).

O VAIE é sorologicamente relacionado com outros lentivírus, incluindo os Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (VCAE), Maedi/Visna dos Ovinos, da Imunodeficiência Felina (FIV), Imunodeficiência de macacos (SIV) Imunodeficiência humana (HIV) (FENNER et al., 1993, SUGIURA & NAKAGIMA, 1986). Ao longo dos anos, o VAIE tem tido um papel especialmente importante em patologia comparada e em estudos recentes sobre a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEROUX et al., 2004).

O VAIE é único entre os lentivírus, considerando-se que a resposta febril aguda, associada à viremia, é seguida de ciclo recorrentes da doença e, nos sobreviventes, por um período assintomático posterior (MONTELARO et al., 1984; COOK et al., 2001). O papel da variabilidade genética dos lentivírus no desenvolvimento da doença não está claramente estabelecido. Enquanto infecções como a do HIV e outros lentivírus, geralmente, resultam em doenças progressivas e longas, a rápida progressão da infecção por VAIE, em alguns casos, constitui um modelo único no qual podemos analisar a ligação entre a variação genética e o desenvolvimento dos sintomas clínicos (LEROUX et al., 1997; ZHANG et al., 1993, SANTOS, 2006).

As propriedades antigênicas do VAIE dependem de numerosos grupos de antígenos com propriedades diferenciadas. As proteínas internas p26 e p15 induzem a formação de anticorpos detectáveis pelas técnicas de fixação de complemento,

imunofluorescência e imunodifusão. Estas proteínas são estáveis e são os antígenos utilizados nos testes diagnósticos. Já as glicoproteínas gp45 e gp90 intervêm na reação de neutralização viral e são utilizadas nas provas de ELISA (TOMA et al., 1980).

Durante a fase crônica ou assintomática, a viremia normalmente não pode ser detectada, através de métodos convencionais de isolamento viral. Entretanto, animais assintomáticos podem ser identificados, usando-se técnicas mais sensíveis, como a PCR, para detectar a presença de ácidos nucléicos virais no sangue e nos tecidos (LANGEMEIER et al., 1996; OAKS et al., 1998; HARROLD et al., 2000), ou pela utilização de testes sorológicos (ISSEL & COGGINS, 1979; MATSUSHITA et al., 1989, SANTOS, 2006).

## **2.4. Epidemiologia**

De acordo com a Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, o Estado Mato Grosso foi a Unidade Federativa que apresentou maior número de focos de AIE nos últimos anos. Foi estimado mais de 50% do rebanho do Pantanal esteja infectado e que desse total, 90% seriam animais de serviço (EMBRAPA, 2004).

O quadro 1., abaixo, apresenta a evolução dos esforços de identificação de animais positivos pela prova de Coggins, de 1986 a 2004.

A AIE, no Brasil, se apresenta sob duas formas: a que ocorre no âmbito das entidades hípicas e a que ocorre no campo. A primeira, com já demonstrado, é perfeitamente controlável, dada à facilidade de acesso ao diagnóstico laboratorial, manejo adequado dos animais e descarte dos positivos; a segunda, em virtude de características do meio, sócio-econômicas e políticas, é extremamente difícil de ser controlada de forma eficiente. Outro fato interessante em observação é que animais de jôqueis clubes e hípicas foram os prováveis responsáveis pela disseminação da AIE no campo (CESAR, 1982)

A primeira forma da AIE no Brasil ocorreu no âmbito das entidades hípicas fechadas. Os estudos da época demonstraram uma prevalência elevada no início do período para a raça puro sangue inglês (PSI) em Jôquei Clubs e Sociedades Hípicas, principalmente entre 1973 e 1976. Devido à facilidade de controle da doença nestes locais, o surto foi rapidamente erradicado nos animais PSI e, conseqüentemente a doença praticamente desapareceu destas entidades, que hoje recebem, em sua maioria, o status de entidades controladas. Quanto à segunda forma, a doença no campo, a AIE estaria disseminada em outras raças e em animais mestiços localizados em fazendas de criação (DUPONT et al., 1968).

A AIE vem se mantendo no campo ao contrário do que ocorreu nas entidades hípicas, influenciando o manejo, uma vez que os animais de raça são criados sob melhores condições e têm como finalidade a reprodução ou exposição, pois em geral possuem valor zootécnico elevado. Os equídeos destinados ao serviço, geralmente mestiços devido ao sistema de criação, são freqüentemente submetidos a estresse e a todos os tipos possíveis de veiculação e exposição ao VAIE. Nestes animais, a doença é extremamente difícil de ser controlada eficientemente. Os animais mestiços, que são extremamente importantes nas atividades econômicas do homem do campo, dependendo da região do Estado, têm importância vital, como única forma de transporte e renda (BELIVACQUA, 1993).

Várias dificuldades impediram até hoje a adoção rigorosa das estratégias de controle estabelecidas pela CNCAIE. Segundo a legislação brasileira, os animais positivos devem ser sacrificados sem qualquer indenização. O transporte interestadual de equídeos é problemático, a identificação exata do animal, na maioria das vezes é falha. O cumprimento da legislação é aceitável entre os criadores e treinadores de animais de raça e competição. Entretanto, animais de menor valor continuamente são transportados ou vendidos sem procedimentos de controle a AIE e outras doenças. Nestes grupos encontramos, com freqüência, uma grande quantidade de animais infectados, dificuldade relatada em vários países das Américas (CAMPBELL & NUSBAUM, 1991). Desta forma, animais de serviço dificilmente são sacrificados e atuam como fontes de infecção no campo (BELIVACQUA, 1993).

Com a falta de vacinas eficazes, o controle da AIE nos equídeos se faz com a identificação, segregação ou sacrifício dos animais infectados. Somente em países como China e Cuba tem sido executado um programa de vacinação usando amostras atenuadas do VAIE, que parece proteger os animais apenas contra variantes homólogas do vírus (MONTELARO et al., 1993). Outros programas de vacinação estão sendo desenvolvidos, porém sem o respaldo da comunidade científica. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra lentivírus, como VAIE, HIV-1 e HIV2, é o principal desafio deste século (LEROUX et al., 2004).

Em regiões como o Pantanal Brasileiro, com alta prevalência da doença, o sacrifício de todos os animais positivos comprometeria significativamente ou mesmo inviabilizaria a pecuária extensiva, que é a principal atividade econômica na região. Uma alternativa de controle da AIE, baseada na segregação dos animais positivos, tem sido adotada em alguns países como nos EUA e proposta como estratégia prática de prevenção e controle para a região do Pantanal (SILVA et al., 2001).

Quadro 1. Relação de animais testados para AIE de 1974 a 2004

ANO	FOCOS	ANIMAIS TESTADOS	POSITIVOS	%
1974	34	28.653	333	1,16
1975	146	46.241	1.527	3,30
1976	272	42.257	2.697	6,38
1977	336	76.058	3.499	4,60
1978	330	96.503	2.795	2,89
1979	479	104.508	3.567	3,41
1980	1.058	171.433	7.365	4,30
1981	844	141.510	4.636	3,28
1982	882	155.787	3.895	2,50
1983	863	167.746	3.577	2,13
1984	962	199.751	4.390	2,20
1985	1320	214.860	5.606	2,61
1986	2.206	314.531	8.845	2,81
1987	2.033	289.870	7.176	2,48
1988	1703	264.462	6.101	2,31
1989	2.153	309.494	7.656	2,47
1990	1.969	270.088	6.032	2,23
1991	1.963	312.747	5.274	1,69
1992	1.482	252.637	4.141	1,63
1993	1.669	238.198	4.055	1,70
1994	1.633	145.880	3.799	2,60
1995	1.562	178.813	4.145	2,32
1996	1.471	186.583	4.322	2,32
1997	1.592	137.226	4.476	3,26
1998	1.621	131.991	3.689	2,79
1999	1.841	156.152	4.037	2,59
2000	1.964	235.739	4.446	1,89
2001	2.334	200.854	4.243	2,11
2002	2.299	220652	3.892	1,76
2003	3.616	340.928	7.513	2,20
2004	3.135	310.346	7.865	2,53

Fonte: MAPA (4° Seminário para Habilitação de Médicos Veterinários para o Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina – 2006 p. 23 - 24).

Almeida e colaboradores (2006), em recente estudo sobre a prevalência da AIE em equídeos de serviço no Estado de Minas Gerais, considerando uma amostragem de 6540 soros oriundos de todas as regiões do estado, após análise realizadas pelas provas de IDGA e ELISA, obtiveram uma prevalência 3,1% para animais, levando a concluir que o Estado de Minas Gerais é uma área endêmica para AIE.

#### 2.4.1. Transmissão

A transmissão horizontal da AIE ocorre, principalmente, quando animais portadores quando apresentam picos de viremia neste momento a transmissão pode ocorrer por contato sexual ou indireto (FERRAZ, 1990). Contudo, o VAIE é transmitido entre animais infectados e não infectados, principalmente, pela transferência mecânica de sangue. Este processo ocorre comumente durante a alimentação interrompida de insetos hematófagos, especialmente tabanídeos, e por moscas dos estábulos (*Stomoxys sp*) e também por alguns culicídeos (GREENBERG, 1973; LEROUX et al., 2004).

Biberstein & Yan, 1994, relataram um caso de transmissão de AIE que ocorreu no momento da cópula, de uma fêmea soropositiva com um macho soronegativo com lesão no pênis, que favoreceu a infecção. Biberstein & Yan, 1994 citam ainda que em potros nascidos soronegativos poderiam se infectar pelo leite das mães positivas (KNOWLES 1975; BLOOD & RADOSTITS, 1991.).

Um dos principais veículos de transmissão do VAIE são os tabanídeos que foram amplamente investigados (ISSEL & COGGINS, 1979; FOILD et al., (1983); ISSEL et al., 1988; LEROUX et al., 2004). Mais recentemente, Barros, 2001, descreveu a sazonalidade e a abundância tanto de tabanídeos, como de outras moscas no Brasil, principalmente, no Pantanal Mato-grossense (EMBRAPA – 1993).

