

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

**CLIDILENE NOGUEIRA DE ALENCAR**

**REAÇÕES INESPECÍFICAS EM TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS PARA  
DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA E MORMO**

**São Luís**

**2014**

**CLIDILENE NOGUEIRA DE ALENCAR**

**REAÇÕES INESPECÍFICAS EM TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS PARA  
DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA E MORMO**

Dissertação apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do grau de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

São Luís

2014

Alencar, Clidilene Nogueira de.

Reações inespecíficas em técnicas imunológicas para diagnóstico de anemia infecciosa equina e mormo / Clidilene Nogueira de Alencar.– São Luís, 2014.

65f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Praseres Chaves

1.Equinos. 2.AIE. 3.Mormo. 4.IDGA. 5.Fixação de complemento. I.Título

CDU: 636.1.09

**CLIDILENE NOGUEIRA DE ALENCAR**

**REAÇÕES INESPECÍFICAS EM TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS PARA  
DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA E MORMO**

Dissertação apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do grau de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Daniel Praseres Chaves  
Orientador

---

Profa. Dra. Lúcia Coêlho Alves  
(1º Membro)

---

Prof. Dr. Cláudio Luís Nina Gomes  
(2º Membro)

São Luís  
2014

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho Daniel de Alencar Miranda  
por ser a minha motivação diária na  
busca pela realização de novos sonhos.  
Aos meus pais, pela dedicação e apoio  
em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me permitir usufruir com saúde e alegria deste momento de aprimoramento profissional, tão aguardado e desejado.

À Professora Francisca Neide pela perseverança e por acreditar na realização do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal (MPDSA) da Universidade Estadual do Maranhão.

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão pelo convênio estabelecido com a UEMA e CAPES, dando-nos a oportunidade de retornar ao universo acadêmico.

À UEMA e seus professores que receberam com carinho os profissionais médicos veterinários da primeira turma do MPDSA.

Ao Prof. Daniel Praseres Chaves, pela paciência, tranquilidade e generosidade na orientação da presente pesquisa.

A toda a equipe do Laboratório Cernitas pela gentileza e auxílio na execução das análises laboratoriais, em especial a Erlin, Analy, Zulmira e Amadeu.

Aos proprietários dos centros de treinamento de tambor e baliza, Luis Almeida Silva, Ivaldo Castelo Branco e Antonio Luis Costa pela confiança e por permitirem a utilização dos seus animais para realização desta pesquisa, assim como aos seus funcionários: tratadores e treinadores.

Aos médicos veterinários Antônio Cleto Pinheiro Junior e Rosany Cunha Aranha pelo apoio e tempo disponibilizado.

Aos técnicos de fiscalização agropecuária da AGED/MA da Unidade Regional de São Luis, Pedro Gualter e Flabriso Henrique Silva assim como à acadêmica de medicina veterinária, Débora Gomes pela valiosa ajuda durante as vacinações e coletas.

A Anali Linhares, Nancyleni Chaves e Danilo Brito pelo apoio na análise estatística.

Ao meu esposo Robem Miranda pelo companheirismo de todas as horas e principalmente, por compreender os meus momentos de ausência e isolamento.

À tia Dora pelos cuidados dedicados ao meu filho Daniel quando não estive presente.

Enfim, a todos os meus amigos e familiares pelo incentivo, pelas sugestões e críticas que contribuíram de alguma forma para o amadurecimento e conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

*“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade”.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

ALENCAR, C. N. **Reações inespecíficas em técnicas imunológicas para diagnóstico de anemia infecciosa equina e mormo.** 2014. 65f. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

Anemia Infecciosa Equina e Mormo são as enfermidades mais importantes sob o ponto de vista sanitário e econômico para a equideocultura, de acordo com o Programa Nacional de Sanidade dos Equinos (PNSE), por não possuírem tratamento e vacinas eficazes. Para controlar essas enfermidades, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu medidas sanitárias obrigatórias em todo território nacional que incluem o diagnóstico oficial pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para AIE e Fixação de Complemento (FC) para Mormo, e o sacrifício dos animais soropositivos. Para verificar e avaliar a ocorrência de reações inespecíficas pelas técnicas de IDGA e FC utilizou-se 78 equinos soronegativos para AIE e Mormo, divididos em grupos e inoculados com diferentes vacinas. Após uma semana, os animais foram submetidos a cinco controles sorológicos, intercalados em sete dias. Os resultados indicaram que o uso de vacinas em equinos em período que antecede a realização de exames laboratoriais para diagnóstico de AIE e Mormo, não induz a soroconversão, uma vez que todos os animais confirmaram resultados negativos. Entretanto, 11,11% dos equinos vacinados contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina e tétano, e 15,38% daqueles vacinados contra leptospirose apresentaram reações negativas inespecíficas ao IDGA. Através deste estudo, a verificação de reações negativas inespecíficas ao IDGA para diagnóstico de AIE demonstra um tipo de resultado não abordado pela Portaria nº 84/1992 – SDA/MAPA, e que, portanto, serve para fundamentar alterações na legislação vigente sobre o diagnóstico dessa enfermidade.

**Palavras-chave:** equinos, AIE, Mormo, IDGA, Fixação de Complemento (FC).

## ABSTRACT

ALENCAR, C. N. **Unspecific reactions in immunoassay technical for diagnosis of EIA and Glanders**. 2014. 65p. Dissertation (Professional Master's in Animal Health Protection) – State University of Maranhão, São Luís, 2014.

Equine Infectious Anaemia and Glanders are the most important illnesses under the sanitary and economic point of view for herds of equines, according to the National Program of Sanitary Equine (PNSE) since do not own treatment and effective vaccines. To control these illnesses, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply instituted compulsories sanitary measures in every national territory that include the official diagnosis by agar gel immunodiffusion test (AGIDT) for EIA and Complement Fixation (CF) for Glanders, and the sacrifice of the animals that are positive. To verify and to evaluate the occurrence of unspecific reactions by AGIDT and CF, it used 78 negative equine for EIA and Glanders, divided in groups and inoculated with different vaccines. After a week, the animals were submitted to five serology controls, repeated every seven days. The results indicated that the use of vaccines in horses before the official exams does not induce the seroconversion, since all the animals confirmed negative results. However, 11.11% of the horses vaccinated against influenza, encephalomyelites, equine rhinopneumonitis and tetanus, and 15.38% of those vaccinated against leptospirosis presented nonspecific negative reactions to AGIDT. Through of this study, the verification of nonspecific negative reactions in AGIDT for EIA's diagnosis it demonstrates a kind of result not boarded by the Portaria nº 84/1992 – SDA/MAPA and, therefore, it will be able to base alterations in the valid legislation about diagnosis of this illness.

**Keywords:** Equine, EIA, Glanders, AGIDT, Complement Fixation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição da Anemia Infecciosa Equina (jul-dez. 2013).....	20
Figura 2 - Leituras da prova de IDGA demonstrando reações positivas (+) e reações negativas (-). .....	26
Figura 3 - Possíveis reações no teste IDGA (Teste de Coggins) e exemplos de linhas inespecíficas. ....	26
Figura 4 - Mapa da distribuição do Mormo (jul – dez. 2013). ....	30
Figura 5 - Reações negativas e positivas observadas na técnica de Fixação de Complemento (FC).....	35
Figura 6 - Representação esquemática da lâmina preparada para IDGA. A - orifício central para o antígeno; SP - orifícios para soro padrão; 1 a 9 – orifícios para soros testes.....	42
Figura 7 - Rotulagem das microplacas para titulação de soro na técnica de Fixação de Complemento .....	43
Figura 8 - Linha inespecífica (poço 2) em resultado negativo ao IDGA observada em equino vacinado contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina e tétano. ....	48
Figura 9 - Linha inespecífica (poço 3) do tipo simples, suave e opaca em resultado negativo ao IDGA observada em equino vacinado contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina e tétano. ....	48
Figura 10 - Linha inespecífica simples, levemente curva, suave e brilhante (poço 2) em resultado negativo ao IDGA observada em equino vacinado contra leptospirose.....	49
Figura 11 - Reação negativa inespecífica (poço 1) com linhas inespecíficas compostas (duplas), retas e opacas em resultado negativo ao IDGA verificadas em equino vacinado contra leptospirose. ....	49
Figura 12 - Linhas inespecíficas duplas e brilhantes (poços 1 e 3) em resultados negativos ao IDGA observadas em equinos vacinados contra leptospirose. ....	50
Figura 13 - Linhas inespecíficas duplas e opacas (poço 2) em resultado negativo ao IDGA verificadas em equino vacinado contra leptospirose. ....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos realizados em equinos, anterior aos testes sorológicos: IDGA e FC para diagnóstico de AIE e Mormo.....	40
Tabela 2 - Resultado das provas de IDGA e Fixação de Complemento (FC) após utilização de diferentes tratamentos em grupos de equinos pertencentes a centros de treinamento de tambor e baliza (2014).....	45
Tabela 3 – Ocorrência de reações negativas inespecíficas no diagnóstico de AIE pela técnica de IDGA, após inoculação de diferentes produtos em grupos de equinos pertencentes a centros de treinamento de tambor e baliza (2014). ....	46
Tabela 4 - Equinos vacinados contra influenza, encefalomielite; rinopneumonite equina e tétano (vacina óctupla) que apresentaram reações negativas inespecíficas pelo método IDGA em intervalos de sete dias (2014).....	46
Tabela 5 - Equinos inoculados com vacina anti-leptospirose que apresentaram reações inespecíficas pelo método IDGA em intervalos de sete dias (2014).....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AIE</b>	Anemia Infecciosa Equina
<b>CAEV</b>	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
<b>C3</b>	Fração C3 do complemento
<b>c-ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima - competitivo
<b>CGSA</b>	Coordenação Geral de Saúde Animal
<b>CT</b>	Centro de Treinamento
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima
<b>ENV</b>	Gene que codifica as proteínas do envoltório viral
<b>FC</b>	Fixação de Complemento
<b>FIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Felina
<b>GAG</b>	Gene que codifica antígenos específicos de grupo
<b>GTA</b>	Guia de Trânsito Animal
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IDGA</b>	Imunodifusão em Gel de Ágar
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina G1
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IN</b>	Instrução Normativa
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>OIE</b>	Organização Mundial da Saúde Animal
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PNEFA</b>	Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa
<b>PNSE</b>	Programa Nacional de Sanidade Equina
<b>POL</b>	Gene que codifica as enzimas virais (polimerase)
<b>REV</b>	Gene de regulação viral

<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico
<b>SCP</b>	Soro controle positivo
<b>SDA</b>	Secretaria de Defesa Agropecuária
<b>SIV</b>	Vírus da Imunodeficiência dos Símios
<b>SUASA</b>	Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária
<b>S2</b>	Gene que controla a replicação viral
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TAT</b>	Proteína trans-ativadora de transcrição
<b>UF</b>	Unidades da Federação
<b>VAIE</b>	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	ANEMIA INFECCIOSA EQUINA .....	17
2.1.1	<b>Agente etiológico</b> .....	<b>17</b>
2.1.2	<b>Histórico e epidemiologia</b> .....	<b>19</b>
2.1.3	<b>Patogenia</b> .....	<b>21</b>
2.1.4	<b>Sintomatologia</b> .....	<b>22</b>
2.1.5	<b>Diagnóstico</b> .....	<b>23</b>
2.1.5.1	Imunodifusão em Gel de Ágar .....	24
2.1.6	<b>Prevenção e Controle</b> .....	<b>27</b>
2.2	MORMO .....	29
2.2.1	<b>Agente etiológico</b> .....	<b>29</b>
2.2.2	<b>Histórico e epidemiologia</b> .....	<b>30</b>
2.2.3	<b>Patogenia</b> .....	<b>31</b>
2.2.4	<b>Sintomatologia</b> .....	<b>32</b>
2.2.5	<b>Diagnóstico</b> .....	<b>33</b>
2.2.5.1	Fixação de complemento .....	34
2.2.5.2	Teste da maleína .....	37
2.2.6	<b>Prevenção e Controle</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1	PROPRIEDADES E ANIMAIS.....	39
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	39
3.3	COLHEITA DE MATERIAL .....	41
3.4	EXAMES LABORATORIAIS .....	41
<b>3.4.1</b>	<b>Teste IDGA</b> .....	<b>41</b>
3.4.1.1	Interpretação da prova.....	42
3.4.1.2	Avaliação da ocorrência de reações inespecíficas na IDGA.....	42
<b>3.4.2</b>	<b>Fixação de Complemento (FC)</b> .....	<b>42</b>
3.4.2.1	Interpretação da prova.....	44
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A equideocultura possui grande importância econômica e social no Brasil, visto que os equídeos são utilizados em diferentes atividades, como tração, transporte, em segurança pública e até no tratamento de doenças humanas por meio da Equoterapia (ALMEIDA, 2001). Também constituem uma cadeia do agronegócio em expansão com estreita relação aos setores ligados ao lazer, cultura, turismo e esporte (ALMEIDA et al., 2006). Contudo, algumas doenças causam prejuízos consideráveis a essa exploração, como a Anemia Infecciosa Equina (AIE) e o Mormo, incluídas entre as passíveis de medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo obrigatório o sacrifício dos animais infectados uma vez que não existe tratamento.

