

Padronização de um ELISA indireto a partir da utilização de uma proteína de superfície do vírus da anemia infecciosa equina como antígeno para o diagnóstico dessa enfermidade*

Standardization of an indirect ELISA using a surface protein of the equine infectious anemia virus as an antigen for the diagnosis of this disease

Kaique Santos da Silva,** Bruno Passos Fernandes,*** Robson Bahia Cerqueira****

Resumo

A anemia infecciosa equina é uma importante enfermidade que acomete os equídeos em todo o mundo, se apresentando de forma aguda, crônica e assintomática causando grandes prejuízos para a economia tanto para criadores que vivem do trabalho desses animais quanto aos criadores que investem no melhoramento das raças, impedindo o acesso ao mercado tanto nacional quanto internacional. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento considera o IDGA como teste oficial para diagnóstico dessa enfermidade, porém essa técnica é demorada e muita vez acaba sendo subjetiva, dependendo da experiência particular de cada Laboratorista. Além de não conseguir detectar animais no início da infecção. Logo, a necessidade de se buscar novas técnicas como o ELISA indireto que aperfeiçoem o tempo de análise dos resultados, facilita a automação e obtém resultados confiáveis. O estudo realizado teve como objetivo padronizar uma técnica de ELISA indireto utilizando uma proteína de envelope viral GP90 como antígeno para diagnóstico da anemia infecciosa equina. Avaliando o desempenho do teste a partir da sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo. Os valores obtidos foram: 91,11%, 93,33%, 91,11% e 93,33% respectivamente. Concluiu-se que o teste apresenta bom desempenho, além da possibilidade de detectar animais positivos no início da infecção.

Palavras-chaves: teste imunoenzimático, lentivirus, AIE.

Abstract

Equine infectious anemia is an important disease that affects horses all over the world, presenting in an acute, chronic and asymptomatic way, causing great damage to the economy, both for breeders who live off the work of these animals and for breeders who invest in the improvement of breeds, preventing access to both national and international markets. The Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply considers AGID to be the official test for diagnosing this disease, but this technique takes time and often ends up being subjective, depending on the particular experience of each laboratory worker. In addition to not being able to detect animals at the beginning of the infection. Therefore, the need to seek new techniques such as indirect ELISA that improve the time of analysis of results, facilitate automation and obtain reliable results. The aim of this study was to standardize an indirect ELISA technique using a GP90 viral envelope protein as an antigen for the diagnosis of equine infectious anemia. Evaluating test performance based on sensitivity, specificity and positive and negative predictive values. The values obtained were 91.11%, 93.33%, 91.11 and 93.33 respectively. It was concluded that the test performs well, in addition to the possibility of detecting positive animals at the beginning of the infection.

Keywords: enzyme immunoassay, lentivirus, AIE.

Introdução

O conjunto de atividades que são geradas em torno da equinocultura no Brasil, movimentam cerca de R\$ 7,5 Bilhões anualmente na economia do país, e gera em torno de 3,2 milhões de empregos direta e indiretamente, possuindo uma tropa aproximada de mais de 5,5 milhões de animais. Apenas no ano de 2011 foi arrecadada uma quantia aproximada de R\$400 milhões em leilões de equinos (Lima *et al.*, 2012).

Segundo Flores e colaboradores (2007), a anemia infecciosa equina (AIE) é causada por um lentivírus, que pertence à família Retroviridae, sendo considerada uma das principais enfermidades infectocontagiosas ligada a equideocultura. A AIE afeta diretamente as atividades ligadas ao cavalo, bem como o desenvolvimento da equinocultura no país. Trata-se de uma enfermidade transmissível que não existe cura, gerando grandes prejuízos por impedir o transporte e comercialização de animais, o acesso a mercado internacional bem como o

*Recebido em 16 de dezembro de 2022 e aceito em 8 de fevereiro de 2023.

**Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. E-mail: kaiquesantos.s@outlook.com.

***Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. E-mail: brunofernandesnv@gmail.com. Autor de correspondência.

****Professor Doutor no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. E-mail: robsonba@gmail.com.

melhoramento das raças (MAIDANA, 2011; ALMEIDA, *et al.* 2006). O presente trabalho teve como objetivo padronizar um teste de ELISA indireto utilizando fração proteica de superfície do Lentivirus que causa a Anemia Infecciosa Equina.