Segundo Shen e colaboradores (1972), os principais meios de transmissão da AIE são instrumentos infectados, transmissão congênita e por picadas de moscas hematófagas, atribuindo ao homem a principal fonte de infecção da doença em sua forma iatrogênica.

O VAIE no aparelho bucal dos tabanídeos permanece infectivo por apenas quatro horas (ISSEL & FOIL, 1984). A importância destes insetos como vetores do VAIE é devida, principalmente, às características morfológicas do seu aparelho bucal. Em função da sua picada extremamente dolorosa, geralmente, o repasto sanguíneo é interrompido pela reação do animal portador atingido, eventualmente levando o vetor para outros animais. Outras formas de transmissão podem ocorrer, como pela via sexual, através do sêmen contaminado, transmamária, transplacentária e fômites, porém são menos significativas epidemiologicamente (FENNER et al, 1993; ISSEL & FOIL, 1984; LEROUX. et al., 2004).

Há maior probabilidade de transmissão a partir de animais febris, que favorecerem a propagação epizoótica, porém animais portadores permanecem virêmicos indefinidamente, atuando como fonte de vírus, em condições de campo. Portanto, os

eqüídeos soropositivos em geral são considerados fonte de infecção (ISSEL & FOIL, 1984; LEROUX et al., 2004).

## **2.5. A AIE no Brasil**

De acordo com Dupont e Dacorso Filho, não há dúvidas que a AIE foi trazida ao Brasil pela importação de cavalos de corrida, provavelmente, através da fronteira da Região Sul, de onde se disseminou por todo Território Nacional. Foi observado um crescimento estatístico de casos em áreas de baixa ocorrência, associado ao crescimento econômico, surgimento de novos criatórios e a utilização cada vez maior destes animais, tanto na lida como em atividades de lazer (DUPONT & DACORSO FILHO, 1968).

A AIE foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 1968, no então Estado da Guanabara por Dupont e colaboradores (1968). Na época, o diagnóstico era baseado, principalmente, em achados de sideroleucócitos (macrófagos contendo hemossiderina) e pelos desvios de valores de proteínas totais e frações em relação albumina/globulinas do soro sanguíneo de eqüinos, obtidos através do perfil eletroforético, dosagem de proteínas séricas totais e frações seroprotéicas. Estes achados e a presença de depósitos de ferro em órgãos do sistema retículo endotelial eram atribuídos unicamente à destruição de hemácias provocadas pela ação viral (HENSON, 1972).

Por outro lado, animais negativos pela imunodifusão podem se apresentar positivos ao teste de gamaglobulina e de sideroleucócitos. Atualmente, são reconhecidas doenças como a babesiose, nutaliose e tripanossomíase eqüina que provocam aparecimento de sideroleucócitos no sangue (HAWKINS et. al., 1976)

No mesmo período a doença foi descrita por Silva e colaboradores (1968) em animais do Clube Hípico Fluminense e em um animal da cavalaria da Polícia Militar na cidade de Niterói, no Estado do Rio de Janeiro. Guerreiro e colaboradores (1968) também descreveram o primeiro caso confirmado da AIE no Estado do Rio Grande do Sul. Em Minas Gerais, a doença foi diagnosticada pela primeira vez por Batista & Fonseca (1971) em um cavalo PSI no qual foi feita a transferência de infectividade (sangue) a um cavalo sadio, com a concomitante reprodução da doença (REIS, 1997; 2003; FERRAZ, 1998; HU, 1990).

## 2.6. Aspectos legais do Diagnóstico da AIE

A prova de imunodifusão (teste de Coggins) foi oficializada no Brasil, pela Portaria Ministerial nº 71 de 11/03/74, para efeito de diagnóstico da AIE (BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL, 1974).

Segundo a CNAIE, em cada unidade da federação, o combate à AIE seria feito através da Comissão Estadual de Controle da Anemia Infecciosa Equina (CECAIE), de acordo com o regimento aprovado pela portaria DNPA nº 29 de 19/05/76, publicada no Diário Oficial da União 103 de 01/06/76 (CESAR, 1982).

O CNAIE estabeleceu que o programa nacional de combate à AIE deveria considerar a ocorrência diferenciada da doença nas diversas regiões, os variados sistemas de produção e utilização dos equídeos, e, ainda definir e estabelecer áreas indenes, paraendêmicas, epiendêmicas e endêmicas. As práticas de controle adotadas foram o diagnóstico e sacrifício obrigatório dos animais positivos no teste de Coggins e rígido controle da movimentação interna e externa nas áreas geográficas, segundo a caracterização epidemiológica da AIE (CESAR, 1982).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no tocante ao controle da AIE, possui uma política bastante eficiente, considerando-se todos os procedimentos contidos em suas Portarias (Portaria SNAD nº. 92, de 14.11.79, publicada no DOU de 30/11/79). Esta Portaria determina o sacrifício de animais soropositivos, que atuam como fonte de infecção, uma vez que a não há tratamento. Em áreas endêmicas, como alguns estados (MT, MS, AM), foi definida uma política diferenciada. Animais soropositivos são sacrificados sempre que possível. Entretanto, onde há carência de recursos, a condição sócio-econômica pode justificar a aplicação do manejo em segregação destes animais, como em fazendas de criação extensiva de bovinos (<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES>).

A legislação vigente no país, Instrução Normativa nº 45, de junho de 2004, estabelece o isolamento ou sacrifício do animal portador e determina que as ações de controle da enfermidade sejam definidas pelas CECAIES, de acordo com as condições epidemiológicas peculiares de cada estado. Algumas medidas podem ser adotadas no controle da AIE, dentre elas podemos citar:

- Uso de seringas e agulhas descartáveis individualizado;
- Limpeza de todos os utensílios utilizados nos animais;

- Isolamento dos animais positivos até a realização do sacrifício;
- Sacrifício dos animais positivos à prova de Coggins;
- Submeter ao exame de diagnóstico todo o equídeo antes do seu trânsito;
- Realização de exame diagnóstico para AIE para os animais adquiridos em leilões, feiras ou de outras propriedades.

O trânsito interestadual de equídeos somente é permitido quando os animais estão acompanhados da Guia de Trânsito Animal (GTA). Na emissão de GTA para equídeos com mais de seis meses de idade, é obrigatória a apresentação do exame com resultado negativo para AIE.

A participação de equídeos em leilões, feiras, rodeios, exposições, torneios e demais concentrações somente é permitida a animais com atestado de exame oficial com resultado negativo para AIE, que tem validade de 60 dias.

Outro tópico significativo da política ministerial se refere ao credenciamento dos técnicos e laboratórios. Após a realização de vários seminários e encontros de especialistas e pesquisadores da AIE, no início dos anos 70, o MAPA passou a adotar critérios para a realização dos testes laboratoriais, incluindo o credenciamento de laboratórios e médicos veterinários. Para tanto, foram criados laboratórios de referência para o diagnóstico da AIE. Com a divulgação da Portaria Ministerial nº 71 de 11/03/74, (BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL, 1974) o treinamento de técnicos em conformidade com a Portaria passou a ser exigido aos laboratórios interessados. Na Região Sudeste, a época pode-se destacar o Laboratório do Jockey Club do Rio de Janeiro que, desde a aprovação e padronização da técnica passou a ser considerado como um laboratório de referência para o diagnóstico e treinamento de técnicos.

O SNDA normatiza através das determinações constantes das Portarias Nº 53 do SNAD de 20 de maio de 1991 e Nº 1 da Divisão de Laboratório Animal (DLA) de 14 de agosto de 1991, que versam sobre o credenciamento e monitoramento de laboratório de diagnóstico de AIE, dando embasamento a Portaria Nº 84 de Outubro de 1992, esta Portaria, e até hoje tida como a mais completa e elaborada visando o diagnóstico e controle da AIE no País (<<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES>>).

Hoje existem vários Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS) que habilitam médicos veterinários oferecendo cursos teóricos e práticos, sob a forma de seminários. O curso consiste de parte abordando a AIE, métodos diagnósticos,

imunologia da doença, preparo de soluções, cuidados com vidrarias e equipamentos, desinfetantes e desinfecção, introdução ao sistema de qualidade a ser implantado em todos os laboratórios credenciados, técnica de resenha de equídeos, legislação da defesa sanitária animal nos diferentes Estados da Federação. Ao final do curso todos os candidatos são submetidos a uma prova prática de leitura de dez lâminas de IDGA com os mais variados resultados. Para o credenciamento, o candidato deve alcançar 100% de acerto, nas lâminas oferecidas.

Atualmente, com a divulgação da Instrução Normativa Nº 45, de 15 de junho de 2004, do MAPA, que em seu conteúdo apresenta a preocupação de uniformizar o diagnóstico e controle desta doença. (Brasil, 2004), esta depositando no responsável técnico grande responsabilidade. Todos os médicos veterinários credenciados são convidados todos os anos a participar de seminários nas diversas unidades federativas, para reciclagens. (<<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLAÇAO/PUBLICACOES>>)

## **2.7. O Diagnóstico laboratorial da AIE**

Desde de a sua adaptação por Coggins, o teste de imunodifusão (IDGA) tornou-se um padrão para o diagnóstico desta doença no mundo todo. O método é baseado na migração do antígeno comercial e dos anticorpos presentes no soro animal, em um meio semi sólido (ágar gel), que formam uma linha precipitação visível a vista desarmada, em caso de identidade. É uma prova qualitativa reconhecida como o método mais importante no diagnóstico da AIE, por ser de fácil execução e com especificidade de 95%. A prova detecta anticorpos precipitantes específicos entre 14 e 45 dias após a infecção (COGGINS et al., 1972). Apesar de considerado como teste específico para o diagnóstico desta doença, o método não detecta anticorpos para VAIE nos estágios iniciais da infecção (REIS, 1997). A possibilidade de reação cruzada com a proteína de matriz de envelope (MA) de outros lentivírus e a resposta intermitente da p26 são descritas (LANGEMEIER et al., 1996). Em muare e asininos, que por muitas das vezes apresentam níveis muito baixos de viremia, o teste apresenta uma limitação perigosa, uma vez que animais negativos ou duvidosos pela imunodifusão podem servir como fonte de propagação (TOMA, 1980; ISSEL & ADAMS, 1982; PARÉ J. & SIMARD C. 2004).