De acordo com o Programa Nacional de Sanidade dos Equinos (PNSE), AIE e Mormo são as enfermidades mais importantes sob o ponto de vista sanitário e econômico para a equideocultura. De acordo com a legislação vigente, as propriedades que tiverem focos comprovados serão interditadas, com sacrifício imediato dos animais soropositivos, representando assim, prejuízos relacionados à dificuldade de reposição e adestramento de novos equídeos; impossibilidade de compra e venda de animais durante o período de saneamento de foco da propriedade interditada; interferência nos eventos esportivos devido aos embargos ao trânsito de equídeos e devido também à ausência de uma política indenizatória aos criadores que contribuírem com o PNSE, como a existente no Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA).

Várias técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas ao longo dos anos para a detecção dos agentes causadores de AIE e Mormo. A técnica de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e Fixação de Complemento (FC), no entanto, são os métodos oficiais, segundo a OIE, para diagnóstico dessas enfermidades em diversos países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2004). Apesar de usados em larga escala e da sensibilidade demonstrada, o IDGA não detecta anticorpos específicos nos estágios iniciais da AIE e pela técnica de FC, o soro de animais jovens, gestantes e idosos podem ocasionalmente apresentar reações falso-negativas. Essas e outras limitações podem comprometer as medidas de controle e erradicação das doenças,

visto que na ausência de tratamento e de vacinas eficazes, o diagnóstico sorológico tem valor determinante (ISSEL & COGGINS, 1979; VERMA et al., 1990; REIS et al., 1994; REIS, 1997; NEUBAUER et al., 2005, NAUREEN et al., 2007; TELES et al., 2012; OIE, 2013).

Assim como AIE e Mormo, outras enfermidades de variadas etiologias são responsáveis pela baixa produtividade e prejuízos econômicos na criação de equídeos. Muitas, entretanto, podem ser evitadas e controladas mediante o uso de vacinas que ao serem introduzidas no organismo, estimulam a produção de anticorpos semelhante ao que ocorreria no caso de uma infecção causada por um determinado agente patogênico, tais como: influenza, encefalomielite equina, rinopneumonite, tétano, raiva e leptospirose (TIZARD, 2002; LESCHONSKI, 2002; OLIVEIRA, 2007).

Um experimento com equinos correlacionou o uso de vacinas ao método de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), e demonstrou a ocorrência de resultados “suspeitos” no diagnóstico de AIE, em animais soronegativos previamente vacinados contra influenza equina. Fato que permitiu inferir que os componentes do imunógeno seriam responsáveis pela apresentação de reações inespecíficas no teste sorológico de IDGA (JACOBO et al., 2006).

Desse modo, considerando a importância do diagnóstico laboratorial para o controle da AIE e Mormo, e a necessidade do uso de vacinas no manejo sanitário dos equídeos, tornou-se imprescindível investigar se a inoculação dessas substâncias nos animais poderia comprometer a qualidade e eficácia de testes como IDGA e Fixação de Complemento e, por consequência, determinar o sacrifício de animais saudáveis e perdas econômicas significativas.

Portanto, o presente estudo objetivou verificar e avaliar possíveis reações inespecíficas ao teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para diagnóstico de AIE e à Fixação de Complemento (FC) para diagnóstico de Mormo, após a aplicação de vacinas contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina, tétano, e leptospirose, visando assim fornecer subsídios para a redução de erros laboratoriais e contribuir com o PNSE através da melhoria do diagnóstico e, por conseguinte, do controle dessas enfermidades.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

A AIE é uma doença infecciosa cosmopolita, causada por vírus, caracterizada por apresentar evolução clínica nas formas aguda, subaguda, crônica e assintomática, que acomete animais da família *Equidae* (equinos, muares e asininos) de todas as raças e idades, porém, animais subnutridos, parasitados e debilitados têm maior predisposição. Prevalece em áreas de clima quente e úmido, refletindo a forma mais comum de transmissão, através de insetos hematófagos, que são essencialmente vetores mecânicos. Apresenta elevada morbidade e média mortalidade (ISSEL et al., 1988; OAKS et al., 1998; SULZBECK & PEREIRA, 2000).

#### 2.1.1 Agente etiológico

O vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) é um RNA vírus, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, que afeta todos os membros da família *Equidae* (ISSEL & COGGINS, 1979; MAYER & GUERREIRO, 1988). Os retrovírus caracterizam-se pela capacidade de converter uma das duas moléculas de RNA viral linear, em DNA de fita dupla através de um processo denominado de transcrição reversa com subsequente integração ao genoma celular (COFFIN et al., 1997). Os lentivírus se destacam por provocarem infecção com curso insidioso persistente (BLACKLAWS et al., 2004; QUINN et al., 2007) e pela capacidade de sofrer mutações levando a formação de subpopulações virais heterogêneas denominadas *quasispécie* (PASICK, 1998). Os baixos níveis de replicação viral decorrentes da resposta imune do hospedeiro ocasionam uma demora no surgimento dos primeiros sinais clínicos da doença (FLURI et al., 2006).

Possui genoma constituído de duas fitas simples de RNA idênticas e não complementares de 8.2 kilobase (Kb), sendo considerado um dos menores vírus e geneticamente mais simples pertencentes ao gênero *Lentivirus* (CLEMENTS, 1996). Apresenta-se como vírion envelopado, de 80-100nm de diâmetro, com estrutura única de tripla camada: a mais interna é a do complexo de nucleoproteínas

genômicas, que inclui por volta de 30 moléculas de transcriptase reversa, com simetria helicoidal; a intermediária corresponde a um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 60nm de diâmetro e a externa é o envelope derivado da membrana celular hospedeira, no qual se projetam peplômeros glicoproteicos (MURPHY et al., 1999).

É sorologicamente relacionado com outros lentivírus, incluindo os vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), Maed/Visna dos ovinos, da Imunodeficiência Felina (FIV), Imunodeficiência dos Símios (SIV) e Imunodeficiência Humana (HIV) (SILVA, 2007).

Assim como os outros membros da família *Retroviridae*, o VAIE contém três principais genes estruturais/funcionais denominados: ***gag*** (do inglês “group specific antigens”, antígenos específicos de grupo), ***pol*** (polimerase) e ***env*** (envoltório), que codificam as proteínas da estrutura viral e enzimas, sendo que os *Lentivirus* têm adicionalmente um complexo arranjo de seis ou mais genes acessórios (MURPHY et al., 1999). O gene *gag* codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9 presentes no capsídeo viral; o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, e o gene *env* codifica as proteínas estruturais gp90 de superfície externa e a gp45 transmembrana (LEROUX et al., 2004).

A p26 é a principal proteína do núcleo, com peso molecular de 26.000 daltons, representa cerca de 40% da massa viral e demonstra especificidade, sendo a mais importante para o diagnóstico sorológico, uma vez que é um grupo reativo antigenicamente estável, capaz de induzir a formação de anticorpos detectáveis pelas técnicas de fixação de complemento, imunofluorescência e imunodifusão (TOMA, 1980; MONTERALO et al., 1982). Enquanto as glicoproteínas gp90 e gp45 intervêm na reação de neutralização viral e são utilizadas nas provas de ELISA (TOMA, 1980; SOUTULLO et al., 2001). Durante o curso da doença a gp90 é submetida à rápida evolução, e mutações são restritas a definidas regiões variáveis (LEROUX et al., 2004). Estas variantes de gp90 podem dificultar a amplificação por PCR, gerando resultados falso-negativos, e pode ser considerado um dos mecanismos de escape do vírus ao sistema imunológico (HOWE et al., 2002).

Além das proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env*, o genoma do VAIE contém três sequências de leitura aberta que codificam as proteínas TAT, REV e S2 que controlam o nível de replicação do vírus (RASTY et al., 1990; STEPHENS

et al., 1990; MARTARANO et al., 1994). A proteína S2 é um importante determinante na replicação viral e propriedades patogênicas *in vivo* (LI et al., 2000).

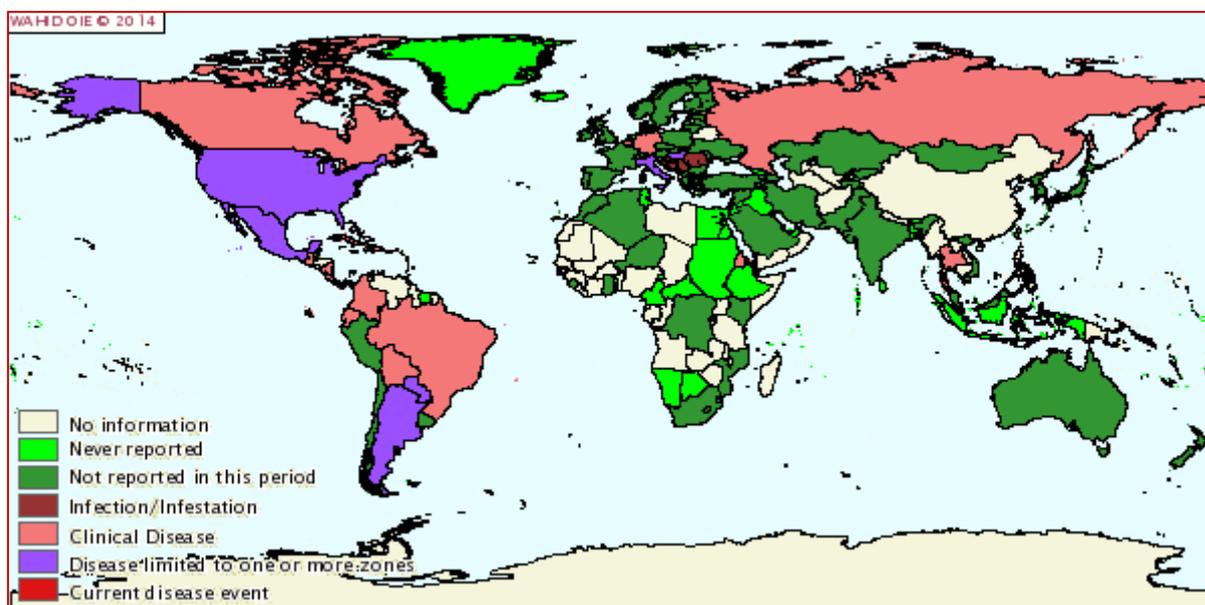
O VAIE é estável entre pH 6,0 e 9,0, mas é parcialmente inativado se incubado em pH menor que 5,0. São inativados a 56°C por 30 minutos, mas podem apresentar maior resistência a irradiações e a luz ultravioleta devido a seu genoma diplóide. À 25°C, o vírus permanece infeccioso em agulhas hipodérmicas contaminadas, por 96 horas (FENNER et al., 1993; MURPHY et al., 1999; HIRSH et al., 2004). É rapidamente inativado por desinfetantes comuns que contenham detergentes, sendo inativado também por hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio, pela maioria dos solventes orgânicos e clorexidina (HIRSH et al., 2004).

### **2.1.2 Histórico e epidemiologia**

A AIE foi descrita como doença infecciosa dos equídeos em 1843 na França, e foi estabelecida sua etiologia viral em 1904 (MONTELARO, 1984). Nas Américas, a primeira detecção da enfermidade ocorreu no Canadá em 1881 e o diagnóstico estabelecido pela primeira vez na Argentina (FIORILLO et al., 2011). No Brasil, ela foi verificada pela primeira vez em 1968 no extinto estado de Guanabara por Dupont et al. (1968). No mesmo período a doença foi verificada 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 (OLIVEIRA, 2011).

A proporção de animais infectados com o VAIE na América Central e do Sul é alta em algumas regiões ou países. O percentual de equídeos positivos para a doença varia entre 30% e 40% (ABREU et al., 2004). De acordo com dados da OIE (2013), a enfermidade encontra-se distribuída mundialmente e em grandes regiões, tende a formar distintos centros endêmicos (Figura 1) (LIMA, 2012).

Figura 1 - Mapa da distribuição da Anemia Infecciosa Equina (jul-dez. 2013).



Fonte: OIE (2013)

Hoje, o perfil epidemiológico da AIE no Brasil se apresenta sob dois padrões: a que ocorre no âmbito das entidades hípicas, facilmente controlável pela realização de exames e consequente eutanásia dos animais positivos, e a que ocorre no campo, que em virtude de características ambientais, socioeconômicas e políticas, é extremamente difícil de ser controlada (PARREIRA, 2009). No país não se tem muitos trabalhos sobre prevalência da doença, e nem todos os animais são testados (só os de elite, reprodutores ou atletas), o que impõe uma soropositividade diferente da morbidade real da infecção (FRANCO & PAES, 2011). Em áreas endêmicas, a prevalência pode atingir 70% dos animais adultos, sendo que, os níveis de prevalência são de moderados a altos em regiões com populações numerosas e permanentes dos insetos vetores (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

A frequência da Anemia Infecciosa Equina no Estado do Maranhão é superior à média Nacional e da Região Nordeste, sendo endêmica e com ocorrência de casos positivos em todas as mesorregiões do estado, segundo o levantamento de resultados positivos obtidos por laboratórios credenciados e oficiais no período de 2008 a 2010 (LIMA, 2012).