Materiais e métodos

Obtenção do banco de soro

Foram obtidas 700 amostras de soro equino, oriundas do município de Bom Jesus da Lapa, doadas gentilmente pelo médico veterinário/fiscal da ADAB Jorge Raimundo Lins Ribas, responsável técnico pelo Laboratório de Sanidade Animal LADESA. Do total das 700 amostras, foram separadas 45 amostras positivas e 45 amostras negativas ao IDGA para padronização do teste ELISA indireto.

Antígeno de envelope viral

Foi utilizado uma proteína recombinante gp90, diluída em tampão carbonato mM (pH 9,0) na concentração de 0,5µg. Esse antígeno foi obtido através de doação pelo LADESA/ADAB-BA.

Padronização do ELISA indireto

Inicialmente verificou-se a melhor diluição do antígeno e do soro. Para isso, foi utilizado uma placa de polietileno de 96 poços, que foi sensibilizada utilizando 100µl do antígeno diluído em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 nas proporções 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200. Após sensibilização a placa foi mantida overnight durante 20 horas em câmara úmida a 7°C. Em seguida a placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato salino (Phosphate buffer saline) acrescido de 0,05% de tween-20 (PBS-T). O próximo passo foi bloquear a placa usando solução de PBS-T com 5% de leite desnatado utilizando 200µl por poço e colocado na estufa a 37°C por 2 horas, após a retirada a placa foi lavada 2 vezes com PBS-T. A diluição do soro foi feita em solução de PBS-T com 1% de leite desnatado nas proporções 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 colocando 100µl por poço de cada diluição em duplicata para as repetições branco, positivo e negativo e levadas a estufa durante 1 hora a 37°C em seguida a placa foi lavada 5 vezes com solução PBS-T.

Após a lavagem utilizou-se 100µl por poço de solução contendo conjugado de imunoglobulina total diluído em PBS-T na proporção 1:2000 seguindo para a estufa e permanecendo por 1 hora a 37°C e em seguida lavada por 5 vezes com PBS-T. Na fase de revelação foi utilizado 100µl pro poço da solução reveladora (10ml de tampão cítrico pH 5,1; 0,004g de 1,2 phenylenediamine/OPD e 4µl de água oxigenada 10%) a placa foi reservada longe do alcance de luz e logo após foi interrompida a reação utilizando 50µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Terminado o processo realizou-se a leitura de densidade ótica no filtro de 492nm e avaliados os resultados.

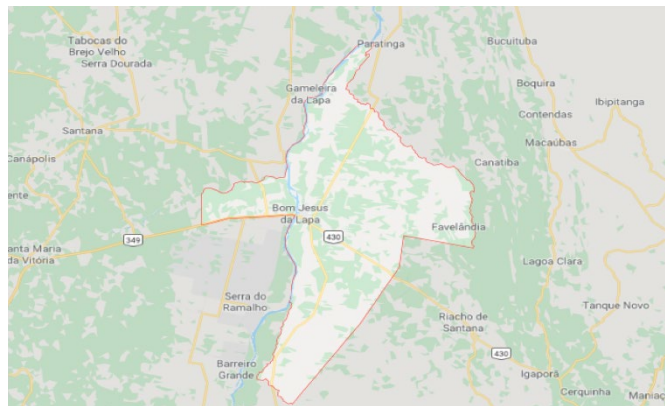
Após avaliação, ficou definido a diluição 1:1600 para o antígeno e 1:100 para o soro, sendo estas aplicadas na população. Além das amostras de soro controle utilizadas para definir melhor diluição do antígeno e do soro, foram testadas 45 amostras positivas e 45 amostras negativas na Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA), teste considerado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como padrão ouro no diagnóstico da anemia infecciosa equina. Após realização de todo processo os valores de densidade ótica foram obtidos a partir de leitora de

microplaca, e analisados estatisticamente para determinar a eficiência e desempenho do teste.

Aplicação do ELISA indireto padronizado

Após padronização do teste de ELISA indireto, o mesmo foi aplicado em 610 amostras de soro equino oriundas do município de Bom Jesus da Lapa, situada na mesorregião do vale São-Franciscano da Bahia, situada a 796 quilômetros a oeste da capital estadual, Salvador. Apresenta latitude de 13°15'18"S e longitude de 43° 25' 05" W da linha do equador, altitude de 436m em relação ao nível do mar e uma área de 4148,5 km² com um efetivo do rebanho equino de 2653 animais segundo censo do IBGE 2017.