A IDGA como um grande número de testes sorológicos baseia-se, principalmente, na detecção de anticorpos para a proteína de core viral p26 que é conservada. Um dos principais alvos da resposta imune, quase todos os animais infectados produzem anticorpos específicos para a p26 (REIS, 1997).

Testes diagnósticos mais sensíveis e aplicáveis para o diagnóstico da AIE ainda são uma prioridade importante na medicina de eqüinos (MONTELARO et al., 1993). Nesta dissertação, foram citados apenas dois testes que podem ser usados para o diagnóstico da AIE. Outros testes foram avaliados por diversos autores na tentativa de comparação de resultados, a fim de se obter um diagnóstico mais rápido e barato, tais como FAST ELISA, RT-PCR, ELISA C (RADOSTITS et al., 2002; LEW et al., 1993; SOUTULLO et al., 2001; COOK et al., 2001; MARTIN-RENDON et al., 2002).

Para detecção dos animais soropositivos, o teste recomendado no exterior pelo *World Organisation for Animal Health* – OIE (LEW et al., 1993; SOUTULLO et al., 2001) e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil é IDGA para a AIE ou, simplesmente, teste de Coggins (FERRAZ1998).

A prova de ELISA permite detectar a maioria dos cavalos infectados com resultados negativos pela IDGA (SHANE et al., 1984; Lew et al., 1993). Entre as vantagens são citadas a utilização em um grande número de amostras em um curto espaço de tempo e a possibilidade de detecção de animais recentemente infectados, (MONTELARO et al., 1993; LANGEMEIER et al., 1996). Nos Estados Unidos da América, foi desenvolvido um ELISA competitivo (CELISA) contra a p26 que foi aprovado oficialmente para utilização em larga escala. Porém, todo o animal positivo por ELISA requer confirmação pela IDGA, antes que medidas sanitárias sejam tomadas (LANGEMEIER et al., 1996).

A evolução da metodologia diagnóstico pode ser observada no quadro 2, a seguir.

**Quadro 2.** Comparação entre os vários testes sorológicos em Anemia Infecciosa Equina

<b>TESTES</b>	<b>Referências básicas</b>	<b>Aparecimento de anticorpos (dias)</b>	<b>Persistência do</b>
Fixação complemento direto	KONO & KOBAYASHI, 1966	14	62 di
Fix. Complemento indireto	McGUIRE et al., 1971	29	-
Soroneutralização	KONO, 1969	45	Todo o c
Imunofluorescência	USHIMI et al , 1970	14	?
	CRAWFORD et al , 1971		
IDGA	COGGINS & NORCROSS, 1970	14	Todo o c
	NAKAJIMA & USHIMI, 1971		
Inibição da hemaglutinação	SENTSUI & KONO (1976)	40	?
Hemaglutinação indireta	SUGIURA & NAKAJIMA (1982)	14	Todo o c
ELISA	SUZUKI et al., 1982.		
	GIELKENS & TOMA, 1982	10	?
	REIS, J.K.P. 1997		
ELISA Competitivo	REIS, J.K.P. 1997	14	?
SPRIA	HORENSTEIN & FEINSTEIN, 1985	?	?

Adaptade a partir de **REIS, 1984**

## 7.1. A Prova de Coggins

Por definição, a prova de Coggins é a técnica imunodifusão radial dupla em ágar gel (IDGA), para detecção de anticorpos contra o VAIE. Esta é uma prova de precipitação de complexos antígeno-anticorpo (OUCHTERLONY, 1968), que foi adaptada por COGGINS & NORCOSS (1970), utilizando antígeno produzido a partir de triturados de baço e, posteriormente, adaptada para a utilização de antígeno preparado em cultura de leucócitos de cavalo (NAKAJIMA & USHIMI 1971e 1974).

Desde a década de 70, a prova de Coggins ou, simplesmente, IDGA para detecção do VAIE (COGGINS, & NORCROSS, 1970), vem sendo utilizada no Brasil e no mundo, como principal método de diagnóstico. Para realização da prova de Coggins, antígenos e anticorpos depositados em cavidades do gel de ágar difundem-se radialmente em velocidades diferentes, dependendo de sua solubilidade e massa molecular e concentração. Quando os anticorpos em migração entram em contato com os antígenos específicos (que migram na direção oposta), pode ocorrer uma reação antígeno-anticorpo. Os complexos formados são insolúveis e se precipitam no gel, originando linhas visíveis à vista desarmada, que podem ser observadas sob uma fonte de luz intensa com foco reduzido, contra um fundo escuro, até 48 horas após a execução do teste. O método, de fácil execução, alta especificidade e baixo custo, vem sendo utilizado em grande escala, apesar do desenvolvimento de outros métodos diagnósticos como a prova de ELISA (SUZUKI et al., 1982; SUGIURA et al., 1986; FERRAZ et al., 1997, SOUTULLO et al., 2001), a imunofluorescência (McGUIRE et al., 1971; USHIME et al., 1972) e a PCR (STEPHENS et al., 1990, LEROUX, 2004).

A leitura da formação ou não das linhas é feita após 48 horas, de acordo com as portarias do MAPA. Os soros são considerados positivos quando a linha de precipitação entre a amostra e o antígeno forma identidade com a linha do soro controle positivo, unindo-se a essa formando uma linha curva contínua. As amostras são consideradas negativas quando não há formação de linha de precipitação entre o poço da amostra e o do antígeno com identidade com a linha do soro controle. A linha de precipitação formada pelo soro controle positivo, ao invés de curvar-se em sua extremidade, continua para dentro do poço da amostra testada. (figura)

O IDGA, como outros testes sorológicos, baseia-se na detecção de anticorpo contra a principal proteína do core viral, a p26. Esta proteína tem sido largamente utilizada em estudos de AIE por ser altamente conservada, o alvo da resposta imune e

por praticamente todos os animais infectados. Além disso, é a proteína mais abundante da partícula viral constituindo cerca de 30% da massa protéica total (REIS, 1997).

As maiores restrições da IDGA referem-se à baixa de sensibilidade e o tempo para a obtenção dos resultados, e a incapacidade em detectar animais infectados pelo VAIE nos estágios iniciais da infecção (SHEN et al., 1984; LANGEMEIER et al., 1996), porém é o único método autorizado pelo MAPA para o diagnóstico da AIE, no Brasil. Devido ao desenvolvimento do setor laboratorial e o crescimento da equideocultura, vários fabricantes vêm oferecendo *kits* para diagnóstico baseado na prova de Coggins, porém apenas um *kit* é de fabricação nacional (Laboratório Bruch) os outros dois *kits* utilizados neste trabalho são importados, mas possuem autorização de uso pelo MAPA.

### **2.7.2. A Prova de ELISA**

Os testes de IDGA e a ELISA são baseados, primariamente, na detecção de anticorpos para a proteína de core viral p26, porém já foi demonstrado que os níveis de anticorpos específicos contra a glicoproteína gp90 da superfície viral são 100 vezes mais abundantes do que anticorpos específicos contra p26 (MONTELARO et al., 1984 b), sendo também os primeiros a serem detectados no sangue.

Em seu estudo Lew e colaboradores, (1993), fazem uma comparação entre ELISA, FAST ELISA e o teste de Coggins, onde foram usados soros de animais positivos e negativos para comparação destes métodos. Segundo os autores, a prova de ELISA usado com a glicoproteína recombinante 45 (rgp45) gerou resultados bastante satisfatórios, com uma sensibilidade superior ao teste de Coggins, mas os autores apresentaram resultados equivocados de positividade. Relatam ainda que, além de seu custo por exame ser menor, US\$ 0,30, contra US\$ 3,00 por animal.

A prova de ELISA indireta com a proteína gp90 recombinante (rgp90) tem sido utilizada em Minas Gerais, no RETROLAB-UFMG, onde foi desenvolvido parte do presente estudo. Esta prova possui vantagens frente à imunodifusão em ágar gel (IDGA) (OUCHTERLONY, 1968) por detectar os anticorpos para gp90, que são os mais precoces e abundantes que surgem no sangue dos infectados, diminuindo o número de resultados falso negativos. O teste ELISA é considerado um método sensível para detectar anticorpos para o VAIE, possibilitando o teste de muitas amostras ao mesmo tempo com resultados obtidos dentro de 4 a 5 horas (MARTINS, 2004; REIS, 1994).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1. Soros de eqüídeos**

Inicialmente, 220 soros de eqüídeos, da coleção do LDAIE-UFRRJ, foram selecionados para as análises, sendo 110 positivos e 110 negativos para AIE, de acordo com diagnóstico credenciado original. Todos os soros foram selecionados com base no volume de, pelo menos, 0,5 mL, e os negativos foram escolhidos ao acaso. Posteriormente, mais 90 soros positivos foram obtidos de outros laboratórios credenciados, do Estado do Rio de Janeiro e outros 90 soros negativos do LDAIE-UFRRJ foram acrescentados, totalizando 400 soros. Todos os soros selecionados foram submetidos, novamente, à IDGA (*Kit Bruch*) e à prova de ELISA, para efeito de confirmação das leituras originais e avaliação desta técnica, no diagnóstico da AIE.

Os soros foram acondicionados em tubos de 1,5 mL do tipo Eppendorf, identificados e armazenados a -20°C, até o momento de uso.

### **3.2. Sistemas comerciais de diagnóstico da AIE (*kits*)**

Para as análises comparativas foram empregados três *kits* de diagnóstico da AIE por imunodifusão em ágar gel de diferentes fabricantes (Laboratórios IDEXX, BRUCH e VMRD), autorizados pelo MAPA, e comercializados atualmente no País. Os *kits* são compostos de dois reagentes: um frasco de antígeno e outro de soro controle positivo.