O sangue de cavalos persistentemente infectados é a fonte mais importante de transmissão do VAIE, que pode ser transferido por insetos hematófagos da ordem Diptera: *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp, *Tabanus* sp, *Hybromitra* spp,

sendo os *Tabanus* sp, os principais responsáveis pela transmissão (ISSEL, 2009). Estes insetos são responsáveis pela transmissão mecânica do vírus, ou seja, não há multiplicação do agente no vetor (RADOSTITS, 2002).

A transmissão pode ocorrer, também, de forma iatrogênica, pela transfusão de sangue contaminado, pelo uso de agulhas, instrumentos cirúrgicos e fômites contaminados, como freios e esporas (COETZER et al., 1994). O VAIE tem mostrado ser viável em agulhas contaminadas por mais de 96 horas, confirmando o potencial de transmissão através de manejo dos animais e práticas veterinárias no rebanho (CRAIG & MONTELARO, 2008). Outras formas de menor importância epidemiológica incluem a transmissão por via transplacentária, por meio do sêmen e do colostro (NOCITI et al., 2008). Segundo Silva (2007), embora seja possível eliminar-se completamente a transmissão do VAIE pela intervenção do homem, o mesmo não ocorre com relação ao risco de transmissão no campo por insetos hematófagos.

### **2.1.3 Patogenia**

Após a infecção, as células alvo para o vírus da AIE são os macrófagos, monócitos e células de Kupffer dos equídeos (WEIBLEN, 1998; NAGARAJAN, 2001). Os órgãos mais acometidos, por terem abundância de macrófagos maduros são: fígado, baço, linfonodos, pulmões e rins, no quais o vírus se replica primariamente (RADOSTITS, 2002). Os locais de integração do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira determinam a extensão e a natureza das alterações celulares (QUINN et al., 2005). A incubação do vírus oscila dentro de limites muito amplos, de acordo com a quantidade do agente, transmitida no contágio (WEIBLEN, 1998).

Os vírus liberados na circulação sanguínea por meio da membrana da célula infectada podem ser adsorvidos pelos eritrócitos dos equinos e, quando IgG ou IgM reagem com este complexo, o Sistema Complemento é ativado, induzindo hemólise, tanto intra quanto extravascular. A fração C3 do Complemento, ao interagir com o eritrócito infectado também induz a eritrofagocitose (SEARCY, 1998). Hemólise, eritrofagocitose aumentada e eritropoiese diminuída são responsáveis pela anemia em animais cronicamente infectados (QUINN et al., 2005). Equinos infectados

também podem desenvolver glomerulonefrite como resultado da deposição de imunocomplexos nas membranas basais glomerulares (TIZARD, 2002). Também são identificadas linfadenopatia e infiltração de macrófagos e linfócitos no fígado e em outros órgãos (RAVAZZOLO, 2007).

A anemia é resultado tanto da diminuição do tempo de vida da hemácia (devido à hemólise e eritrofagocitose por macrófagos ativados), quanto da depressão da resposta da medula óssea (eritropoiese). Além disso, a diminuição do fluxo de ferro dos macrófagos para o plasma também responde pela patogenia da anemia na AIE (CHEEVERS & MCGUIRE, 1985; MCGUIRE et al., 2004).

Muitos sinais clínicos e lesões tanto da doença crônica como na aguda são atribuídos à resposta imune do hospedeiro para o vírus e não a um resultado direto da multiplicação viral (TIMONEY et al., 1988; FENNER et al., 1993; TRAUB-DARGATZ, 1993; MURPHY et al., 1999). Vários aspectos sobre a patogenia da AIE ainda não são compreendidos, dentre eles, o fato de a complexidade da resposta imunológica do hospedeiro permitir a sobrevivência do vírus, ao mesmo tempo em que acarreta hipergamaglobulinemia. Contudo, em geral se admite que a anemia, glomerulonefrite, hepatite e a linfadenopatia resultam da deposição de imunocomplexos (TRAUB-DARGATZ, 1993).

#### **2.1.4 Sintomatologia**

A apresentação clínica da anemia infecciosa equina é muito variável. O curso clínico depende da quantidade do inóculo e virulência da cepa viral, além da suscetibilidade do equídeo. Tanto a frequência quanto à severidade dos episódios clínicos de AIE diminuem na maioria dos cavalos, levando a um estado de portador inaparente. A manifestação dos sintomas também pode ser induzida por estresse ou drogas imunossupressoras como corticosteroides, até mesmo depois de anos de quiescência (CHEEVERS & MCGUIRE 1985; HIRSH et al., 2004).

A doença pode surgir na forma aguda, subaguda e crônica e sua diferenciação é fundamentada na gravidade dos ataques febris, tempo de intervalo entre as ocorrências e grau de anemia (MAYER & GUERREIRO, 1988).

Na forma aguda da doença, sintomas como febre (38,5°C – 40°C), anorexia, trombocitopenia e severa anemia podem ocorrer repentinamente de 7 a 21 dias

após a infecção. Animais infectados nesse curso da doença podem vir a óbito em um período de 2 a 3 semanas e outros, após demonstrarem aparente recuperação, repetem sinais agudos associados à letargia, sudorese profusa, descarga nasal, edemas gravitacionais, hemorragias petequiais, epistaxe, depressão, anemia e ataxia. Doenças subagudas seguem-se às agudas após período convalescente de 2 a 4 semanas. Contudo, a forma crônica é a apresentação clássica da AIE, também chamada de febre dos pântanos e se assemelha à forma subaguda, porém é mais suave e raramente culmina em morte. Cada episódio dura 3 a 5 dias e o intervalo dos ciclos é irregular (semanas ou meses). A frequência e severidade diminuem depois de 6 a 8 episódios, normalmente no primeiro ano de infecção. A maioria dos cavalos não apresenta sinais clínicos, porém são portadores vitalícios do vírus (HIRSH et al., 2004).

A infecção pelo VAIE é a única, do grupo dos lentivírus, em que muitos animais evoluem de um estado crônico, caracterizado por picos de viremia e febre, como resultado da variação antigênica do vírus, para um estado assintomático da infecção. Sabe-se pouco sobre os sítios celulares de persistência viral nos animais assintomáticos (MONTELARO et al., 1984; SELLON, 1994; MCGUIRE et al., 2004).

### 2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da AIE não é conclusivo porque a enfermidade é facilmente confundível com outras infecções que cursem com febre, como a influenza e as encefalites equinas (RAVAZZOLO, 2007). Na doença aguda, o diagnóstico diferencial inclui: púrpura hemorrágica, babesiose, erliquiose granulocítica eqüina, arterite viral equina, anemia hemolítica auto-imune, leptospirose e trombocitopenia idiopática. Já na apresentação crônica considera-se: infecção metastática por *Streptococcus equi*, doenças inflamatórias crônicas, neoplasias e hepatite crônica (RADOSTITS, 2002).

O teste mais sensível para o diagnóstico da AIE é provavelmente a inoculação de sangue total do animal suspeito em equinos sadios e o monitoramento da soroconversão, indicando a infecção pelo VAIE (ISSEL & COGGINS, 1979). Entretanto, trata-se de um teste caro, demorado e impossível de ser usado na rotina, além do risco de infecção de outros animais na natureza (MONTELARO et al., 1993;

REIS, 1997; SANTOS, 2006). Por sua vez, o isolamento viral não é prático, pois demanda tempo, é laboroso e requer técnicas especializadas para se manter viáveis as culturas primárias de macrófagos equinos, necessárias à replicação das linhagens virais patogênicas de AIE (NAGARAJAN & SIMARD, 2001).

Várias técnicas sorológicas de diagnóstico da AIE foram desenvolvidas ao longo dos anos. A prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é o teste oficial para diagnóstico da enfermidade, sendo de fácil execução, sensível e específico (ALMEIDA et al., 2006). O ELISA competitivo (cELISA) tem sido utilizado nos Estados Unidos desde a década de 80 (MATSUSHITA et al., 1989), e tem a vantagem de ser menos subjetivo e mais rápido do que o IDGA, enquanto o resultado do IDGA ocorre em 48h, o do cELISA é feito em 2h. Já o teste *Immunoblot* tem sido utilizado somente como ferramenta de pesquisa e detecta anticorpos contra múltiplos antígenos, sendo o indicador sorológico mais sensível e específico da infecção pelo VAIE (ISSEL & COOK, 1993; ISSEL et al., 1999).

#### 2.1.5.1 Imunodifusão em Gel de Ágar

Em 1970, o Teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) foi descrito como um marco no diagnóstico de AIE (COGGINS & NORCROSS, 1970 apud ALMEIDA, 2006). Foi o primeiro teste disponível no comércio e o único prescrito oficialmente para trânsito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No Brasil, somente profissionais e laboratórios cadastrados são legalmente licenciados para a realização do teste e emissão de laudo (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

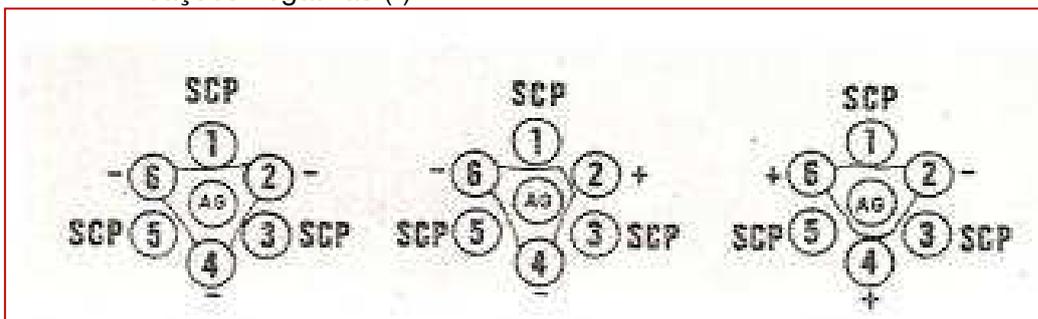
O método de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), também conhecido como “Teste de Coggins” é uma prova qualitativa, reconhecida mundialmente como método laboratorial mais importante no diagnóstico da AIE, pela sua alta especificidade, facilidade de execução e alto grau de sensibilidade, em torno de 95% (SELLON, 1994). O IDGA assim como um grande número de testes sorológicos fundamenta-se na detecção de anticorpos contra a principal proteína do core viral, a p26. Esta proteína mostrou ser altamente conservada em diferentes variantes isoladas, uma vez que o vírus sofre alta variação antigênica, resultando em mutantes com diferentes antígenos; representa, portanto, o alvo da resposta imune e

praticamente todos os animais infectados produzem anticorpos específicos anti-p26 (REIS, 1997).

A execução do teste de IDGA é simples. Em uma placa ou lâmina contendo Ágar Noble e solução tampão borato solidificados, são perfuradas sete cavidades, sendo uma central e seis circundando-a. Na cavidade central é colocado o antígeno (p26) enquanto nas demais se alternam soro controle positivo (SCP) e soro teste. Durante a incubação (48h), ocorre a difusão do antígeno da cavidade central e de anticorpos, se presentes, das cavidades externas. De acordo com a Portaria nº 84/1992 – SDA/MAPA, a técnica baseia-se na migração radial dupla de antígeno (Ag p26) e anticorpo (Ac anti-p26) através do gel de ágar. O encontro dos reagentes leva a formação dos complexos: Ag-Ac insolúveis que se precipitam e tornam-se visíveis sob a forma de uma linha ou banda de precipitação que caracteriza a reação de identidade. Uma extrema variação na concentração de Ag e Ac pode alterar a localização ou inibir a formação da mesma. Esta reação pode ser, ainda, influenciada por uma variedade de condições físico-químicas, dentre elas, concentração eletrolítica, tampão, pH e temperatura. Alterações bruscas de temperatura, durante a incubação, levam a formação de artefatos de técnicas indesejáveis para o teste. Altos níveis de lipídeos e protédeos nos reagentes podem afetar a formação e observação da linha de precipitação (BRASIL, 1992).

A linha de precipitação ou de identidade é a base para a leitura do teste, devendo ser nítida para que o método seja válido, caso contrário, a prova deve ser repetida. Quando as linhas formadas entre o Ag e o SCP se dirigem para a cavidade onde se encontram as amostras testadas, a prova é interpretada como negativa. Contudo, quando há fusão entre as linhas formadas entre Ag e SCP com aquelas geradas pelas amostras testadas, resultando em uma linha de identidade total, a leitura do teste é considerada positiva (Figura 2). De acordo com a proximidade entre a linha de precipitação e a cavidade onde se encontra a amostra testada, a reação positiva pode ainda ser interpretada como fraca ou forte positiva (BRASIL, 1992).

Figura 2 - Leituras da prova de IDGA demonstrando reações positivas (+) e reações negativas (-).