Figura 03: Localização geográfica do município de Bom Jesus da Lapa – BA



Avaliação estatística

O "cut-off" ou ponto de corte foi determinado através do cálculo da média de animais não reagente acrescido de quatro vezes o desvio padrão populacional baseado em Putini (*et al.*, 2008).

Para determinação do "cut-off" foram utilizados valores de densidade ótica de animais positivos e negativos no teste de IDGA considerado pelo MAPA como padrão ouro no diagnóstico da anemia infecciosa equina como demonstrado na fórmula abaixo.

$$\text{Cut-off} = \text{Média aritmética de não reagentes} + 4 \cdot \text{Desvio padrão populacional}$$

Para validação do teste foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade de acordo estudo realizado por Putini (*et al.*, 2008).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Doentes detectados pelo teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Sadios negativos no teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

Os valores preditivos positivo e preditivo negativo foram calculados de acordo estudo realizado por Carminati (2005) obedecendo as seguintes formulas:

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Positivos verdadeiros} + \text{falso positivos}}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{Negativos verdadeiros}}{\text{Negativos falsos} + \text{Negativos verdadeiro}}$$

Resultados e discussão

Para determinação do ponto de corte foi utilizado a média aritmética dos valores de densidade ótica de 45 amostras de soro equino, com resultado negativo para anemia infecciosa equina no teste de IDGA, acrescido de 4 vezes o desvio padrão dessa mesma população, como preconizado por Putini (*et al.*, 2008), obtendo o valor de 0,241 como ponto de corte, demonstrado na fórmula abaixo.

$$\text{Cut-off} = \text{Média aritmética de não reagentes} + 4 \cdot \text{Desvio padrão populacional}$$

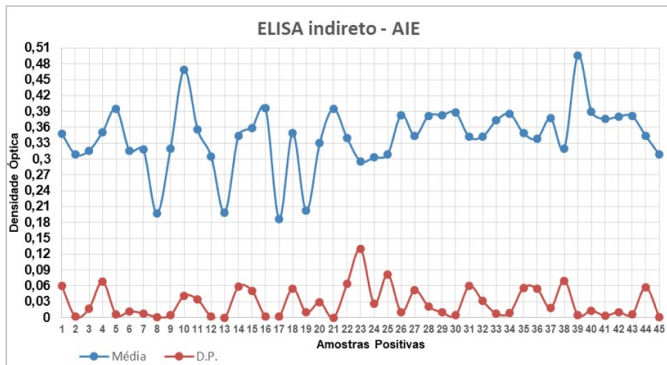
$$\text{Cut-off} = 0,176267 + (4 \cdot 0,016279)$$

$$\text{Cut-off} = \mathbf{0,241}$$

A partir do ponto de corte foram utilizadas 45 amostras positivas e 45 amostras negativas no IDGA, para calcular a sensibilidade e a especificidade do teste padronizado. Os cálculos foram feitos seguindo estudos realizados por Putini (*et al.*, 2008).

Os valores de absorbância com o teste ELISA indireto variaram de 0,496 a 0,187 para as 45 amostras positivas no teste de IDGA, sendo que 41 ficaram com valores de densidade ótica acima do ponto de corte (0,241), sendo considerada amostras positivas no teste padronizado e 4 amostras obtiveram valores de densidade ótica menores que 0,241, sendo consideradas amostras negativas para o teste padronizado. Esses dados foram utilizados para calcular a sensibilidade do teste.

Figura 4: Densidade ótica de soros de equinos positivos para anemia infecciosa equina no IDGA.



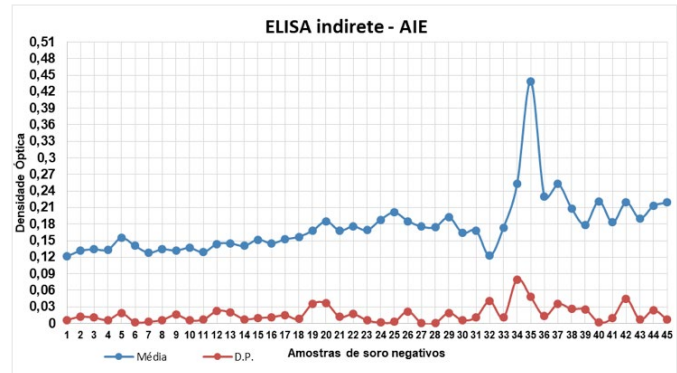
$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Doentes detectados pelo teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{41}{45} \cdot 100$$