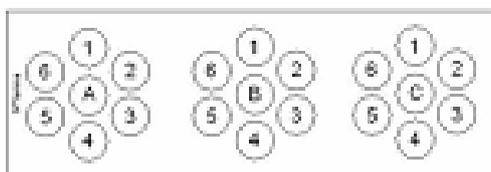
O *kit* da BRUCH utiliza a proteína de capsídeo p26, purificada de cultura de células infectadas, a partir de uma amostra apatogênica do vírus da Anemia Infecciosa Eqüina, com marcação genética identificadora do produto. Com 3,5 mL de antígeno e 10,5 mL de soro controle positivo, este *kit* permite a realização de até 420 exames. O *kit* da VRMD de fabricação estadunidense utiliza a proteína p26 recombinante, produzida em *E.coli*. De acordo com o fabricante, o uso deste antígeno elimina a ocorrência de linhas de precipitação inespecíficas (3,35 mL de antígeno e 10 mL de soro controle positivo, até 400 testes exames). O *kit* da IDEXX, também de fabricação estadunidense, informa apenas que utiliza a proteína p26 altamente purificada (3,9 mL de antígeno e 11,7 mL de soro controle positivo, até 450 testes).

Por questões éticas, os *kits* foram identificados como A, B e C e mantidos a 4°C, até o momento de uso.

### 3.3. Imunodifusão em ágar gel (IDGA)

A técnica de IDGA foi empregada para as análises dos *kits* de diagnóstico testados. A IDGA foi realizada em lâminas comuns de microscopia ótica (25 x 75 mm), recobertas com 4,5 mL de uma solução fundida de ágar nobre a 1%, em tampão borato, pH 8,6 (Anexo). Após o resfriamento e gelificação do ágar, sete cavidades em *roseta* com 4,0 mm de diâmetro, de acordo com a **figura 1**, foram feitas com auxílio de um perfurador apropriado. Na cavidade central, colocou-se 25 µL do antígeno e nas cavidades periféricas nas posições 2, 4 e 6 colocou-se 25 µL dos soros a serem testados e 25 µL dos soros controle positivos nas posições 1, 3 e 5. Em seguida, os reagentes são incubados em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 48 horas.

As leituras foram feitas por três técnicos credenciados pelo MAPA, visualizando-se cuidadosamente a formação das linhas de precipitação.



**Figura 1.** Esquema da lâmina de exame. A posição central foi reservada para o antígeno, enquanto os soros testados foram depositados nas posições 2, 4 e 6. As posições 1, 3 e 5 receberam o soro controle positivo.

### 3.4. A Prova de ELISA

Para avaliação prática da técnica no diagnóstico da AIE e confirmação dos resultados das leituras dos soros por IDGA (positividade e negatividade), os 200 soros positivos e 200 negativos utilizados neste trabalho foram submetidos à prova de ELISA. Os soros analisados pela prova de ELISA, que obtiveram resultados discrepantes da avaliação por IDGA, foram reavaliados pela mesma técnica.

A prova de ELISA foi realizada no RETROLAB, UFMG, segundo a descrição de REIS (1997), em placas de 96 cavidades com fundo plano. Inicialmente, para sensibilização das placas, a glicoproteína de envelope recombinante rgp90 foi diluída em tampão carbonato 50 mM (pH 9,6) na concentração de 0,5 µg/cavidade e incubada por 18 horas a 4 °C. Em seguida, foi realizada a etapa de bloqueio, onde as placas foram lavadas por duas vezes com uma solução de lavagem (PBS-Tween a 0,05% pH 7,6) e incubadas, por uma hora, com a mesma solução acrescida de leite em pó desnatado a 5% (200 µL por poço). Para remoção da solução de bloqueio, três lavagens sucessivas foram feitas com a solução de lavagem. Para a prova, os soros testes e os controles positivo e negativo foram diluídos 50 vezes na solução PBS-Tween mais leite em pó a 1%, sendo 100 µL dispensados nas cavidades. Os soros foram incubados por uma hora, a temperatura ambiente nas placas sensibilizadas. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com solução de lavagem, por 3 vezes, e incubadas com solução de conjugado na diluição de 1: 7.500 (IgG de coelho anti IgG eqüina conjugada com peroxidase) em PBS-Tween mais leite em pó a 1% (100 µL por poço), por 1 hora a temperatura ambiente.

Após nova lavagem com a solução de lavagem por três vezes, 100 µL do substrato foi adicionado: uma solução de ortofenilenodiamino (OPD) a 0,5 mg/mL em 10 mL de tampão fosfato-citrato (pH 5,0), adicionada com 20 µL de peróxido de hidrogênio, por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 40 µL de uma solução de ácido sulfúrico a 0,5 N por poço. As leituras da prova foram realizadas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492nm.

### 3.5. Análises da reprodutibilidade

Para a análise da reprodutibilidade entre os resultados referenciados e os resultados das leituras dos soros com os diferentes *kits*, uma partida de 1 L de ágar nobre a 1% em tampão borato, pH 8,6, foi feita para confecção das lâminas de exame por IDGA. Todas as lâminas de exame foram feitas, com as três rosetas padronizadas perfuradas em cada uma, rigorosamente, dentro dos parâmetros estabelecidos pela portaria ministerial. A interpretação (leitura) dos testes foi realizada após 48 h de incubação das lâminas com os reagentes e soros, à temperatura ambiente, em sala escura, de acordo com a mesma Portaria. Apenas os soros com leituras concordantes entre as provas de ELISA e da IDGA foram empregados nestes experimentos.

#### 3.5.1. Experimento 1

Para o experimento inicial, 90 soros positivos e 90 soros negativos foram submetidos à IDGA, com reagentes dos três fabricantes, previamente mencionados. Para tanto, 60 lâminas de exame foram feitas. Nas três rosetas de cada lâmina foram testados os mesmos soros nas mesmas posições (2, 4 ou 6), frente aos diferentes *kits*, mantendo-se fixa ordenação destes, em relação às rosetas.

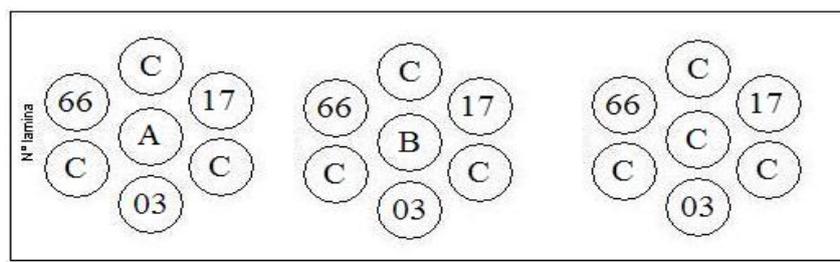


Figura 2 – Disposição dos reagentes em lâmina

C – Soro Controle , posições 01,03 e 05 de cada roseta

A, B e C – Antígenos de cada fabricante

Soros teste: posição 2, 4 e 6 (neste experimento: soros 17, 03, 66)

#### 3.5.2. Experimento 2 (cego em relação aos soros e à disposição dos *kits*)

Com o objetivo de reduzir eventuais vieses, 15 soros positivos e 15 negativos foram dispostos aleatoriamente nas posições 2, 4 e 6 em cada uma das 10

lâminas de exame, em posições distintas das rosetas, que receberam também ao acaso os reagentes dos *kits*.

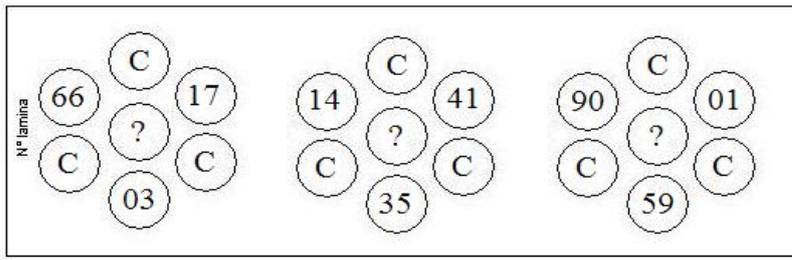


Figura 3 – Disposição dos reagentes em lâmina

C – Soro Controle, posições 01, 03 e 05 de cada roseta (correspondente ao antígeno utilizado em cada roseta)

? – Antígenos de cada fabricante (sorteados) porém correspondentes ao soro controle

Soros teste: posição 2, 4 e 6 (neste experimento: soros aplicados com resultados desconhecidos e aleatoriamente)

### 3.5.3. Experimento 3 (condições dos fabricantes).

Para este experimento complementar, três soros positivos foram testados por IDGA, nas condições recomendadas pelos fabricantes. No lugar das lâminas, foi empregada uma placa de Petri, com 10 cm de diâmetro, e as rosetas para os *kits* importados foram feitas com um furador dentro do padrão estadunidense, cujos reagentes foram aplicados no volume de 50  $\mu$ L.



Figura 4

### **3.6. Análises comparativas da visibilidade das linhas de precipitação**

Em função da diferença visual das linhas de precipitação observadas nos exames dos mesmos soros com os diferentes kits, no experimento 1, algumas análises foram realizadas para consubstanciar esta distinção.

#### **3.6.1. Análise da identificação dos kits**

A fim de avaliar a distinção visual das linhas de precipitação formadas os reagentes dos três fabricantes, no experimento 2, os técnicos, além dos pareceres sobre os soros, foram solicitados a optar qual dos kits foi utilizado nas rosetas do experimento 2 (cego em relação aos soros e kits). Posteriormente, os registros das opções foram empregados para se avaliar o percentual de erro dos técnicos neste parâmetro.

#### **3.6.2. Caracterização da visibilidade das linhas de precipitação**

Com a finalidade de se obter uma caracterização da visibilidade das linhas de precipitação, crítica para a leitura, os três técnicos registraram suas impressões sobre a nitidez e a intensidade do brilho destas, observadas durante a leitura do experimento 1.

#### **3.7. Detecção de reações inespecíficas.**

Como outro parâmetro de qualidade do kit, durante a leitura dos experimentos de IDGA, procurou-se registrar fenômenos indesejados como reações inespecíficas, formação de linhas duplas e linhas espessas.