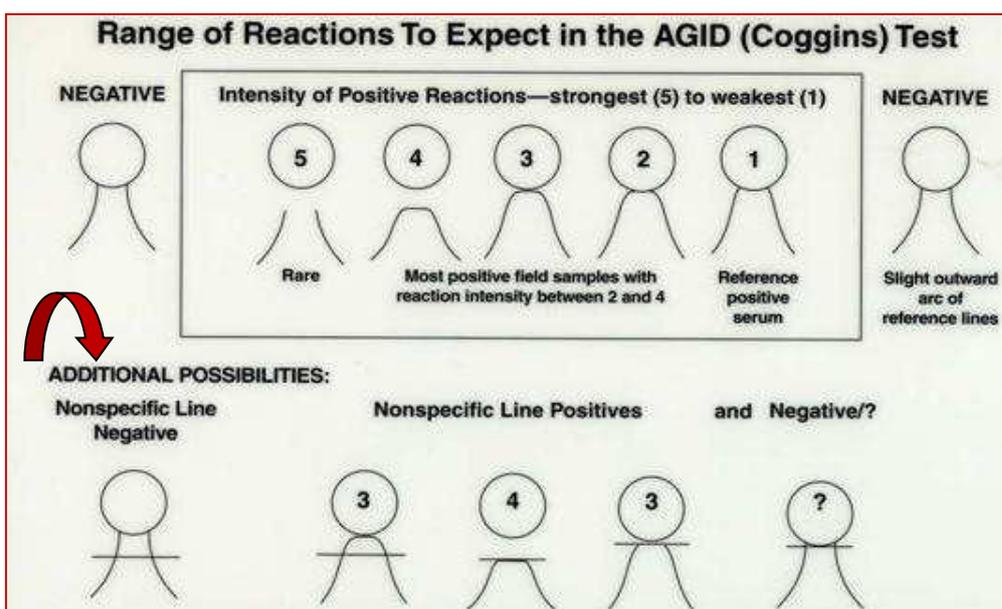


\*SCP: Soro controle positivo (1,3,5)      \*AG: Antígeno      \*2,4,6: Soros testes

Fonte: BRASIL (1992).

Além das reações negativas e positivas, é possível a ocorrência de reações inespecíficas ao IDGA, que se caracterizam pela formação de uma linha não contínua com as do soro controle positivo. Elas são formadas por outras reações Ag-Ac que não aquela específica para AIE. As reações inespecíficas por serem consideradas como fenômenos indesejados na IDGA representam um dos parâmetros de qualidade dos kits comerciais de antígeno p26 (SILVA, 2007). Uma amostra pode produzir ao mesmo tempo uma reação específica de AIE (positiva) e uma linha de precipitação inespecífica (Figura 3) (BRASIL, 1992).

Figura 3 - Possíveis reações no teste IDGA (Teste de Coggins) e exemplos de linhas inespecíficas.



Fonte: <http://dept.ca.uky.edu/eia/documents/160.pdf>

A IDGA detecta anticorpos precipitantes específicos entre 14 e 45 dias após infecção (SILVA, 2007) e apesar de usada em larga escala, apresenta limitações como a incapacidade de detectar anticorpos para o vírus da AIE (VAIE) nos estádios iniciais da doença, presentes em pequenas quantidades (REIS, 1997). A possibilidade de reação cruzada com a proteína da matriz de outros lentivírus e a resposta intermitente da p26, também são descritas na literatura (LANGEMEIER et al., 1996).

### **2.1.6 Prevenção e Controle**

No Brasil as medidas de controle e profilaxia à AIE seguem o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), desde 1981, através da Portaria nº 200 de agosto de 1981 (BRASIL, 1981). Atualmente, está em vigor a Instrução Normativa (IN) nº 45 de 15 de junho de 2004 (BRASIL, 2004), na qual contém normas para prevenção e o controle da AIE.

De acordo com esta Instrução Normativa, as medidas de prevenção e controle para limitar a disseminação do vírus são de responsabilidade do serviço veterinário oficial de cada Unidade Federal, sob a coordenação do Departamento de Defesa Animal. As ações de controle e profilaxia se baseiam principalmente em testes sorológicos de rotina e na remoção dos animais reagentes do plantel (FRANCO & PAES, 2011), além da restrição ao deslocamento de animais, do teste dos novos indivíduos a serem introduzidos nas tropas, do controle da população de vetores (QUINN, 2005) e do não compartilhamento de seringas, agulhas e outros utensílios que possam ser veículo de células infectadas (RAVAZZOLO, 2007).

O Decreto nº 5.741/2006, que organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) brasileira, estabelece a obrigatoriedade de apresentação de documento oficial de sanidade agropecuária para trânsito, emitido pelo serviço fiscalizador correspondente. Por sua vez, a Instrução Normativa nº 18/2006 - SDA/MAPA, configura a Guia de Trânsito Animal (GTA) como sendo o documento de certificação agropecuária para transporte de animais vivos, no qual contém informações sobre o destino e condições sanitárias, bem como a finalidade do transporte animal (BRASIL, 2006). Portanto, a fiscalização da movimentação de equídeos pelos serviços de defesa sanitária por meio da emissão de GTA é

atualmente, um dos principais dispositivos de rastreabilidade e controle sanitário disponível, visto que o documento só será expedido para equídeos oriundos de estabelecimentos que cumpram a legislação vigente.

Na emissão da GTA para equídeo, com seis meses ou mais de idade, é obrigatória a apresentação de resultado negativo à prova de IDGA. Animais destinados ao comércio, trânsito, participação em competições, feiras e exposições devem ser necessariamente testados e apresentar resultado negativo no teste de IDGA (BRASIL, 2014). Em muitos países, a legislação requer certificação de “Área Livre da AIE” antes da importação de novos animais (QUINN, 2005).

No Brasil, os animais positivos no teste de IDGA devem ser sacrificados, conforme estabelecido no Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) do MAPA, uma vez que não existe tratamento ou cura. A propriedade onde se localizarem estes animais são consideradas focos da doença, nas quais o PNSE preconiza medidas como: interdição da propriedade após identificação do equídeo portador; investigação epidemiológica de todos os animais que reagiram ao teste de diagnóstico de AIE, incluindo histórico do trânsito; marcação permanente dos equídeos portadores e sacrifício ou isolamento desses animais; desinterdição da propriedade foco após a realização de dois exames com resultados negativos consecutivos para AIE, com intervalo de 30 a 60 dias nos demais equídeos existentes e orientação aos proprietários que se encontrarem na área perifocal pelo serviço veterinário oficial, para que submetam seus animais a exames laboratoriais para diagnóstico de AIE (BRASIL, 2004).

## 2.2 MORMO

O mormo é uma enfermidade considerada reemergente e altamente contagiosa, de caráter agudo ou crônico e que acomete principalmente os equídeos. Felinos, camelos e caprinos também são susceptíveis à infecção e o homem é hospedeiro acidental, sendo geralmente uma doença ocupacional (SCHELL et al., 2007; OIE, 2013). É uma doença de alta morbidade e letalidade, que ocorre em diferentes partes do mundo (SILVA et al., 2009).

### 2.2.1 Agente etiológico

É causado por uma bactéria da família *Burkholderiaceae* denominada *Burkholderia mallei*. É um bacilo Gram-negativo, aeróbio, imóvel, encapsulado, não formador de esporos, intracelular facultativo e que mede 0,3-0,5 µm de diâmetro e 2-5 µm de comprimento (HIRSH & BIBERSTEIN, 2004). A maioria dos membros conhecidos da família *Burkholderiaceae* é residente no solo, porém a *B.mallei* é um patógeno que necessita obrigatoriamente de um hospedeiro mamífero para se manter viável e que portanto, não persiste por muito tempo no ambiente (SANFORD et al., 1995; CARTER & WISE, 2004; NEUBAUER et al., 2005).

A parede celular da *B.mallei* é típica de uma bactéria Gram-negativa. A cápsula de polissacarídeos e os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana celular são considerados fatores de virulência, que auxiliam o agente a evadir os mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro. A perda da capacidade de produzir os LPS da membrana celular em função das mutações provocadas pela realização de cultivos sucessivos e sequencias, pode levar à redução ou mesmo perda da virulência da bactéria (NEUBAUER et al., 2005; CARVALHO FILHO, 2012).

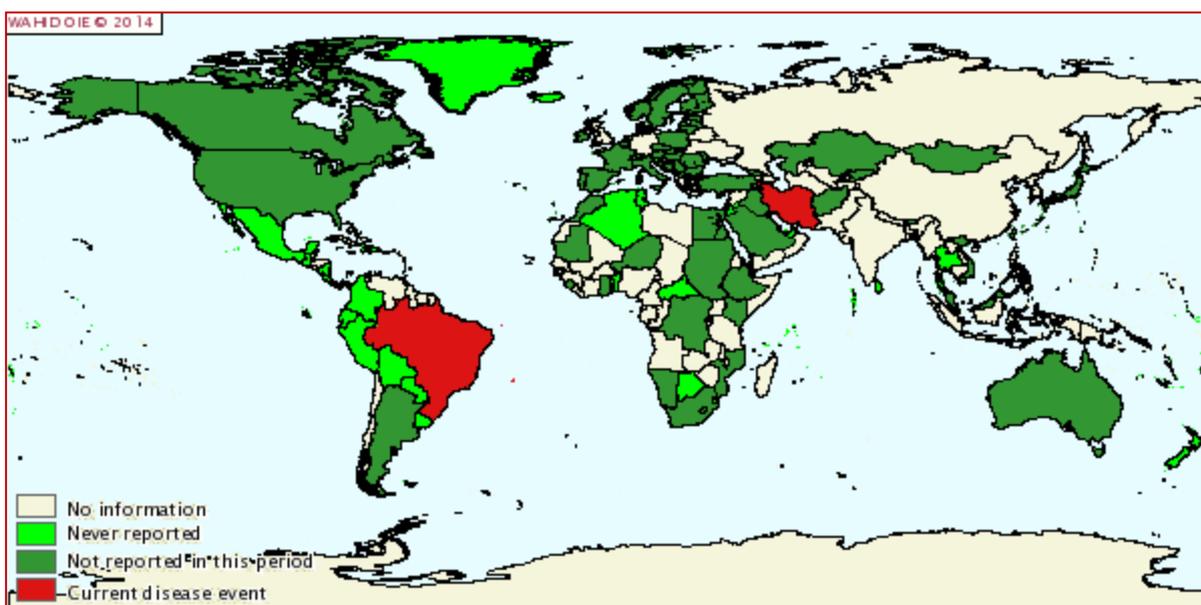
A *B. mallei* é rapidamente inativada em 24 horas pelo calor e raios solares diretos, porém sua sobrevivência pode ser prolongada em ambientes contaminados, molhados ou úmidos. O agente é sensível aos desinfetantes usuais como hipoclorito de sódio (500 ppm), cloreto de benzalcônio (1/2000), permanganato de potássio, iodo glutaraldeído a 2%, sendo resistente aos desinfetantes à base de compostos fenólicos. Pode ainda ser destruído pelo calor a 55°C por dez minutos e pela

irradiação ultravioleta. A cápsula de polissacarídeo da *B. mallei* é considerada um fator de virulência importante e fundamental a sua sobrevivência (OIE, 2013).

## 2.2.2 Histórico e epidemiologia

O mormo é considerado uma das mais antigas doenças dos equídeos, descrita por Aristóteles e Hipócrates no século III e IV a.C. sob a designação de edema maligno (WILKINSON, 1981). A doença ocorre em diferentes partes do mundo, principalmente no Oriente Médio, Ásia, América do Sul e também na África (Figura 4) (AAZV, 2013), sendo erradicada nos Estados Unidos, na Inglaterra, na Austrália e no Canadá (MOTA et al., 2000; DERBYSHIRE, 2002).

Figura 4 - Mapa da distribuição do Mormo (jul – dez. 2013).



Fonte: OIE (2013)

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1811 e provavelmente foi introduzida por animais infectados importados da Europa desencadeando-se verdadeiras epizootias em vários pontos do território nacional, vitimando muares, cavalos e humanos que adoeceram com sintomatologia de catarro e cancro nasal. A enfermidade parecia ter sido erradicada no Brasil, sendo que as últimas referências a focos foram no município de Campos no estado do Rio de Janeiro em 1960

(MOTA et al., 2000) e em 1968 no município de São Lourenço no estado do Pernambuco (SANTOS et al., 2007). Entretanto, Mota et al. (2000) relataram focos de mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas em 1999, caracterizando a “reemergência” da doença no país.

Nos últimos dez anos foram notificados focos em equídeos nos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Distrito Federal, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, o que demonstra que o mormo vem se difundindo por todo o território nacional. Em humanos, porém, não há registros de casos (BRASIL, 2012).

Os animais infectados e portadores assintomáticos são importantes fontes de infecção. A principal via de infecção é a digestiva, podendo ocorrer também pelas vias respiratórias, genital e cutânea. A disseminação do agente no ambiente ocorre pelos alimentos, água e fômites contaminados. Raramente, a forma cutânea da infecção decorre do contato direto com ferimentos ou por utensílios usados na monta dos animais. Lesões pulmonares crônicas, que se rompem nos brônquios e infectam as vias aéreas superiores e secreções orais e nasais, representam a mais importante via de excreção da *B. mallei* (RADOSTITS et al., 2002).