$$\text{Sensibilidade} = \mathbf{91,11\%}$$

Para as 45 amostras negativas no teste de IDGA, os valores de absorbância variaram de 0,438 a 0,1215, sendo que 42 obtiveram valores de densidade ótica abaixo de 0,241, sendo consideradas negativas para o teste padronizado e 3 amostras obtiveram valores de densidade ótica acima de 0,241, sendo consideradas amostras positivas. Esses dados foram utilizados para calcular a especificidade do teste como descrito na fórmula a seguir:

Figura 5: Densidade ótica de soros de equinos negativos para anemia infecciosa equina no IDGA.



$$\text{Especificidade} = \frac{\text{saídos negativos no teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{42}{45} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \mathbf{93,33\%}$$

Verificou-se 91,11% de sensibilidade, e 93,33% de especificidade para o teste proposto. Apresentando boa sensibilidade, isto é alta capacidade de detectar animais doentes em uma população, e alta especificidade, isto é, alta capacidade de detectar falsos positivos, confirmando com alta eficiência os verdadeiramente negativos.

Os valores obtidos para preditivos negativos e preditivos positivos foram seguindo as fórmulas estudadas Carminati (2005), chegando aos seguintes valores:

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Positivos verdadeiros} + \text{falso positivos}}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{41}{41 + 4}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = 0,9111 \cdot 100$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \mathbf{91,11}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{Negativos verdadeiros}}{\text{Negativos falsos} + \text{Negativos verdadeiro}}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{42}{3 + 42}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = 0,9333 \cdot 100$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \mathbf{93,33}$$

Tais valores demonstram que dentre uma população de 100 animais o teste é capaz de confirmar 91,11% dos positivos, apresentando bom desempenho, e dentro da mesma população 93,33% dos negativos serão confirmados pelo teste.

Quando aplicado o teste padronizado nas amostras oriundas do município de Bom Jesus da Lapa obteve-se os seguintes resultados: das 610 amostras 35 (5,73%) foram positivas com densidade óptica maior ou igual a 0,241 e 575 (94,27%) foram negativas com valores de densidade óptica menores que 0,241.

Figura 6: Resultado do ELISA indireto para amostras de soro equino do município de Bom Jesus da Lapa.



O teste de IDGA, é considerado como método oficial, logo utilizado como padrão ouro em muitas análises para o diagnóstico da anemia infecciosa equina, mesmo possuindo uma sensibilidade limitada e uma demora considerável na obtenção dos resultados, bem como potencial limitado para automação e otimização. Além do que a interpretação dos resultados muitas vezes acaba sendo subjetiva, dependendo da experiência particular de cada indivíduo que está analisando. Por conta disso há uma necessidade de novas técnicas de diagnóstico com o objetivo de agilizar o resultado dos testes, para que os órgãos de defesa possam agir de forma rápida e eficaz (RIBEIRAL, 2006; SANTOS, et al., 2011).

A utilização de novas técnicas como o ELISA, pode ajudar a identificar animais infectados com baixos títulos de anticorpos, o que ocorre nas fases iniciais da doença, em que o teste de IDGA ainda não é capaz de identificar (CRUZ, et al., 2009).

O presente trabalho obteve resultados de especificidade maiores que sensibilidades, sendo 91,11% e 93,33% respectivamente. O valor de especificidade encontrado pelo teste situa-se entre os valores de Martins (2004) e Motta (2007), onde os valores obtidos foram de 96,16% e 89,59%. Porém a sensibilidade do teste ficou a baixo do encontrado por Martins (2004) e Motta (2007) que foram de 97,81% e 93,42%.

A leitura de densidade óptica das 45 amostras positivas no teste de IDGA, variaram de 0,496 a 0,187, sendo que 4 amostras ficaram com resultado abaixo do ponto de corte 0,241 sendo consideradas negativas pelo ELISA. Esses resultados positivos

no IDGA e negativos no ELISA são argumentados por Martins (2004) e Motta (2007) como a possibilidade de reação cruzada com outros retrovírus no teste de IDGA (LANGEMEIER et al., 1996), ou pelo fato de surgirem novas variedades genéticas, que possam ter sofrido mutação do gene env, não sendo detectado pelo teste ELISA que utiliza antígeno gp90 (REIS et al., 2003).