#### **3.8. Titulação dos antígenos A, B e C.**

Para uma avaliação da concentração dos antígenos dos diferentes kits, diluições seriadas destes reagentes, em tampão borato, foram feitas na base 2 (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16). A titulação dos antígenos A, B e C foi avaliada por IDGA, colocando-se o 25µL do soro de cada kit no poço central e 25µL das diluições dos antígenos nos periféricos. Após 48h, as leituras foram realizadas.

**Figura**

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Prova de ELISA

Os resultados da análise, pela prova de ELISA, dos 400 soros testados podem ser observados na tabela 1. Em relação aos soros positivos a concordância foi de 90,5% e em relação aos negativos de 89,5%. A concordância entre o total de resultados da ELISA e da IDGA foi de 90%..

**Tabela 1.** Porcentagem de soros positivos e negativos nos testes de IDGA e ELISA

IDGA	ELISA			Total
	positivos	indeterminados	negativos	
Positivos	181	4	15	200
Negativos	18	3	179	200

### 4.2. Análises da reprodutibilidade

#### 4.2.1. Experimento I

A tabela 2. apresenta os percentuais de reprodutibilidade das leituras procedidas pelos três técnicos, com uso dos três *kits* (A, B e C) apenas para os soros positivos, uma vez que houve 100% de reprodutibilidade, em relação aos soros negativos. Os técnicos 1 e 2 fizeram leituras com 100% de reprodutibilidade (soros positivos), enquanto o técnico 3 optou por recomendar a repetição do exame em 22,3 % (60/270) das leituras. Deste total, suas dúvidas foram em 10% (9/90) dos soros testados com o *kit* A, 19% (17/90) dos soros testados com o *kit* B e 38% (34/90) dos soros testados com o *kit* C.

**Tabela 2.** Reprodutibilidade das leituras de 90 soros positivos feita pelos técnicos, com o uso dos diferentes *kits*.

Técnico	Kit		
	A	B	C
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	90%	81%	62%

#### **4.2.2. Experimento 2** (cego em relação aos soros e à disposição dos *kits*)

A reprodutibilidade das leituras deste experimento, com o uso dos diferentes *kits*, baseada na leitura dos três técnicos, foi de 100%.

#### **4.2.3. Experimento 3** (nas condições dos fabricantes)

De acordo com a avaliação dos três técnicos, a utilização dos *kits*, de acordo com a recomendação dos fabricantes, possibilitou leituras claras e equivalentes entre os *kits*, diferentemente do que foi observado no experimento 1.

### **4.3. Análises comparativas da visibilidade das linhas de precipitação**

#### **4.3.1. Análise da identificação do kit**

Durante a leitura do experimento 2 (cego em relação aos *kits* e soros). O técnico 1 acertou o *kit* utilizado em 93,3% (28/30) das suas opções. O técnico 2 acertou o *kit* utilizado em 66,7 % (20/30) das suas opções. O técnico 3 acertou o *kit* utilizado em 70,0% (21/30) das suas opções.

#### **4.3.2. Análise da visibilidade das linhas de precipitação**

De acordo com o parecer unânime dos três técnicos, no experimento 1, todas as leituras proporcionadas pelo *kit* A apresentaram melhor visibilidade. Com grande intensidade de brilho e nitidez (definição), as linhas de precipitação promovidas entre os soros positivos usados nas análises e o antígeno do *kit* A possibilitaram as leituras mais claras e seguras. Já a qualidade das leituras das linhas de precipitação dos *kits* B e C foram francamente inferiores em função da pouca intensidade do brilho e nitidez das mesmas. As leituras mais difíceis e duvidosas foram obtidas com o *kit* C.

#### **4.4. Detecção de reações inespecíficas**

Durante a realização dos experimentos (IDGA) foram observadas linhas de precipitação duplas, uma com identidade (contínua com a linha do controle positivo) e outra inespecífica (com esporões), em três exames com soros positivos, com reagentes do *kit* A. Nestes casos, as leituras foram consideradas positivas. De forma que, como foram feitas 105 reações com o *kit* A, houve 2,85 % de reações inespecíficas, embora com linhas específicas simultaneamente.

#### **4.5. Titulação dos antígenos A, B e C.**

Após 48h de incubação, foi observada a formação de linha de precipitação equidistante no poço do antígeno não diluído em todos os conjuntos. Na diluição 1:2 foi observada o início da formação da linha de precipitação na roseta dos *kits* A e B (menos intensa) e na roseta do *kit* C de forma quase imperceptível. Através das observações acima, pode-se concluir que o antígeno do *kit* A está mais concentrado que do B, que por sua vez é o menos concentrado.

## 5. DISCUSSÃO

---

A AIE é uma doença de considerável importância para a Equídeocultura Mundial e a prevalência de, aproximadamente, 2% entre os animais examinados no Brasil e no LDAIE/UFRRJ não expressa a sua real significância. Reconhecidamente, retrovíroses atingem, muitas vezes, elevadas prevalências nas populações hospedeiras, rivalizadas apenas pelas herpesvíroses. Este aspecto pode ser compreendido a luz da sua estratégia de escape das defesas dos hospedeiros, baseada em três pilares: sua alta mutagenicidade, capacidade de integração no genoma celular e infecção do sistema retículo endotelial, como macrófagos e linfócitos. Contudo, a prevalência observada de 2% se refere apenas aos animais examinados. Devido à notificação obrigatória da AIE e a política de teste e sacrifício determinada pelo MAPA, sem direito à indenização, proprietários e criadores têm restrições ao exame, a não ser quando imposto pela lei. Ainda sim, em propriedades pantaneiras a prevalência pode atingir até 50% dos rebanhos (Brasil, 2001), que neste caso sofrem uma política diferenciada. A partir de contatos com práticos de campo, observou-se que, apesar das recomendações, mesmo em casos de suspeita da infecção, muitos optam pela não realização do exame, evitando as sanções legais. A eutanásia é preconizada diante da inexistência atual comprovada de vacinas eficientes e da vitaliciedade da infecção.

Apesar destes aspectos, a política atual do MAPA é fundamentada no diagnóstico sorológico, obtido pela aplicação da prova de Coggins, que corresponde ao método mais amplamente utilizado no mundo, devido à sua simplicidade e baixo custo, apesar de técnicas mais modernas e eficientes terem sido desenvolvidas e aperfeiçoadas.

Implantado no âmbito do Instituto de Veterinária da UFRRJ, o LDAIE vem, há décadas, no escopo das portarias ministeriais, aplicando a política de controle da AIE, já tendo examinado milhares de animais. Apesar da especificidade da prova de Coggins, diversos problemas foram observados que podem prejudicar a precisão do diagnóstico, entre os quais variabilidades entre os *kits* (marcas) utilizadas, ao longo dos anos. Mesmo credenciando os *kits*, o MAPA não exerce o controle da qualidade destes, deixando aos técnicos às suas próprias avaliações.

Considerando que a precisão dos resultados é crítica, posto que animais falso positivos podem ser sacrificados inutilmente e falso negativos preservados como fonte de infecção, diversos problemas podem ocorrer. Resultados errôneos podem ser gerados, por exemplo, devido a: falhas na identificação dos soros; respingos durante a pipetagem do soro controle positivo nas cavidades dos soros testados; a falha da troca

das ponteiiras; deposição dos soros nas cavidades incorretas; câmara úmida mal vedada, facilitando o ressecamento da lâmina e inviabilizando a leitura. Outros fatores também podem gerar problemas como a solução de ágar fora dos padrões; concentração alterada dos reagentes utilizados; presença de água residual nos orifícios; fonte de luz indireta inadequada; falta de energia elétrica afetando a refrigeração dos *kits* e problemas de acuidade visual do técnico. Estes motivos que podem levar a inviabilização do exame, ocasionando perda de tempo e despesas extras. Somado a estas possíveis fontes de erros, as reações podem ser, ainda, influenciadas por uma variedade de condições físico-químicas, dentre elas a concentração eletrolítica do tampão, pH, alterações bruscas de temperatura durante a incubação, levando a formação de artefatos de técnicas indesejáveis para o teste. Altos níveis de lipídeos e protídeos nos reagentes podendo afetar a formação e observação da linha de precipitação, principalmente, em relação aos soros fracamente positivos.

Entretanto diversos destes fatores podem ser minimizados pelo procedimento cuidadoso dos técnicos, mas, correntemente, não cabe a estes o controle de qualidade dos reagentes dos *kits*. Por este motivo, este trabalho se concentrou neste aspecto, centralizando-se especificamente na reprodutibilidade dos *kits*, em relação a soros positivos e negativos referenciados e na visibilidade das linhas de precipitação obtidas.

Para esta finalidade, 200 soros positivos e 200 negativos para AIE, pela utilização da IDGA, nos exames credenciados originais, foram selecionados. Preliminarmente, para confirmação das leituras originais por IDGA, realizadas no LDAIE-UFRRJ, os 400 soros foram submetidos à prova de ELISA. Aqueles que acusaram resultados diferentes dos originais foram mais uma vez testados por ELISA. Os soros que permaneceram com resultados discrepantes, após esta reavaliação foram retirados dos experimentos seguintes.

Após esta etapa, estes soros com leituras confirmadas foram examinados com os três *kits* escolhidos, concomitantemente, em três rosetas das mesmas lâminas de exame para apreciação de três técnicos credenciados pelo MAPA.. O experimento inicial (experimento 1), surpreendentemente, apresentou diferenças marcantes, quanto à intensidade das linhas de precipitação produzidas pelos soros positivos e os três antígenos utilizados, embora não tenham sido detectados problemas quanto à leitura dos soros negativos.

Esta distinção inesperada da qualidade das linhas de precipitação e, por conseqüência, das leituras dos técnicos, suscitou dúvidas quanto à ocorrência de possíveis vícios, devido à intensidade das linhas obtidas pelo uso do *kit* A, na leitura das

demais rosetas, em função da manutenção da disposição dos soros e dos *kits* nas três rosetas de cada lâmina. No esforço de remoção do viés, um dos técnicos procurou proceder sua leitura, evitando a observação das rosetas adjacentes e optando pela posição da dúvida, que recomendaria a repetição do exame, o que correntemente é plausível. Apesar do prejuízo na padronização dos critérios estabelecidos inicialmente para as leituras, esta postura forneceu informações interessantes. Considerados estes fatos e aventada a possibilidade de viés, um novo experimento foi realizado.