### **2.2.3 Patogenia**

Veiculado por água e alimentos contaminados, o agente atinge o trato digestório do hospedeiro e pela penetração das mucosas da faringe e intestino, alcança a corrente linfática atingindo os gânglios linfáticos regionais onde se multiplica. Na maioria dos casos, atinge a corrente sanguínea fazendo septicemia (forma aguda) e posteriormente bacteremia (forma crônica). O micro-organismo localiza-se nos pulmões, mas a pele e a mucosa nasal também são sítios comuns de localização. Nos animais infectados formam-se lesões primárias no ponto de entrada (faringe), expandindo-se para o sistema linfático onde produzem lesões nodulares. Lesões metastáticas são formadas nos pulmões e em outros órgãos como baço, fígado e pele. No septo nasal podem ocorrer lesões primárias de origem hematogena ou secundária a um foco pulmonar (BEER, 1999; HIRSH et al., 2004; QUINN et al., 2005).

A lesão nodular é formada inicialmente pela infiltração de neutrófilos, fibrina e hemácias. Os neutrófilos degeneram-se e uma área necrótica central torna-se circundada por células epitelióides, células gigantes e por linfócitos infiltrados no tecido de granulação. A predominância de lesões granulomatosas ou supurativas são determinadas pelos tipos variantes da *B. mallei* (HIRSH et al., 2004).

#### **2.2.4 Sintomatologia**

As formas de apresentação do mormo estão relacionadas ao curso da doença e são descritas de acordo com a localização das lesões primárias (OIE, 2013). Infecções agudas são caracterizadas por febre, descargas nasais, tosse e linfadenite disseminada ao longo do trato respiratório superior. O animal inicialmente apresenta febre alta, rinorréia, frequentemente unilateral, amarelo-esverdeada e inflamação dos gânglios laríngeos após um período de incubação de 2-3 dias. Na mucosa das vias aéreas superiores aparecem alterações difteróides, nódulos e úlceras que se propagam rapidamente. A morte por septicemia ocorre na 2ª ou 3ª semana. A forma aguda da doença manifesta-se geralmente em muares e asininos, sendo a crônica mais frequente em equinos (BEER, 1999; HIRSH et al., 2004; MORAES, 2011).

A infecção crônica, de acordo com a localização das lesões, apresenta-se sob três formas principais: pulmonar, nasal e cutânea. Mas, na maioria dos focos essas apresentações não são claramente distintas e podem ocorrer simultaneamente. (CARTER & WISE, 2004). As formas respiratórias (pulmonar e nasal) se caracterizam pela formação de nódulos no epitélio das vias aéreas que evoluem para úlceras. Pneumonia, tosse, descarga nasal purulenta, epistaxe, dispneia, lesões no septo nasal e emaciação dos gânglios linfáticos são sintomas comuns. Diarréia e poliúria também podem ocorrer, levando a uma perda progressiva da condição do animal. A forma cutânea caracteriza-se pela formação de nódulos endurecidos no trajeto dos vasos linfáticos, principalmente na região abdominal, na face medial dos membros posteriores e costado. Com a progressão da doença, os nódulos tornam-se flácidos e ao fistularem, drenam secreção purulenta e podem evoluir para úlceras. Essas lesões nodulares na pele ocorrem a distâncias aproximadamente iguais, resultando em arranjos no formato de colar de pérolas ou rosário (BLAHA, 1989; MOTA, 2006; SANTOS et al., 2007; MORAES, 2011).

O período de incubação em infecções naturais depende da virulência da *B.mallei*, da rota e intensidade da infecção e de fatores intrínsecos ligados ao hospedeiro, tais como mecanismos de resistência, podendo variar entre poucos dias ou vários meses (BEER, 1999; OIE, 2013). Em infecções experimentais (intra-traqueal), sinais clínicos como febre de 40°C é observada em um a dois dias; complicações respiratórias são evidenciadas em três ou quatro dias e descarga purulenta nasal em cinco dias após inoculação do patógeno (USAHA, 2008).

### 2.2.5 Diagnóstico

Como toda doença que pode ultrapassar fronteiras internacionais, os sinais clínicos avaliados isoladamente não permitem um diagnóstico definitivo do mormo. Casos suspeitos devem ser diferenciados de outras infecções que apresentam sintomatologia semelhante, mais especificamente, de garrotilho (*Streptococcus equi*), linfangite ulcerativa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*); pseudotuberculose (*Yersinia pseudotuberculosis*); esporotricose (*Sporotrix schenckii*); linfangite epizoótica (*Histoplasma farciminosum*); tuberculose (*Mycobacterium bovis*) e até mesmo de traumatismos e processos alérgicos. Em humanos, o mormo deve ser diferenciado de melioidose (*B.pseudomallei*) cujo agente causador possui íntima similaridade à *B.mallei* (CARVALHO FILHO, 2012; OIE, 2013).

Sintomas respiratórios e linfáticos em equídeos adultos procedentes de regiões endêmicas para o mormo, associados à alta letalidade em animais previamente tratados com antibióticos sem sucesso terapêutico, são indicativos para a suspeita de mormo. Nos casos de evidência clínica dos sintomas, o material biológico de eleição para o diagnóstico é o conteúdo purulento de nódulos cutâneos fechados obtidos por punção aspirativa e *swabs* da mucosa nasal enviados ao laboratório sob refrigeração, para posterior identificação bacteriana baseada nas características de crescimento, coloração de Gram e provas bioquímicas (MOTA et al., 2000). A inoculação de material infectante (secreção nasal ou conteúdo dos abscessos subcutâneos) na cavidade peritoneal de cobaias (prova de Strauss) pode demonstrar em até duas semanas após inoculação, o aparecimento de orquite, septicemia ou abscessos no ponto de inoculação. À necropsia, lesões

abscedativas em diferentes órgãos são observadas e utilizadas como fonte de material para isolamento e identificação bacteriana (SILVA, 2003).

Na necropsia de solípedes mortos, as características do mormo permitem, quase sempre, uma conclusão correta. Em muitos casos o diagnóstico só pode ser estabelecido mediante estudo histológico dos nódulos suspeitos (BEER, 1999).

O diagnóstico do mormo, portanto, consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anátomo-histopatológico, isolamento bacteriano, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica (maleinização) e principalmente, testes sorológicos como a fixação de complemento e ELISA (MOTA et al., 2000; AL-ANI & ROBERSON, 2007).

#### 2.2.5.1 Fixação de complemento

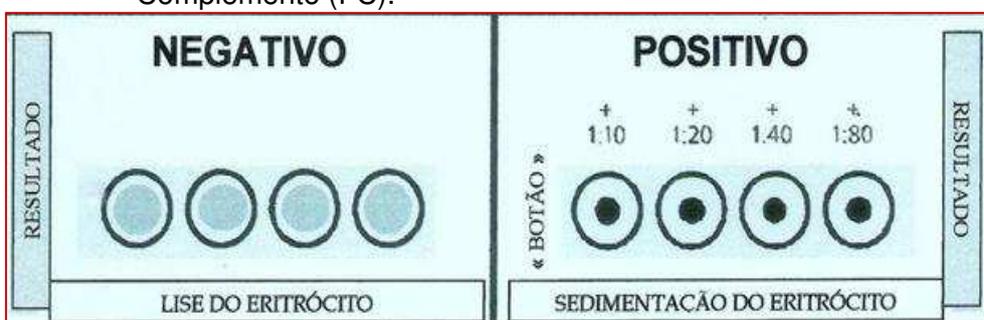
O Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2013), recomenda o Teste de Fixação de Complemento (FC) para controle do trânsito internacional de equídeos. No Brasil, as normas para controle e erradicação do mormo, aprovadas pela Instrução Normativa nº 24/2004 - SDA/MAPA, também adotam para diagnóstico da doença, o FC como teste de triagem, realizado em laboratório credenciado ou oficial e o teste de maleinização como complementar, realizado somente pelo serviço veterinário oficial, este último em animais positivos na FC, mas sem sinais clínicos, ou em animais negativos na FC com sinais clínicos (BRASIL, 2004).

O teste de fixação de complemento é específico e apresenta alta sensibilidade. Ele detecta quase que exclusivamente anticorpos IgG1, específicos da *B.mallei*, observados uma semana após infecção. Contudo, alguns estudos demonstram que o melhor período para realização do exame situa-se entre 4 a 12 semanas após a infecção. O teste detecta animal com sinais clínicos inaparentes e aqueles infectados na fase crônica. Segundo dados estatísticos, os resultados da FC estão de acordo com 99% dos casos positivos (BEER, 1999; MOTA, 2006).

De acordo com a descrição da técnica na IN nº 12/2004 – SDA/MAPA, um anti-soro teste é titulado em diluição seriada (1:5 a 1:320) e uma quantidade fixa de antígeno é adicionada a cada poço. Se o anticorpo estiver presente no anti-soro, formam-se complexos imunes. O complemento é então adicionado à solução e

nesta etapa, antígeno, soro teste e complemento reagem juntos. Se os complexos estiverem presentes, o complemento é ativado, sendo fixado e consumido. Na etapa final da reação, as células indicadoras (eritrócitos) juntamente com uma quantidade subaglutinante de anticorpo (anticorpo antieritrocitário) são adicionados à mistura. Se houver qualquer complemento remanescente, estas células serão lisadas e indicaráo resultado negativo. Entretanto, caso o complemento tenha sido fixado pelos complexos imunes, os eritrócitos não serão lisados devido à quantidade insuficiente de complemento presente na solução e evidenciarão resultado positivo (Figura 5) (BRASIL, 2004).

Figura 5 - Reações negativas e positivas observadas na técnica de Fixação de Complemento (FC).



Fonte: Lennette & Schmidt (1979)

No exame sorológico para o diagnóstico do mormo pela técnica FC, além das leituras: positiva e negativa, o resultado também pode ser considerado anticomplementar e inconclusivo e em ambos os casos, requerem nova coleta em um período de até 30 dias. O resultado da técnica é baseado no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados e leva-se em consideração o tamanho, cor do sobrenadante e espessura do botão, em respectiva ordem de importância. O título registrado é a diluição seguinte da última onde a fixação do complemento for observada (Quadro 1) (BRASIL, 2004).

**Quadro 1** – Esquema da Fixação de Complemento com diferentes resultados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>1:5</b>	N	N	I	P	P	P	N	P	P	C	C	C
<b>1:10</b>	N	N	N	N	P	P	N	P	P	C	C	C
<b>1:20</b>	N	N	N	N	N	P	N	P	P	C	C	C
<b>1:40</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	P	C	C	C
<b>1:80</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	P	C	C	C
<b>1:160</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	P	C	C	C
<b>1:320</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	C	C	C
<b>A/C</b>	N	P	N	N	N	N	N	N	N	C	C	C

1 – N: Negativo

2 – P: Anti-complementar

3 – I: Inconclusivo

4 - P: Positivo (Titulação 1:10)

5 – P: positivo (Titulação 1:20)

6 – P: positivo (Titulação 1:40)

7 – C: Controle Negativo

8 - Controle Positivo Baixo

9 - Controle Positivo Alto

10 a 12 – Controles da placa

Fonte: <http://www.cernitas.com.br/content/2009/12/resultados-do-exame-de-mormo/>

O teste de FC possui validade de 180 dias para animais provenientes de propriedades monitoradas e de 60 dias nos demais casos (BRASIL, 2004).

A utilização de soros controles adequados é de fundamental importância para o método FC porque algumas preparações de anticorpos consomem complemento sem adição de antígeno, como por exemplo, soros que já possuem complexos imunes. E, alguns antígenos podem apresentar atividade anticomplementar e resultar em reações inespecíficas. O soro anticomplementar é aquele que contém algumas substâncias, tais como outras imunoglobulinas que não aquela induzida pela bactéria *Burkholderia mallei*, outras proteínas ou até mesmo bactérias que interferem no teste, consumindo o complemento livre, uma vez que este deveria se ligar ao imunocomplexo hemácia-hemolisina, resultando numa hemólise. Outros fatores como alimentação rica em carboidrato, estresse do animal ou mesmo uso de algumas medicações podem resultar em reação anticomplementar (CERNITAS, 2009).

Outros testes sorológicos para o diagnóstico incluem o teste de ELISA, que detecta anticorpos nos estágios iniciais da doença e que apresenta resultados superiores aos da FC por não sofrer influência da atividade do complemento, além dos testes de contraímuno-elektroforese e hemaglutinação indireta. Porém, todos os

testes sorológicos podem apresentar resultados imprecisos por até seis semanas após a realização do teste de maleína (MOTA, 2006).