Nas 45 amostras positivas no IDGA, a variação de densidade óptica foi de 0,438 a 0,1215, sendo que 3 amostras foram consideradas positivas, por obter valores maiores que o ponto de corte 0,241. Essas amostras negativas no IDGA e positivas no ELISA são constantemente explicadas pelo fato do teste ELISA ser mais precoce, podendo detectar pequenos índices de anticorpos, sendo possível a identificação no início da infecção (OIE, 2019).

Segundo Reis (1997) os anticorpos anti-gp90 são detectados antes do que os anti-p26 que são utilizados no IDGA. Entretanto Coutinho et al (2013) padronizou um ELISA indireto utilizando antígeno rp26, e analisou 101 amostras IDGA-positivas e 704 IDGA-negativas no novo ELISA encontrando uma excelente concordância entre os testes. A sensibilidade e especificidade relativa foram de 97% e 97,9% respectivamente, obtendo índices melhores que o presente trabalho que utilizou antígeno gp90.

Issel (2013) descreve que um programa nacional de vigilância na Itália, comparou o uso do IDGA e o ELISA, e comprovou que utilizando o IDGA como triagem e o ELISA ou imunoblot como teste confirmatório há um aumento na detecção de animais positivos em até 17%.

Martins (2004) afirma que a sensibilidade agregada no IDGA e do ELISA pode aumentar em até 25%, pois os dois testes juntos vão detectar as duas principais proteínas do VAIE (p26 e gp90).

Logo, pode-se corroborar as indicações da utilização do ELISA como teste de triagem para AIE pois apresenta bons índices de sensibilidade e especificidade além de conseguir detectar anticorpos na fase inicial da doença.

Conclusão

O teste de IDGA, é considerado como método oficial, logo utilizado como padrão ouro em muitas análises para o diagnóstico da anemia infecciosa equina, mesmo possuindo uma sensibilidade limitada e uma demora considerável na obtenção dos resultados, bem como potencial limitado para automação e otimização. Além do que a interpretação dos resultados muitas vezes acaba sendo subjetiva, dependendo da experiência particular de cada indivíduo que está analisando. Por conta disso há uma necessidade de novas técnicas de diagnóstico com o objetivo de agilizar o resultado dos testes, para que os órgãos de defesa possam agir de forma rápida e eficaz (RIBEIRAL, 2006; SANTOS, et al., 2011).

A utilização de novas técnicas como o ELISA indireto, pode ajudar a identificar animais infectados com baixos títulos de anticorpos, o que ocorre nas fases iniciais da doença, em que o teste de IDGA ainda não é capaz de identificar (CRUZ, et al., 2009).