No experimento 2, tanto as posições dos soros nas rosetas, quanto à qualificação dos soros (positivos e negativos) e à disposição dos *kits* foi desconhecida pelos técnicos. Desta vez, corrigidos os possíveis vícios, apesar da discrepância citada na qualidade (nitidez, contraste e brilho) entre as linhas de precipitação produzidas pelos três *kits*, a reprodutibilidade entre as leituras dos técnicos e os resultados referenciados, previamente, foi de 100%. Após a análise inicial deste resultado, concluiu-se que, apesar das diferenças marcantes observadas, o padrão de qualidade da leitura dos três técnicos, face à sua extensa experiência anterior e adquirida ao longo dos experimentos, poderia representar um viés não removível, em relação a técnicos, menos experientes.

A discussão das diferenças constatadas no experimento inicial também levou à detecção de um fator inesperado e extremamente significativo: nos bulários originais dos *kits* importados foram observadas condições técnicas marcadamente distintas das determinadas pela Portaria Ministerial, ao contrário das mesmas relativas ao *kit* nacional, apesar da tradução em português estar de acordo com a portaria. Especificamente, as medidas dos diâmetros das cavidades e distâncias entre estas, além das quantidades de trabalho de 50 microlitros para os reagentes dos *kits* importados contrariam as recomendações do MAPA. Como, por força da Lei, e em consideração às condições empregadas no País, restringindo-se às provas de IDGA a estas recomendações, gerou-se contradições técnicas durante o emprego dos *kits* importados, o que justificaria as discrepâncias mencionadas na visibilidade das linhas de precipitação dos diferentes *kits*. Ademais, como o custo por exame dos três *kits* é, praticamente igual, nas condições do MAPA (25 microlitros dos reagentes por animal), quando utilizados nas condições dos fabricantes (50 microlitros dos reagentes por animal), o teste por animal aumentaria significativamente de preço.

Considerando que os *kits* importados têm diferentes condições técnicas recomendadas pelos fabricantes, o experimento 3 foi desenhado a fim de se observar se a aplicação recomendada forneceria leituras equivalentes entre os *kits*. Este permitiu a

constatação desta justificativa para as diferenças observadas nos experimentos anteriores. As taxas relativamente baixas dos erros nas escolhas dos *kits*, durante o experimento 2, corroboram com as distinções observadas na qualidade das linhas formadas nos experimentos entre os três *kits*.

Quanto aos três *kits* utilizados, constatada a contradição entre as normas do MAPA e dos fabricantes dos reagentes importados, a análise ficou comprometida de sobremaneira. Apesar da experiência dos técnicos, comprovada pela reprodutibilidade de 100% obtida, a visibilidade das linhas de precipitação e os títulos menores dos antígenos B e C podem favorecer leituras falso negativas, por técnicos menos experientes.

A análise da visibilidade das linhas, baseada nos pareceres dos técnicos também reafirmou o *kit* A como superior no exame da AIE por IDGA. A avaliação dos títulos dos três antígenos comprovou a maior concentração do reagente no *kit* A.

Outro ponto a ser analisado é ligado ao antígeno recombinante utilizado no *kit* B e, eventualmente, também no *kit* C. Tentativas de contatos com os representantes, na busca de informações técnicas como títulos dos soros e dos antígenos e sua tecnologia não foram bem sucedidas e não está descrito da bula do *kit* C qual tipo de antígeno utilizado. É de conhecimento comum que antígenos recombinantes podem ter sua conformação tridimensional modificada, em prejuízo aos epítomos de superfície (não lineares) alterando a antigenicidade dos mesmos, o que poderia justificar as reações mais fracas observadas nos *kits* B e C.

O diagnóstico da AIE baseado na IDGA, apesar de sua segurança, traz limitações que podem ser observadas no decorrer deste trabalho. Frente ao interesse do MAPA no controle e erradicação desta virose, sistemas alternativos de diagnóstico têm sido propostos e aplicados.

Vários autores têm enfatizado a maior sensibilidade do ELISA comparada a IDGA (SUZUKI et al., 1982; SHANE et al., 1984; SUGIURA et al., 1986). Reis e colaboradores (1994) relataram um caso de erradicação da AIE em um rebanho de 86 eqüídeos, onde 470 soros foram testados simultaneamente por ELISA e IDGA, demonstrando que os anticorpos específicos para VAIE foram detectados pelo ELISA um mês antes do que pelo IDGA. O sucesso da erradicação foi atribuído ao uso de testes de maior sensibilidade como a ELISA. Dias e colaboradores (2000) compararam 1205 amostras de soros de eqüinos pelas técnicas de ELISA e IDGA e encontraram uma sensibilidade e especificidade comparada de 95,38 % e 80,3%, enquanto que Matsushita e colaboradores (1989) ao comparar 420 amostras de soros de eqüinos por ELISA

competitivo (CELISA) e IDGA encontraram 100% de correlação. A rapidez e automação da prova de ELISA e IDGA devem ser consideradas. Enquanto em uma lâmina para IDGA são processados 9 soros, na placa para ELISA são realizados 88. As vantagens da prova de ELISA sobre o IDGA são, entre outras, economia, rapidez, sensibilidade, detecção dos anticorpos não precipitantes, identificação de soros fracamente positivos ou duvidosos no IDGA e o monitoramento dos níveis de anticorpos passivos (colostrais) de potros nascidos de éguas positivas para AIE. Segundo Lew, (1993), o custo por animal testado por ELISA é cerca de dez vezes mais barato que o IDGA, devido às pequenas quantidades do antígeno necessárias para o teste. Outro ponto a ser considerado é que a leitura do teste IDGA é por vezes subjetiva, haja vista a grande quantidade de reações fracas positivas que passam despercebidas, resultando em resultados equivocados.

Em outros países, assim como no Brasil, a utilização das duas técnicas no diagnóstico oficial ainda não ocorre. A prova de ELISA pode ser considerada como teste de triagem em levantamentos em áreas endêmicas para a AIE, porém todos os resultados positivos por esta técnica são confirmados pela técnica padrão de IDGA, embora a ELISA deva ser considerada como excelente método e deve ser utilizado em programas de controle e erradicação da AIE.

Os resultados indeterminados e positivos na prova de ELISA, no caso de levantamentos soropidemiológicos para a AIE devem ser submetidos IDGA para confirmação. No caso das amostras positivas ao IDGA e negativas ao ELISA a possibilidade de reação cruzada com outros retrovírus deve ser considerada. A possibilidade da existência de uma nova variedade genética resultante de mutações no gene env e conseqüentemente na antigenicidade das proteínas do envelope como a observada no HIV (REIS et al., 2003), já que a proteína rgp90 usada foi baseada na seqüência clonada a partir da amostra Wyoming do VAIE em seu estudo, também pode ser aventada. Os resultados negativos ao teste de IDGA e positivos na ELISA se devem, principalmente, a maior sensibilidade da ELISA

Embora diversos fatores devam ser considerados, a experiência da utilização da ELISA neste trabalho permitiu a recomendação da utilização da ELISA, no controle de focos e na triagem rápida de animais testados, com a associação da IDGA na confirmação dos animais positivos no primeiro teste.

## 6. CONCLUSÕES

---

- A reprodutibilidade das leituras dos três técnicos com o uso dos diferentes *kits* na IDGA, em relação às leituras referenciadas, foi de 100% indicando equivalência entre os mesmos, de forma que a os kits comercializados no Brasil são aceitáveis. Porém, técnicos menos experientes têm mais possibilidade de erros do tipo falso negativos, quando da utilização dos *kits* importados.
- A visibilidade das linhas de precipitação do *kit* A foi superior à do *kit* B e C, cujas linhas de precipitação ofereceram maior dificuldade de visualização pelos técnicos.
- O *kit* nacional seguramente favorece a melhor margem de precisão das leituras, embora a capacitação técnica possa compensar o desacordo entre as recomendações técnicas do MAPA e dos fabricantes dos *kits* importados.
- Como as especificações técnicas dos *kits* importados contrariam frontalmente as condições técnicas determinadas legalmente pelo MAPA, recomenda-se a adequação dos reagentes a estas ou o estabelecimento de considerações sobre as condições dos fabricantes em novas portarias ministeriais.

## **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

---

II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (**ANAIS II SIAIE -1982**), SP. 1982 ,184P.

**BANCO** de dados agregados. **IBGE**, 2001. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protable.asp/z=t&0=12>>. Acesso em 20/06/2006.

**BANCO** de dados agregados. **IBGE**, 2002. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>>. Acesso em 28/06/2006.

BATISTA JÚNIOR, J.A.; FONSECA, V.O. Anemia infecciosa equina. *Arq. Esc. Vet.*, v.23, p. 281-290, 1971

BEVILACQUA, P.D. *Ecosystemas para a anemia infecciosa equina em Minas Gerais de 1973 a 1991.. Dissertação (Mestrado)* Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1993. 155p.

BIBERSTEIN, E.L. & YAN, Z.C. **Tratado de Microbiologia Veterinária**. São Paulo: Editorial Acribia Zaragoza, 1994, p. 174-177.

BOLETIM DE DEFESA SANITARIA ANIMAL, Anemia infecciosa equina. Brasília – **MA.** 1974.  
(<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES>).Acesso em 25/02/2006.

BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. Anemia infecciosa equina. Brasília - **MAPA** – 2005.  
(<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES>).Acesso em 25/02/2006.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 45**, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa eqüina – AIE. **MAPA** Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF 07 jul. 2004. Seção 1, p. 7-9. Disponível em < <http://ocj.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei> > acesso em 30/06/2006

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 51**, de 27 de junho de 2003. Divulga Normas Gerais de Credenciamento e Reconhecimento de Laboratórios da Área Animal e Vegetal-**MAPA**. Disponível em < <http://ocj.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei> > acesso em 10/06/2006.

BRASIL. **Portaria Nº 84**, de 19 de outubro de 1992. Aprova as “Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de AIE”. **MAPA**. Disponível em < <http://ocj.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei> > acesso em 10/06/2006.