#### 2.2.5.2 Teste da maleína

Para o diagnóstico imunoalérgico do mormo é utilizado o teste de maleína. Em equinos infectados a prova mostrou 95% de resultados positivos, porém, pode falhar em animais num estágio avançado da doença (BEER, 1999). A maleína é um antígeno proteico de citoplasma que, uma vez inoculado em um animal previamente sensibilizado pela exposição natural à *B. mallei* é capaz de produzir uma reação alérgica (OIE, 2008). Na maioria das vezes, esse antígeno é inoculado em volume de 0,1 mL na pálpebra inferior. A leitura do resultado é realizada 48 a 72 horas após a inoculação. A reação positiva caracteriza-se por edema marcado da pálpebra, acompanhado ou não de secreção purulenta e conjuntivite (AL-ANI & ROBERSON, 2007).

#### 2.2.6 Prevenção e Controle

Atualmente, não há nenhuma vacina animal ou humana contra a infecção por *B. mallei*. Alguns estudos estão sendo realizados com o objetivo de produzir uma vacina eficaz para o mormo, uma vez que, o tratamento dos infectados não é permitido (ACHA & SZYFRES, 1986). Desse modo, recomenda-se como medida de prevenção, o controle do trânsito e em caso de focos, adoção de regime de saneamento. Em humanos, a profilaxia deve ser voltada aos grupos ocupacionais passíveis de infecção, como os veterinários, tratadores de animais, magarefes e profissionais de laboratório (BRASIL, 2012).

As medidas para controle do Mormo no Brasil estão descritas na IN nº 24/2004 - SDA/MAPA e baseiam-se no controle do trânsito (intra e interestadual) e da participação de equídeos em eventos hípicas. Animais provenientes de Unidades da Federação (UF) onde se confirmou a presença do agente causador do mormo devem portar exame negativo para a doença (fixação de complemento), original e dentro do prazo de validade (60 dias) para todas as

finalidades. Aqueles destinados à exposição, leilão e esporte em Estados onde se confirmou a ocorrência da enfermidade devem portar exame negativo, mesmo sendo proveniente de localidades consideradas livres de mormo. O retorno de animal, oriundo de área onde focos foram confirmados, para Estados livres, está condicionado à apresentação de exame negativo dentro do prazo de validade (BRASIL, 2004).

O artigo 8º da IN nº 24/2004 - SDA/MAPA preconiza como medidas de erradicação, que a propriedade com diagnóstico de mormo positivo conclusivo para um ou mais animais, será considerada foco da doença, imediatamente interditada e submetida a Regime de Saneamento. Os animais reagentes serão sacrificados, não cabendo indenização, conforme Decreto Federal nº 24.538/1934 e procedendo-se, em seguida, à incineração ou enterro dos cadáveres no próprio local, à desinfecção das instalações e fômites, sob supervisão do serviço veterinário oficial. Os demais equídeos da propriedade também serão submetidos aos testes diagnósticos para mormo visando saneamento da propriedade e posterior desinterdição (BRASIL, 1934; BRASIL, 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PROPRIEDADES E ANIMAIS

As propriedades selecionadas corresponderam a três Centros de Treinamento (CT) de corrida de tambor e baliza, localizados nos municípios maranhenses de São Luís, Paço do Lumiar e Raposa, os quais disponibilizaram para o estudo 78 equinos com diferentes idades e de ambos os sexos, sendo 64 animais (82,05%) da raça quarto de milha. Essas propriedades foram escolhidas por apresentarem animais com padronização racial, em bom estado nutricional, e principalmente, por possuírem uniformidade de manejo alimentar e sanitário. Para fins da pesquisa, as propriedades foram identificadas pelas letras A, B e C.

Inicialmente foi estabelecido um período pré-vacinal, no qual os animais foram submetidos a dois controles sorológicos consecutivos em intervalos de 60 (sessenta) dias, por meio das técnicas IDGA e Fixação de Complemento, para assegurar a ausência de anticorpos específicos detectáveis para AIE e Mormo. Em seguida, os animais foram organizados em grupos e um tratamento vacinal distinto foi adotado em cada propriedade. Sendo que o número de animais por grupo ficou condicionado à quantidade de equinos disponibilizados por cada Centro de Treinamento.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 78 equinos foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo um grupo controle, no qual os animais receberam tratamento com solução Ringer lactato e três, expostos a tratamentos com vacinas, do tipo tríplice recomendada para prevenção da encefalomielite equina, influenza equina e tétano; do tipo óctupla indicada para prevenção da encefalomielite, rinopneumonite, influenza dos equídeos e tétano, e com vacina destinada à profilaxia da leptospirose (Tabela 1). Uma semana após a aplicação dos produtos, os equinos foram submetidos a cinco controles sorológicos intercalados em sete dias, por meio das técnicas IDGA e FC para diagnóstico de AIE e Mormo, respectivamente.

**Tabela 1** - Tratamentos realizados em equinos, anterior aos testes sorológicos: IDGA e FC para diagnóstico de AIE e Mormo.

GRUPOS	PROPRIEDADES	Nº DE ANIMAIS	TRATAMENTO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO
01	A, B, C*	06	Solução Ringer Lactato	IM**
02	A	10	Vacina tríplice	IM
03	B	36	Vacina óctupla	IM
04	C	26	Vacina anti-leptospirose	IM
<b>TOTAL</b>		<b>78</b>		

\*A, B e C - propriedades

\*\*IM - intramuscular

**Grupo 01:** grupo controle organizado para validação da pesquisa e composto por seis equinos, sendo um animal pertencente à propriedade A, outro à B e quatro pertencentes à propriedade C. O grupo foi submetido à aplicação de 2 mL de solução Ringer com lactato por via intramuscular (IM).

**Grupo 02:** constituído por 10 equinos pertencentes à propriedade A, submetido à inoculação de 1 mL (IM) de vacina tríplice inativada, composta por vírus de encefalomielite equina, cepas leste e oeste, vírus da influenza equina, tipos A1 e A2 (incluindo Kentucky 92) e toxóide tetânico.

**Grupo 03:** formado por 36 equinos oriundos da propriedade B, os quais receberam a dose de 3 mL (IM) de vacina óctupla inativada, composta por vírus de encefalomielite equina leste e oeste; influenza equina cepas: A/equine1/Praga/1/56, A/equine2/Kentucky/94 e A/equine2/South Africa 4/03; herpes vírus equino tipo 1 e 4 e toxóide tetânico,

**Grupo 04:** composto por 26 equinos oriundos da propriedade C, submetido à inoculação de 2 mL (IM) de vacina inativada, composta por culturas de *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L.canicola*, *L.bratislava*, *L.copenhageni*, *L.pomona*, *L.grippothyphosa*, *L. tarassovi*, *L. hardjo prajitno*, *L. andamana*, *L. ballum*, *L. wolffii* e de *Leptospira pyrogenes*.

As vacinas utilizadas no estudo são registradas no MAPA e a dosagem adotada no experimento obedeceu às recomendações dos fabricantes. O critério de escolha das vacinas baseou-se no fato de que são de uso frequente no manejo sanitário de equídeos.

### 3.3 COLHEITA DE MATERIAL

De cada animal foi colhida uma amostra de 10 mL de sangue por meio de tubos a vácuo com ativador de coágulo, utilizando-se agulha descartável calibre 25x8. As amostras foram transportadas sob refrigeração até o laboratório CERNITAS, credenciado pelo MAPA e situado na cidade de São Luís - MA. Em seguida, o soro obtido por centrifugação foi identificado e estocado a -20° C em microtubos de 1,5 mL até a realização das provas sorológicas: IDGA e Fixação de Complemento.

### 3.4 EXAMES LABORATORIAIS

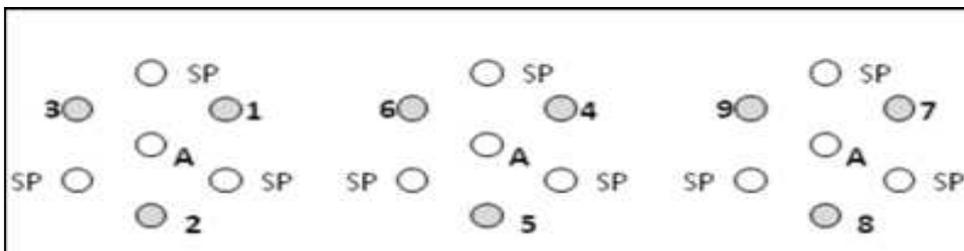
#### 3.4.1 Teste IDGA

A detecção de anticorpos para o vírus da AIE foi realizada pela Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar a 1% (IDGA), empregando-se um antígeno comercial e soro controle positivo padronizado segundo as recomendações da Portaria 84/1992 – SDA/MAPA e registrados na Coordenação Geral de Saúde Animal (CGSA), estocados a - 20°C.

**Preparo das lâminas:** foram colocados 4,5 mL do gel de ágar em lâminas de vidro medindo 25 x 75 mm e após sua solidificação, utilizando um cortador padrão com sete furadores medindo 4 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre os mesmos, foram realizados furos em rosetas nos quais inoculou-se o antígeno, soro padrão e os soros das amostras pesquisadas.

**Realização da prova:** nas cavidades laterais das lâminas, foram distribuídos alternadamente 25 µl dos soros testados e do mesmo modo, 25 µl do soro controle positivo (SCP). Na cavidade central, inoculou-se 25 µl de antígeno (Figura 6). Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida em temperatura entre 20° e 25°C e com intervalos de 24 e 48 horas, realizou-se a leitura e interpretação da prova.

Figura 6 - Representação esquemática da lâmina preparada para IDGA. A - orifício central para o antígeno; SP - orifícios para soro padrão; 1 a 9 - orifícios para soros testes.



Fonte: Oliveira (2011).

#### 3.4.1.1 Interpretação da prova

A reação foi considerada negativa quando as linhas formadas entre o Ag e o SCP se dirigiram para a cavidade onde se encontravam as amostras testadas. Entretanto, quando essas linhas se fundissem com aquelas formadas pelas amostras em estudo e resultassem em uma linha de identidade total, a reação era considerada positiva.

#### 3.4.1.2 Avaliação da ocorrência de reações inespecíficas na IDGA

Para avaliação da ocorrência de reações inespecíficas ou de não identidade durante o teste de IDGA, foram contabilizadas nas amostras de soro dos 78 equinos testados, todas as reações onde não houve formação de linha contínua com as do soro controle positivo. As linhas de precipitação correspondentes às reações inespecíficas também foram caracterizadas de acordo com suas formas de apresentação: linhas duplas ou simples; fortes ou suaves; retas ou curvas; brilhantes ou opacas.

#### 3.4.2 Fixação de Complemento (FC)

A detecção de anticorpos específicos para *B.mallei* foi realizada pela técnica de Fixação de Complemento, empregando-se antígeno comercial e soros controles estocados a - 20°C.

**Soros:** as amostras testes e soros controles foram diluídos na proporção de 1:5 em solução de trabalho de trietanolamina (125 µl soro + 500 µl). Em seguida, foram submetidos a tratamento térmico em banho-maria a 58°C por 30 minutos, a fim de inativar o complemento porventura ainda existente.

**Antígeno:** utilizou-se antígeno (Ag) importado mediante autorização do MAPA, considerando o prazo de validade do produto.

**Complemento:** foram coletados soros sanguíneos de cobaias adultos e bem nutridos para preparo do Complemento, titulado como descrito na IN nº 12/2004 SDA/MAPA.

**Sistema Hemolítico:** formado por uma suspensão de hemácias de carneiro padronizada em espectrofotômetro, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina (anticorpo antieritrocitário), também chamado de sistema revelador.

**Realização da prova:** o teste de FC foi realizado em duas etapas. Na primeira, foram misturados a amostra teste titulada em diluição seriada (de 1:5 a 1:320), o Antígeno e o Complemento em microplacas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U” (Figura 7). Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por uma hora.

Figura 7 - Rotulagem das microplacas para titulação de soro na técnica de Fixação de Complemento

A 1:5	1	2	3	4	5	6	7	CH	CL	CN	0%	1
B 1:10											25%	2
C 1:20											50%	3
D 1:40											75%	4
E 1:80											100%	5
F 1:160												6
G 1:320												7
AC											9	8

A-G: Diluições seriadas (1:5 a 1:320)

1 a 7: Soros testes

CH: Soro controle positivo alto

CL: Soro controle positivo baixo

CN: Soro controle negativo

AC: Anticomplementar

Fonte: Brasil (2004).

Na segunda etapa do teste, adicionou-se à mistura o sistema hemolítico. Após um período de incubação em estufa a 37°C por 20 minutos, as microplacas foram mixadas e incubadas novamente por 25 minutos. Por final, observou-se a ocorrência ou não de lise das hemácias sensibilizadas e em seguida, a atividade hemolítica foi medida, visando determinar a quantidade do imunorreagente pesquisado.

#### 3.4.2.1 Interpretação da prova

Considerou-se como negativo o soro que apresentou lise das hemácias (ausência de sedimentação) e como positivo aquele com ausência de hemólise (presença de sedimentação). O resultado é considerado inconclusivo quando apresenta uma reação muito fraca na diluição 1:5 que não permite confirmar a sua positividade e anticomplementar quando não há hemólise, ou seja, presença de sedimentação das hemácias no poço não adicionado de antígeno, denominado AC.

### 3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. O modelo incluiu a ocorrência de reações inespecíficas nos testes diagnósticos de IDGA e FC em cinco repetições com intervalos de sete dias, após adoção de tratamentos com diferentes vacinas.