Referências

- ALMEIDA, V. M. A. *et al.* Anemia infecciosa eqüina: prevalência em eqüídeos de serviço em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 2, p.141-148, 2006.
- ALVAREZ, I. *et al.* Padronização e validação de um teste de imunodifusão em gel de agar para o diagnóstico de anemia infecciosa dos eqüídeos, utilizando um antígeno p26 recombinante. **Vet. Microbiol.**, v.121, p.344-351, 2007.
- BALL, J. M.; PAYNE. S. L.; ISSEL. C. J.; MONTELARO, R. C. EIAV Genomic Organization: Further Characterization by Sequencing of purified Glycoproteins and DNA. **Virology**. n.165, p. 601 – 605. 1998.
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 17, de 8 de maio de 2008, da secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em : <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 04 de maio de 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45 de 15 de Junho de 2004. Aprova as Normas para a Prevenção e o Controle da Anemia Infecciosa Equina - A.I.E. **Diário Oficial da União**, Seção 1:7, 2004.
- CARPENTER, S.; EVANS, L. H.; SEVOIAN, M.; CHESEBRO, B. Role of the roost immune response in selection of equine infectious anemia virus variants. **Journal of Virology**, v.61, n.12, p.3783-3789, 1987.
- CARMINATI, R. **Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- CARVALHO JÚNIOR, O. M. Anemia Infecciosa Eqüina - A "AIDS" do Cavalo. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, v. 1, p. 16 - 23, 1998.
- CAVALCANTE, P. H. **Risco de transmissão do vírus da anemia infecciosa eqüina por eqüídeos errantes no município de Mossoró-RN**. 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal: produção e sanidade animal), Universidade federal rural do semi-árido (UFERSA), Mossoró, 2009.
- CHAVES N P, BEZERRA D C, SANTOS H P, PEREIRA H DE M, GUERRA P C, SILVA A L. Ocorrência e fatores de risco associados à identificação da anemia infecciosa eqüina em eqüídeos de tração. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.3, p. 301-306, jul./set. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cab/v15n3/a08v15n3.pdf>
- CICCO, L. H. S., **Anemia Infecciosa Equina**. Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br/2015/11/24/anemia-infecciosa-equina/>Acesso em 06 de julho de 2019.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immuno-diffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Veterinary**, v.60, p.330-335, 1970.
- COOK, R.F.; LEROUX, C. & ISSEL, C.J. 2013. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. **Veterinary Microbiology** 167(1- 2): 181-204.
- COUTINHO, L. C. A.; JESUS, A. L. S.; FONTES, K. F.L. P.; COIMBRA, E. C.; MARIZ, F. C.; FREITAS, A. C.; MAIA, R. C. C.; CASTRO, R. S.. Production of Equine infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological methods**. P. 95-100, 2013.
- CRAIGO, J.K.; MONTELARO, R.C. **Equine Infectious Anemia Virus**. Encyclop. of Virol., 2.ed., vol.2, p.167-174, 2008.
- CRUZ, R. B.; PUTINI, V. B.; SANTANA, G. S.; JORGE, J. S.; COELHO, I.; SILVA, D. L.; ZACHARIAS, F.; TIGRE, D.; CERQUEIRA, R. B..Estudo comparativo da sensibilidade e da especificidade de elisa indireto com o teste de imunodifusão em gel de agarose no diagnóstico sorológico da artritecefalite caprina (CAEV). **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 355-364, jul./set. 2009
- DONOVAM, R. M. Retroviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. p.411-426.
- EVANS, K.S. *et al.*. Doenças causadas por vírus e clamídias. In: BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O. **Clínica Veterinária**. 9 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S/A, 2002, p.927-930.
- FENNER, F.J., *et al.* **Veterinary Virology**. 2ª ed. Academic Press, Inc. San Diego, p.666, 1993.
- FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Editoraufsm. p. 829-831, 2007.
- FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C. Anemia infecciosa eqüina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 197-207, 2011.
- GUIMARÃES L. A. *et al.* Prevalência do Vírus da Anemia Infecciosa Equina na Mesorregião do Sul Baiano, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 33, n. 2, p. 1-5, 2011.
- HAMMOND, S. A.; LI, F.; MCKEON, B. M.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Immune Responses and Viral Replications in Long-Term Inapparent Carrier Ponies Inoculated with Equine Infectious Anemia Virus. **Journal of virology**, v.74, n.13, p.5968-5981, 2000
- LANGEMEIER, 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 longterm inapparent carrier animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.6, p.14817, 1996.
- LEROUX, C.; CADORÉ, J.L.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV): What has HIV's country cousin got to tell us?. **Vet.Res.**, v.35, p.1-19, 2004.
- Lima, R. A. S.; Oliveira R.A.; Mendes C.Q.; Perfil e tendências da equideocultura brasileira. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 49, 2012, Brasília. Anais...Brasília, 2012.
- MAIA, C.A. *et al.* Anemia Infecciosa Eqüina – Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 11, Ed. 158, Art. 1067, 2011.
- MAIDANA N. A.; BASSANEZI R. C.; Modelagem da dinâmica da anemia infecciosa eqüina. **Biomatemática**. 2011; 21: 87-102.
- MAPA. PORTARIA Nº 378, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014, Anexo a Portaria Nº 84 d 19 de Outubro DE 1992. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Anemia Infecciosa Eqüina. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em:<<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasaniaanimal/files/2012/10/PORTARIA-N%C2%BA-84-DE-19-DE-OUTUBRO-DE-1992.-Aprova-as-Normas-de-Credenciamento-e-Monitoramento-de-Laborat%C3%B3rios-de-Anemia-Infecciosa1.pdf>>. Acesso em: 05 de junho, 2019.
- MAPA. PORTARIA Nº 378, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014, Anexo a Portaria Nº 84 d 19 de Outubro DE 1992. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Anemia Infecciosa Eqüina. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em:<http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/2337_GED.pdf>. Acesso em: 05 de junho de 2019.
- MARTINS, M. F. **Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rpp90) no diagnóstico da anemia infecciosa eqüina**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.