BRASIL . **Portaria Nº 162**, de 18 de outubro de 1994. Aprova Normas de Fiscalização e Controle Zoonosológico das Exposições, Feiras, Leilões, e outras aglomerações de animais. **MAPA**. Disponível em < <http://ocj.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei> > acesso em 10/06/2006.

BRASIL. **Portaria Nº 09**, de 03 de março de 1997. Regulamenta o modelo de passaporte para eqüinos de esporte praticantes das modalidades de salto, enduro, concursos hípico completo, volteio, pólo e hipismo rural. **MAPA**. Disponível em < <http://ocj.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei> > acesso em 10/06/2006.

BRASIL. 4º Seminário para Habilitação de Médicos Veterinários para o Diagnóstico da Anemia Infecciosa Eqüina. **MAPA** – LANAGRO - 2006, p 23 – 24.

BLOOD & RADOSTITS, **Clínica Veterinária** .Ed. Guanabara p 720 -721. 8ª edição – 1991.

CARPENTER, S.; EVANS, L.H.; SEVOIAN, M.; CHESEBRO, B. Role of the host immune response in selection of equine infectious anemia virus variants. **J. Virol.** v.61, p. 3783-3789, 1987.

CESAR, A.M. – Anemia Infecciosa Equina In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ANEMIA INFECCIOSA EQUÍNA, São Paulo, 1982. *Anais*. São Paulo, Instituto biológico de São Paulo,. p 13 -15,1982.

CHARMAN, H.P.; BLADEN, S.; GILDE, R.V.; COGGINS, L. Equine infectious anemia virus evidence favoring classification as a retrovirus. *J. Virol.* Washington, 19(2):1073 – 1976.

CLABOUGH, D. L – Equine Infectious anemia – The clinical signs, transmission, and diagnostic procedures – *Vet Med.* – **Equine Practice** – p.1007 – 1018 . 1990.

CLEMENTS, J.E.; ZINC, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infectious. *Clin. Microbiol. Rev*, v.9, n.1, p.100-117, 1996.

COGGINS, L. & NORCROSS, N.L., Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell. Vet.* Ithaca, v 60(2): p. 330-5, 1970.

COGGINS, L., NORCROSS, N.L., NUSBAUM S.R., Diagnosis of equine infectious anemia by imunodiffusion test, *Am. J. Vet. Res.* 33, 11 -18 , 1972

COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO R. C. Equine infectious anemia. In: STUDDERT, M. J. (Ed.). **Vírus infect. Vertebr.** Amsterdam: Elsevier Science, cap.25 p.295-323. 1996.

COOK, S. J. COOK, R.F.; MONTELARO, R.C. et al., Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet Microbiol.*, v 79, n.2, p 93 -109. 2001.

COSTA, M. D. *Caracterização demográfica e estrutura genética da raça M. Marchador*. (Tese – **Doutorado**) UFMG, 2002.Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais,Belo Horizonte. 99p,

CRAIGO J.K., LEROUX C., HOWE L., STECKBECK J.D., COOK S.J., ISSEL C.J., MONTELARO R.C., Transient immune supression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces

neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. *J. Gen. Virol.* 83 p. 1353-1359, 2002.

CAMPBELL, C. T.; NUSBAUM, S. R. Epidemiologic importance of interstate transport of equids infected with equine infectious anemia virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* V. 198, N.8, p. 1332 -1333, 1991.

CAMPBELL, R.S.; ROBINSON, W.F. The comparative pathology of the lentiviruses. *J. Comp. Pathol.* v.119, p. 333-395, 1998.

CRAWFORD, T.B.; McGUIRE, T.C.; HENSON, J.B. Detection of equine infectious anemia virus in vitro by immunofluorescence. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, Heidelberg, 34: 332-9, 1971.

DUPONT, O.; DACORSO FILHO, P.; MUCHALUAT, M.A. et al. Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1, 1968, Niterói. *Anais.* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.160-161.

EMBRAPA – Combate a anemia no Pantanal – *Haras Marchador*, n.2. p.30-32, 1993.

EQUINE INFECTIOUS ANEMIA. *OIE - International Animal Health Code*. Acesso em 07 abril 2005<<http://www.oie.int/fr/normes/manual/A>>

FENNER, F et al. *Veterinary Virology*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, , 1993.

FERRAZ, I.B.F.; REIS, J.K.P.;KROON, E.G.; LEITE, R.C.; FERREIRA, P.C.; Detection of infectious anemia viral DNA (provirus) in peripheral blood cells and ELISA test of one experimental infected horse. *Virus Reviews & Research.* V.2.n. 1-2p. p.198-199. 1997.

FERRAZ, I.B.F. *Produção experimental do antígeno para a prova de imunodifusão em anemia infecciosa equina.. Tese (Mestrado)*, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1990

FERRAZ, I.B.F. *Vírus da Anemia Infecciosa Equina: Amplificação por PCR do DNA proviral da gp90, comparação com o teste de ELISA e IDGA e variabilidade genética de amostras brasileiras*, 1998. **Tese (Doutorado)**, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FOIL L.D., MEEK, C. L., ADAMS, W.V et al.; Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal Of Veterinary Research*, v.44, n.11, p. 155-156, 1983.

GUERREIRO, M. G.; BAUER, A.G.; GLOSS, R.M.; VIDOR, T.; FARIAS, M.T.; TREINE.; MARCUSO, P.C. Simpósio sobre anemia infecciosa equina. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Desiderio Finamor* - Porto Alegre, 1 / 2 : 3 – 4, 1968.

GONDA, M.A.; CHARMAN, H.P.; WALKER, J.L., COGGINS, L. Scanning and transmission electron microscopic study of equine infectious anemia virus. *American Journal Of Veterinary Research* . Schaumburg, 39(5): 731-40, 1978.

GIELKENS, A.L.J. & TOMA, B. Development of a serologic ELISA for equine infectious anemia . In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA, São Paulo, 1982. *Anais*. São Paulo, Instituto biológico de São Paulo, 1982. p. 91-8.

GREENBERG, BERNARD – FLIES AND DISEASE, In: **BIOLOGY AND DISEASE TRANSMISSION** v. II - Princeton University Press, New Jersey 281 – 283p 1973

HAMMOND, S.A.; LI, F.; McKEON, B.M.S.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* v.74, p. 5968-5981, 2000.

HARROLD S.M., COOK S.J., COOK R.F., RUSHLOW K.K., ISSEL C.J. MONTELARO R.C., Tissue sites of persistent infection and active replication of equine

infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J. Virol.* 74, p. 3112 – 3121. 2000.

HAWKINS, J.A., ADAMS, W.V., WILSON, B.H. et al., Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 168, n.1, p.63-64, 1976.

HENSON, J. B.; McGUIRE, T.C. Equine infectious anemia. In CATCOTT. E.J.; SMITH, J. F . **Equine Medicine and Surgery** 2 . ed Wheaton: American Veterinary Publication, 1972. cap. 1. p. 35-43.

HORENSTEIN, A.L. & FEISTEIN. Rapid solid-phase radioimmunoassay for detection of equine infectious anemia viral antigen and antibodies parameters involved in standardization. *J. Virol. Methods.*, Amsterdam, 12: 1-11, 1985.

HU, W.S.; TEMIN, H.M. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*, v.250, p.1227-1233, 1990.

ISSEL, C.J.; CHARLES & LEROY COGGINS – Equine Infectious Anemia – Current Knowledge – *J. Am. Vet. Med. Assoc*, Vol 174 .n.7, p.727 -733 . 1979.

ISSEL, C.J., ADAMS W.V.J., MEEK L., OCHOA R., Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease. *J. Am. Vet Med Assoc.* 180; p. 272-275. 1982

ISSEL, C.J.; FOIL, L.D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.184, p.293, 1984.

ISSEL, C.J .; RUSHLOW, K.E.; FOIL, L.D.; MONTELARO, R.C. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Vet. Microbiol.*, v.17, p.251, 1988.

KONO & KOBAYASKI, K. Complement fixation test of equine infectious anemia. Specificity of the test. *Nat. Inst. Anim. Health.* Q., Tokyo, 6(3): 194-203, 1966.

KONO, Y.; Viremia and immunological responses in horse infected with equine infectious anemia virus. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 9(1):1-9, 1969.

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, v. 16, p. 8, 1976.

KONO, Y . Viremia and immunological responses in horse infected with equine infectious anemia virus. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 9 (1): 1-9, 1969.

LANGEMEIR, J. L., COOK, S.J., COOK, R.F., RUSHLOW, K E., MONTELARO, R.C., ISSEL, C.J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J.Clin. Micro.*, v.34, n.6, p. 1481-1487. 1996.

LEW A.M., THOMAS L.M., HUNTINGTON P.J., A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus, *Vet. Microbiol.* [V. 34](#) - p.1–5,1993.

LEROUX, CAROLINE.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J. Virol.*, v.71, p.9627-9639, 1997.

LEROUX, CAROLINE ; CRAIGO, J.K.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J. Virol.*, v.75, p. 4570-4583, 2001.

LEROUX, CAROLINE; JEAN-LUC CADORE, RONALD C. MONTELARO., Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us ? . *Vet. Res.* 35 p. 1 – 19 . 2004.

LIGNÉE, 1843, apud VALLÉE. U. & CARRÉ. H. Sur la nature infectieuse de l'anemia du cheval. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.*, Paris, 139: 331 – 3, 1904

MINISTERIO DA AGRICULTURA - Anemia infecciosa eqüina - Boletim De Defesa Sanitaria Animal,. Brasília – **MA**. 1974.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO - Anemia infecciosa eqüina. BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. – **MAPA**, Brasília – 2005.

MARTINS, M.F. *Diagnóstico da Anemia Infecciosa Eqüina em Soros de Eqüídeos de Diferentes Regiões do Estado de Minas Gerais: Comparação entre os Testes IDGA (p26) e ELISA Indireto (rgp90)*, 2004. **Tese (Mestrado)** Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.K.; PORTES, J.P.; SMITH, B.J.; NEWMAN, K.E. Comparison of diagnostic testes for the detection of equine infectious anemia antibody. *J.Vet. Diagn. Invest.*, n.1, v.1, p. 50-52, 1989.