Aplicou-se o teste não paramétrico Exato de Fisher, pelo qual se verificou a ocorrência das reações inespecíficas pelos métodos de IDGA e FC aos tratamentos adotados. E para execução da análise estatística foi utilizado o procedimento PROC MIXED do programa estatístico SAS®, versão 9. Considerou-se nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

Os 78 equinos distribuídos em grupos e submetidos aos cinco controles sorológicos pelas técnicas de IDGA e Fixação de Complemento, realizados em intervalos de sete dias após aplicação de solução Ringer lactato e de vacinas contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina, tétano e leptospirose, confirmaram o resultado negativo para AIE e Mormo obtido no período pré-vacinal (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resultado das provas de IDGA e Fixação de Complemento (FC) após utilização de diferentes tratamentos em grupos de equinos pertencentes a centros de treinamento de tambor e baliza (2014).

GRUPOS	TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS	PROVAS DE IDGA / FC				
			7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	35º dia
01	Sol. Ringer Lactato	06	N***	N	N	N	N
02	Vacina tríplice*	10	N	N	N	N	N
03	Vacina óctupla**	36	N	N	N	N	N
04	Vacina anti-leptospirose	26	N	N	N	N	N
<b>TOTAL</b>		<b>78</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>

\* Vacina tríplice: vacina contra encefalomielite, influenza equina e tétano.

\*\*Vacina óctupla: vacina contra influenza; encefalomielite; rinopneumonite equina e tétano.

\*\*\*N – Resultado Negativo

Entretanto, no Grupo 03, representado por 36 equinos imunizados com vacina óctupla, foram observadas reações negativas inespecíficas em quatro animais pelo método IDGA, totalizando 11,11% de ocorrência desse tipo de reação. Do mesmo modo, verificou-se no Grupo 04, composto por 26 animais expostos a vacina contra leptospirose, que quatro equinos demonstraram reações negativas inespecíficas ao IDGA, representando 15,38% de ocorrência no grupo (Tabela 3).

**Tabela 3** – Ocorrência de reações negativas inespecíficas no diagnóstico de AIE pela técnica de IDGA, após inoculação de diferentes produtos em grupos de equinos pertencentes a centros de treinamento de tambor e baliza (2014).

GRUPOS	TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS	REAÇÕES NEGATIVAS INESPECÍFICAS	OCORRÊNCIAS (%)
01	Solução Ringer lactato	06	00	00
02	Vacina tríplice*	10	00	00
03	Vacina ócupla**	36	04	11,11
04	Vacina anti-leptospirose	26	04	15,38
<b>TOTAL</b>		<b>78</b>	<b>08</b>	<b>10,26</b>

\* Vacina tríplice: contra encefalomielite, influenza equina e tétano.

\*\*Vacina ócupla: vacina contra influenza; encefalomielite; rinopneumonite equina e tétano.

No Grupo 03, os quatro equinos vacinados contra influenza, encefalomielite; rinopneumonite equina e tétano (vacina ócupla) que apresentaram reações negativas inespecíficas demonstraram esse tipo de reação nas amostras da quinta coleta (35º dia) ao teste de IDGA. Sendo que, em dois desses equinos, as reações iniciaram a partir das amostras da quarta coleta (28º dia). Em outro animal, a reação inespecífica foi visualizada a partir do 21º dia e no quarto equino, a reação deu-se apenas no 35º dia após a inoculação da vacina (Tabela 4).

**Tabela 4** - Equinos vacinados contra influenza, encefalomielite; rinopneumonite equina e tétano (vacina ócupla) que apresentaram reações negativas inespecíficas pelo método IDGA em intervalos de sete dias (2014).

ANIMAL	PROVAS DE IDGA				
	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	35º dia
X <sub>B</sub>	N*	N	N	N (R.I)**	N (R.I)
Y <sub>B</sub>	N	N	N	N (R.I)	N (R.I)
W <sub>B</sub>	N	N	N (R.I)	N (R.I)	N (R.I)
Z <sub>B</sub>	N	N	N	N	N (R.I)

X<sub>B</sub>, Y<sub>B</sub>, W<sub>B</sub>, Z<sub>B</sub> – Equinos do Grupo 03 / Propriedade B

\*N – Negativo

\*\*N (R.I) – Negativo com Reação Inespecífica

Dos quatro equinos vacinados contra leptospirose (Grupo 4) que apresentaram reações negativas inespecíficas, apenas um demonstrou linhas inespecíficas nos cinco controles sorológicos aos quais foi submetido; em outro animal, as reações iniciaram a partir do 14º dia e se estenderam até o 35º dia; em um equino, a mesma reação limitou-se ao 7º dia e no quarto animal, a reação inespecífica restringiu-se ao 21º dia após a inoculação da vacina (Tabela 5). Os soros que mostraram reações negativas inespecíficas foram submetidos à contraprova e ratificaram os primeiros resultados.

**Tabela 5** - Equinos inoculados com vacina anti-leptospirose que apresentaram reações inespecíficas pelo método IDGA em intervalos de sete dias (2014).

ANIMAL	PROVAS DE IDGA				
	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	35º dia
X <sub>c</sub>	*N (R.I)	N (R.I)	N (R.I)	N (R.I)	N (R.I)
Y <sub>c</sub>	**N	N (R.I)	N (R.I)	N (R.I)	N (R.I)
W <sub>c</sub>	N (R.I)	N	N	N	N
Z <sub>c</sub>	N	N	N (R.I)	N	N

X<sub>c</sub>, Y<sub>c</sub>, W<sub>c</sub>, Z<sub>c</sub> – Equinos do Grupo 4 / Propriedade C

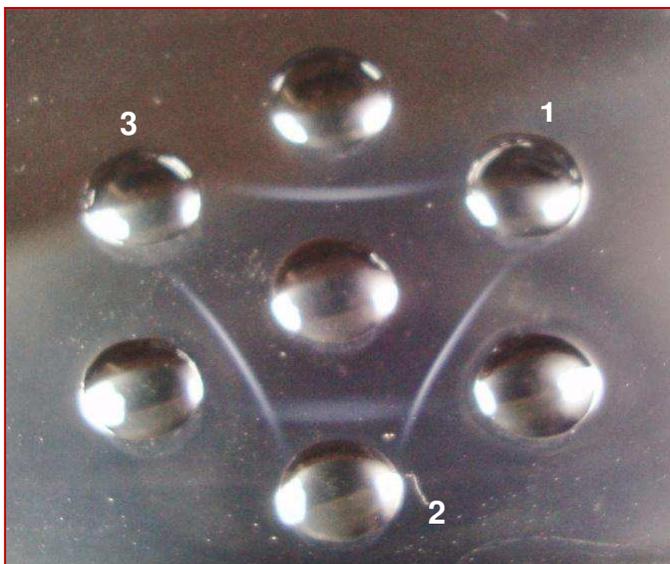
\*Negativo com Reação Inespecífica

\*\*N – Negativo N (R.I)

Com relação à técnica de Fixação de Complemento, não foram observadas reações inespecíficas nos testes realizados após adoção prévia de diferentes tratamentos.

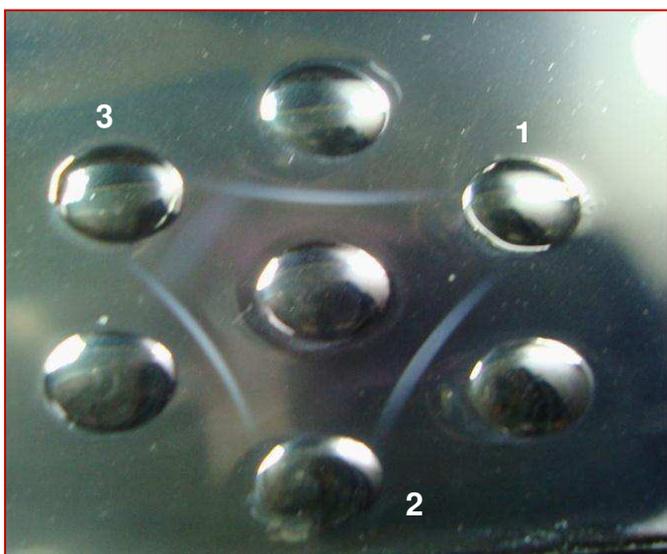
As reações inespecíficas verificadas pelo método IDGA nas amostras correspondentes ao Grupo 03, cujos equinos foram inoculados com vacina contra influenza, encefalomielite; rinopneumonite equina e tétano; caracterizaram-se pela apresentação de linhas inespecíficas do tipo reta, suave e de pouco brilho (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Linha inespecífica (poço 2) em resultado negativo ao IDGA observada em equino vacinado contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina e tétano.



Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Linha inespecífica (poço 3) do tipo simples, suave e opaca em resultado negativo ao IDGA observada em equino vacinado contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina e tétano.

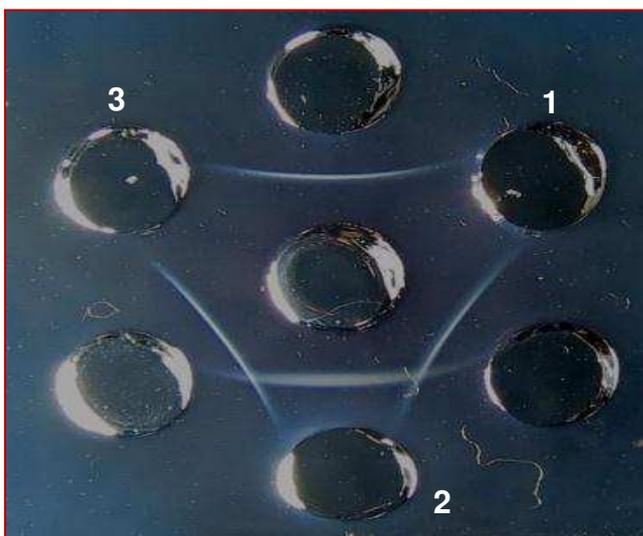


Fonte: Autoria própria.

Enquanto que as amostras do Grupo 04, cujos equinos foram vacinados contra leptospirose destacaram-se pela demonstração de linhas inespecíficas

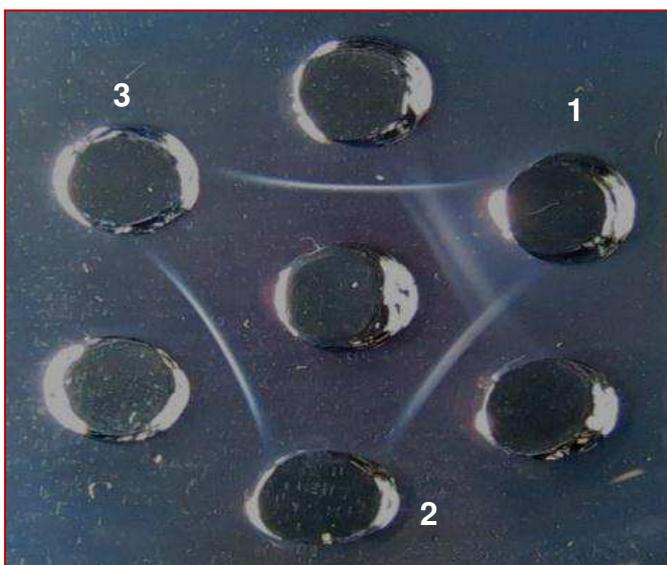
diversas: simples e compostas; fortes e brilhosas; retas e levemente encurvadas (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Figura 10 - Linha inespecífica simples, levemente curva, suave e brilhante (poço 2) em resultado negativo ao IDGA observada em equino vacinado contra leptospirose.



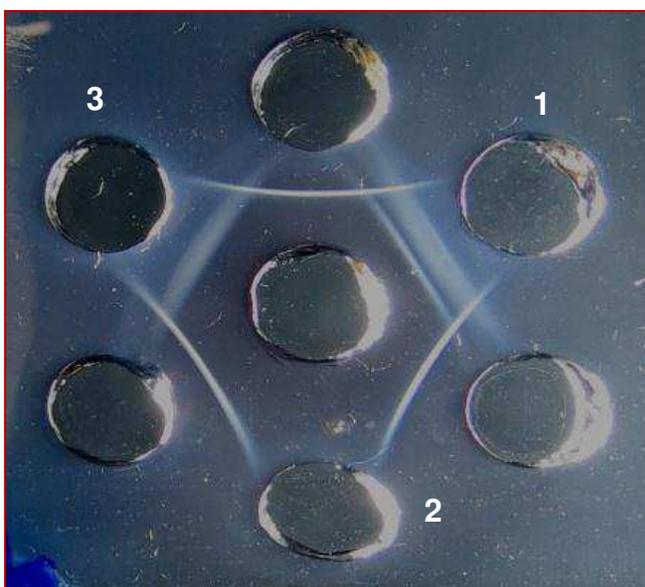
Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Reação negativa inespecífica (poço 1) com linhas inespecíficas compostas (duplas), retas e opacas em resultado negativo ao IDGA verificadas em equino vacinado contra leptospirose.