McGUIRE. T.C. et al., Immunofluorescent localization of Equine Infectious Anemia Virus in Tissue – *Am. J. Pat.* Vol 62, No. 2 - p.283 – 294 , 1971.

McGUIRE T.C., TUMAS D.B., BYRNE K.M., HINES M.T., LEIB S.R., BRASSFIELD A.L., O'ROURKE K.I., PERRYMAN L.E., Major histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins, *J. Virol.* 68. p. 1459– 1467, 1994.

McGUIRE T.C., ZHANG W., HINES M.T., HENNEY P.J., BYRNE K.M., Frequency of memory cytotoxic T lymphocytes to equine infectious anemia virus proteins in blood from carrier horses, *Virology* 238p. 85–93, 1997.

MEALEY, R.H.; ZHANG, B.; LEIB, S.R.; LITTKE, M.H.; McGUIRE, T.C. Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus. *Virology*, v. 313, p. 537-552, 2003.

MONTELARO, R.C.; WEST, M.; ISSEL, C. J. Antigenic reactivity of the mayor glycoprotein of equine infectious anemia virus, a retrovirus, *Virology*, v. 136. p.368-374, 1984.

MONTELARO, R.C.; PARECKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J. Biol. Chem.* V 259, p. 10539-10540, 1984.

MONTELARO, R.C. ; R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. In: *Retroviridae*, v.2., New York: Plenum Press, 1993.

NAKAJIMA, H.; USHIMI, C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.*, v.3, p. 373-377, 1971.

NAKAJIMA, H.; FUKUNAGA, Y.; USHIMI, C. Titration of precipitating antibody in equine infectious anemia. *Nat. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 14 (1): 1-8, 1974.

KNOWLES D. JR., CHEEVERS W., MCGUIRE T., Stem T., Gorham J., Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritisencephalitis virus, *J. Virol.* 64, p.2396– 2398, 1990.

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, v. 16, p. 8, 1976.

KONO, Y. ; KOBAYASHI, K.; FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. *Arch. Gesamte Virusforsch*, v.41, p.1, 1973.b

KNOWLES, R.C. Equine infectious anemia. Status report in United States. *Proc. AM. Assoc. Equine Pract.*, Auburn 20: 89-95.1975

OAKS J.K., MCGUIRE T.C., ULIBARRI C., CRAWFORD T.B., Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J. Virol.* 72 p. 7263 – 7269. 1998.

OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. chapter 2.5.4  
5 th edition, 2004. <http://www.oie.int/eng/normes/manual/A>. Acesso em 20/05/2006.

OUCHTERLONY, O . Diffusion in gel methods for immunological analysis. In  
KALLOS, P. Ed. *Progress in allergy*. Basel. Karger, 1968. V. 5, P 1 -78 apud  
OUCHTERLONY, O. & NELSON, L.A. Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis  
In: Weir, P. M. Ed. *Immunochemistry*. 3 . ed., Oxford, Balckwell, 1978. p. 106-7.

PERRYMAN, L.E.; O'ROURKE, K.I.; McGUIRE, T.C. Immune responses are  
required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. *J. Virol.*,  
v. 62, p. 3073-3076, 1988.

REIS, R. *Anemia Infecciosa Equina – Diagnóstico Sorológico e Padronização do Teste  
de Imunodifusão*. 1984. **Dissertação (Mestrado)**. Escola de Veterinária. Universidade  
Federal de Minas Gerais -UFMG, Belo Horizonte.

REIS, J. K .P; MELO, L. M.; REZENDE, M. R.; LEITE, R. C. Use of an Elisa test in  
the eradication of an equine infectious anaemia focus. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.26,  
p.65-68, 1994.

REIS, J.K.P. *Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da Anemia  
Infecciosa Equina para uso em imunodiagnóstico*, 1997. **Tese (Doutorado)** Escola de  
Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REIS , J.K P.; CRAIGO, J.K.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C.  
Characterization of EIAV LTR variability and compartmentalization in various  
reservoir tissues of long-term inapparent carrier ponies. *Virology*, v. 311, p. 169-180,  
2003.

REIS, R. Prevalência y control de la aie em el Estado de Minas Gerais, Brasil:  
resultados preliminares. Separata do **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE  
ANEMIA INFECCIOSA DE LOS EQUINOS**, 1. Caracas, 1974. p. 1969 - 1973

SANTOS, M. E., Avaliação Da Reação Em Cadeia Da Polimerase (Pcr) Em PBMC e  
Lavado Broncoalveolar para o Diagnóstico Da Anemia Infecciosa Equina - **Dissertação**

(Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, UFMG- Belo Horizonte. 2006

SELLON, C. DEBRA.; FULLER, F.J.; MC GUIRE T. C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res.*, v. 32, p. 111 – 138. 1994.

SELLON, C. DEBRA.; PERRY, S.T.; COGGINS, L.; FULLER, F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J. Virol.*, v.66, p.5906-5913, 1992.

SELLON, C. DEBRA.; K.M.; RUSSELL, K.E.; PERRY, S.T.; COVINGTON, P.; FULLER, F.J. Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *J. Virol.*, v.70, p.590-594, 1996.

SENTSUI, H. & KONO, Y. Hemagglutination by equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.*, Washington, 14(2): p. 325-31, 1976.

SOUTULLO, A.; VERWIMP.; RIVEROS, M.; PAULI, R.; TONARELLI, G. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet Microbiol*, n. 79, p.111-121. 2001.

STEPHENS, R.M., DERSE, D., RICE, N.R., Cloning and characterization of cDNA encoding equine infectious anemia virus tat and putative vpr proteins. *J. Virol.*, v 64 p.3716-3725. 1990.

SUGIURA, T.; MATSUMURA, T.; FUKUNAGA, Y. Diagnosis of equine infectious anemia by enzyme-linked immunosorbent assay with viral antigen purified by affinity chromatography. *Bull. Equine Res. Inst.*; n.23, p.42-48. 1986.

SUGIURA, T. & NAKAJIMA H.; – Purification of equine infectious anemia virus antigen by affinity chromatography – *J. Clin. Microbiol.* V(5) 6 resume: p.635-639 – 1977.

SUGIURA.T & NAKAJIMA H. Indirect hemagglutination test in equine infectious anemia . *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 46(1): 60-4, 1982.

SILVA, R. A., SIVA, N.M.; FREITAS, W.M.; DEAK, MH.R.; ANDRE, C.A.F. A ocorrência da anemia infecciosa no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIA, & CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968 . *Anais*. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 173 – 82,1968.

SILVA, R, A. M. S.; ABREU, U.G. P.; BARROS, A T. M. **Anemia infecciosa eqüina** : epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. Corumbá: *EMBRAPA Pantanal*, 2001.

SUZUKI, T., UEDA, S.; SAEJIMA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anemia. *Vet Microbiol.* V.7, p.307-315. 1982.

SHEN R., WANG Z.M., Development and use of an equine infectious anemia donkey leukocyte attenuated vaccine, in: Tashjian R. (Ed.), *Equine Infectious Anemia: a national review of policies, programs, and future objectives*, Amarillo, Texas, p. 135–148. 1985.

TAJIMA, M., NAKAJIMA, H., ITO, Y. Electron microscopy of equine infectious anemia. *J. Virology.*, Washington,4(4):521-7, 1969

TOMA, B. Persistent negative serologic reaction in a mare infected with equine infectious anemia virus. *Recl. Med. Vet.*, v.156, p.55-63, 1980. .

USHIME, C., HENSON, J.B.,GORHAM, J.R. Study of the one stepgrowth curve of equine infectious anemia vírus by immunofluorescence. *Infect Imm.*, v. 5, n.6, p. 890-895.1972.

USHIME, C.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, S. Demonstraion of equine infectious anemia viral antigen by immunofluoresce. *Natl. Inst. Anim Health.Q.*, Tokyo, 10(2): 90-1, 1970.

ZHANG, J.; TEMIN, H.M. Rate and mechanism of non homologous recombination during a single cycle of retroviral replication. *Science*, v.259, p.234-238, 1993.

WATANABE, S. Studies on equine infectious anemia virus in tissue culture ii. Serial cultivations of equine infectious anemia virus in the tissue cultures derived from the horse and its reversion test to the horse. *JPN. J. VET. Sci.*, Tokyo, 22(2): 79 -88, 1960

WATANABE, S. Studies on equine infectious anemia virus in tissue culture . In Examination of a new methods of virus cultivation. *JPN. J. VET, Sci.* Tokyo, 22(3): 215-222.

a. <[www.ictvdb.com](http://www.ictvdb.com) >/Retroviridae\_ – vírus descriptions – 2002 - acesso em 10/02/2005; 5/03/2005; 10/07/2005; 30/05/2006; 5/06/2006.

b. <[www.abccm.gov.br/historia](http://www.abccm.gov.br/historia)>– acesso em 05/05/2006.

c. <[www.abccmm.gov.br/historia](http://www.abccmm.gov.br/historia)>\_ – acesso 10/05/2005/21/02/2006

d. <[http://www.agricultura.gov.br/dfa/ssa\\_rj](http://www.agricultura.gov.br/dfa/ssa_rj)>. acessos em 30/05/2005, 20/06/2005, 05/10/2005, 05/12/2005, 06/01/2006/, 26/02/2006/, 16/03/2006, 18/05/2006, 22/06/2006.

e. <[www.crmv.rj.gov.br/editorial](http://www.crmv.rj.gov.br/editorial)> II 2004 –Journal do CRMV- RJ ANO XIX n. 155 junho/2004., acesso em 20/01/2007

---

## **Fórmulas**

### 1.1 Gel a 1%

- Ágar nobre.....1%.
- Tampão borato ..... 100 mL

### 1.2 Tampão Borato

- Hidróxido de Sódio (NaOH)..... 2,0 g.
- Ácido Bórico ( $H_3BO_3$ )..... 9,0 g.
- Água destilada q.s.p.....1.000 mL.