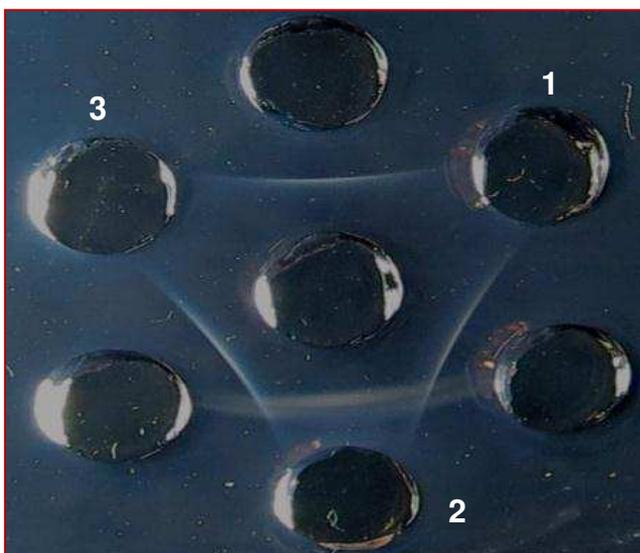
Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Linhas inespecíficas duplas e brilhantes (poços 1 e 3) em resultados negativos ao IDGA observadas em equinos vacinados contra leptospirose.



Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Linhas inespecíficas duplas e opacas (poço 2) em resultado negativo ao IDGA verificadas em equino vacinado contra leptospirose.



Fonte: Autoria própria.

Entretanto, apesar das reações inespecíficas apresentarem características acentuadas e peculiares, o número de ocorrências verificadas nos Grupos experimentais 03 e 04, não demonstrou significância estatística ( $P > 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÕES

Os resultados negativos obtidos pelos métodos de IDGA e FC demonstraram que o uso de vacinas em equinos em período que antecede a realização de exames laboratoriais para diagnóstico de AIE e Mormo, não induz a soroconversão, uma vez que os animais foram submetidos aos mesmos controles sorológicos na fase pré-vacinal do estudo e obtiveram igual resultado.

Tais achados divergem dos encontrados por Jacobo et al. (2006) que ao utilizarem 82 equinos soronegativos submetidos a tratamentos com vacinas e complexo mineral com compostos orgânicos, demonstraram que 16,7% do grupo de animais vacinados contra influenza equina e 16,7% daqueles inoculados com complexo mineral com extratos vegetais foram falso-positivos pelo método IDGA. E, 25% dos equinos que receberam duas doses do último produto, também apresentaram resultados não específicos, o que confirmou que os tratamentos utilizados provocaram a soroconversão. Entretanto, é válido destacar que a similaridade entre os estudos, baseia-se na utilização de produtos que continham componentes biológicos (vacinas e extratos vegetais), como tratamentos que antecederam os testes diagnósticos, gerando a hipótese de que esses componentes seriam responsáveis pelas reações inespecíficas.

A Portaria nº 84/1992 – SDA/MAPA indica como causa para a ocorrência de reações inespecíficas ao IDGA, a formação de outras interações Ag-Ac não específicas da p26 do vírus da AIE, mas com antígenos molecularmente muito próximos. Na presente pesquisa, após análise estatística, verificou-se que a ocorrência de reações negativas associadas a linhas de precipitação inespecíficas obtidas pelo método IDGA não estão correlacionadas à utilização de vacinas. Portanto, as linhas inespecíficas observadas não foram induzidas por reações imunológicas decorrentes do uso de vacinas. No entanto, fornece um dado que poderá ser acrescentado à legislação, visto que a Portaria Nº 84/1992 – SDA/MAPA relata apenas a ocorrência simultânea de reação positiva (específica para AIE) associada à linha de precipitação inespecífica. Ao contrário do protocolo de leitura para o teste de IDGA, adotado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em que reações negativas inespecíficas também são demonstradas (USDA, 2008).

Verificou-se ainda durante a leitura dos resultados que as reações negativas inespecíficas de maior destaque caracterizadas pela apresentação de linhas inespecíficas duplas (compostas) e brilhantes foram demonstradas no grupo experimental exposto a vacina contra leptospirose. Aquele desafiado com vacina óctupla (contra influenza, encefalomielite, rinotraqueíte equina e tétano) também apresentou linhas inespecíficas, porém mais suaves e com traços ou curvas unitárias (simples). A carência de dados na literatura, voltados à caracterização de linhas inespecíficas pela técnica de IDGA, após utilização de vacinas ou outros produtos biológicos, limitou a discussão comparativa dos resultados obtidos.

Com relação à interpretação dos resultados encontrados pelo método IDGA, Oliveira (2011) destacou que as reações inespecíficas verificadas durante análise comparativa de dois kits diagnósticos, não interferiram nas leituras dos testes após período de incubação de 48 horas. Do mesmo modo, neste estudo, a ocorrência de tais reações não prejudicou a leitura e interpretação dos resultados. Apesar da não interferência, Silva (2007), destacou durante avaliação de um antígeno comercial e soro controle utilizados na técnica de IDGA, que reações inespecíficas são fenômenos indesejáveis e que podem ser utilizadas como um parâmetro de qualidade para análise de kits comerciais.

Quanto à técnica de FC para diagnóstico de mormo, não houve o aparecimento de animais falso-positivo, inconclusivo ou anti-complementar após utilização prévia de diferentes vacinas, comprovando que aquelas rotineiramente utilizadas no manejo sanitário de equinos, tais como: influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina, tétano e leptospirose não provocam interferência no teste diagnóstico de FC.

## 6 CONCLUSÕES

- As vacinas contra influenza, encefalomielite, rinopneumonite equina, tétano e leptospirose utilizadas previamente à realização de testes de IDGA e Fixação de Complemento não interferiram no diagnóstico de AIE e Mormo;
- A ocorrência de reações inespecíficas observadas em equinos submetidos à vacinação não demonstrou significância estatística;
- A observação simultânea de reações negativas associadas a linhas inespecíficas no IDGA para diagnóstico de AIE serve para fundamentar alterações na legislação vigente sobre diagnóstico dessa enfermidade.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, U. C. P.; SILVA, R. A. M.; BARROS, T. M. B. Avaliação do controle da Anemia infecciosa equina em fazendas na Sub-Região da Nhecolândia, Pantanal Sul Mato Grossense. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO ECONÔMICOS DO PANTANAL, 4., 2004, Corumbá. **Anais...** Corumbá, 2004.

AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS. Infectious Disease Committee Manual: Infectious Diseases of Concern to Captive and Free Ranging Animals in North America. 2. ed. Yulee, FL: AAZV, 2013.

Disponível em:

<[http://c.ymcdn.com/sites/www.aazv.org/resource/resmgr/IDM/IDM\\_Glanders\\_2013.pdf](http://c.ymcdn.com/sites/www.aazv.org/resource/resmgr/IDM/IDM_Glanders_2013.pdf)> Acesso em: 27 jul. 2014

ALMEIDA, V. M. A. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 141-148, abr. 2006.

ALMEIDA, H. B. **Sincronização do estro e dinâmica folicular de éguas crioulas submetidas a tratamentos com Norgestomet, Acetato de Melengestrol e Altrenogest.** 2001. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, São Paulo, 2001.

AL-ANI, F. K.; ROBERSON, J. Glanders in horses: A review of the literature.

**Vet. Arhiv.** v. 77, n. 3, p. 203-218, 2007. Disponível em:

<<http://www.vef.unizg.hr/vetarhiv/papers/2007-77-3-1.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2014.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos.** São Paulo: Editora Roca Ltda, 1999, p.142-147.

BLACKLAWS, B. A. et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Vet. Microb.** v. 101, n. 3, p.199-208, 2004. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113504001555>>. Acesso em: 05 abr. 2014.

BLAHA, T. Glanders. In: \_\_\_\_\_ **Applied veterinary epidemiology.** Nova Iorque: Elsevier, 1989, p. 109-201.

BRASIL. **Manual de Preenchimento para emissão de Guia de Trânsito Animal de Equídeos.** MAPA. Versão 17.0, 2014. Disponível em:

<[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Manual%20GTA%20equ%C3%ADdeos%2017\\_0.Pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual%20GTA%20equ%C3%ADdeos%2017_0.Pdf)>. Acesso em: 05 de abr. 2014.

\_\_\_\_\_. Secretaria da Saúde do Ceará. Agência de Defesa Agropecuária do Ceará – ADAGRI. **Nota técnica nº 02, de 26 de dezembro de 2012**. Disponível em: <[file:///C:/Users/DANIEL%20MIRANDA/Downloads/nota\\_tecnica\\_02\\_2012\\_26.12.12.pdf](file:///C:/Users/DANIEL%20MIRANDA/Downloads/nota_tecnica_02_2012_26.12.12.pdf)>. Acesso em: 04 abr. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 18, de 18 de julho de 2006. Aprova o modelo da Guia de Trânsito Animal (GTA) a ser utilizado em todo o território nacional para o trânsito de animais vivos, ovos férteis e outros materiais de multiplicação animal conforme legislação vigente, na forma do Anexo I. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 jul. 2006. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006. Organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 mar. 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16847>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 45, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para prevenção e o controle da Anemia Infecciosa Equina – A.I.E. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 jul. 2004. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8136>>. Acesso em: 20 maio 2012.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 05 de abril de 2004. Aprova as normas para o controle e a erradicação do mormo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 abr. 2004. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=6896>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 12, de 29 de janeiro de 2004. Aprova as normas para o credenciamento e monitoramento de laboratórios para diagnóstico sorológico do mormo por meio da técnica de Fixação do Complemento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 fev. 2004. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 84, de 19 de outubro de 1992**. Aprova as normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de anemia infecciosa equina. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 out. 1992. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17256>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 200, de 18 de agosto de 1981**. Altera a lista de moléstias infecto-contagiosas, previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal, para incluir a ANEMIA INFECCIOSA EQUINA - AIE. Disponível em: <[http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro\\_ged/pdf/363\\_GED.pdf](http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/363_GED.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2012.

\_\_\_\_\_. Decreto Federal nº 24.548, de 03 de julho de 1934, da Presidência da República. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1930-1949/D24548.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24548.htm)>. Acesso em: 17 out. 2012.

CARTER, G.R.; WISE, D.J. **Essentials of Veterinary Bacteriology and Micology**. 6.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004, cap. 13. p. 115-116.

CARVALHO FILHO, M. B. **Desenvolvimento e avaliação de um novo método para produção de maleína para diagnóstico de mormo**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

CERNITAS. **Esquema da Fixação de Complemento com Diferentes Resultados**. Disponível em:< <http://www.cernitas.com.br/content/2009/12/resultados-do-exame-de-mormo/>>. Acesso em: 09 jul. 2014

CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T. C. Equine infectious Anemia Virus: Immunopathogenesis and Persistence. **Rev. Infect. Dis.** v. 7, p. 83-88, 1985.

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

COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa**. v. 2. Oxford University Press. 1994. p. 800-802.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. **Retroviruses**. Nova Iorque: Cold Harbor Laboratory Press, 1997. 843 p. ISBN 10: 0-87969-5714.  
CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus. **Encyclop. of Virol.**, 2. ed., v. 2, p.167-174, 2008.

DERBYSHIRE, J. B. The eradication of glanders in Canada. **Can. Vet. J.** v.43, p. 722-726, 2002.

DUPONT, O. 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.

FRANCO, M. M. J; PAES, A. C. Anemia Infecciosa Equina. Revisão de literatura. **Vet. Zootec.** v. 18, n. 2, p. 197-207, 2011.

FENNER, F. et al. **Virologia Veterinária**. 2. ed. Academic Press, 1993.

FIORILLO, K. S. **Prevalência de Anemia Infecciosa Equina em Haras de Minas Gerais**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

FLURI, A. et al. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. **Vaccine**, v. 24, p. 597-606, 2006.

HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. In: HIRSH, D. C.; BIBERSTEIN, E. L. **Vet. Microb.** 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2004. cap.17, p.113-114.

HOWE, L. et al. Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. **J. Virol.**, v. 76, p.10588-10597, 2002.

ISSEL, C. J. **Equine Infectious Anemia Program Website**. University of Kentucky, Lexington, Kentucky, 2009.

ISSEL, C.J et al. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). **J. Equine Vet. Sci.** v. 19, p. 728-32, 1999.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.5, p.137-141, 1993.

ISSEL, C.J . et al. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. **Vet. Microbiol.**, v.17, p. 251, 1988.

ISSEL, C. J; COGGINS, L. Equine infections anemia: current knowledge. **J. Am. Med. Assoc.** v. 174, n. 7, p. 727-733, 1979.

JACOBO, R. A. et al. Reacciones inespecíficas em el diagnóstico de anemia infecciosa equina. **Rev.Vet. Corrientes.** a. 26, n. 151, 2006.

LANGEMEIER, J. L. et al. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 34, n. 6, p.1481-1487, 1996.

LEROUX, C.; CADORÉ, J.; 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.

LESCHONSKI, C. Vacinar é preciso? **Horse Ilimitada.** v.10, n. 3. p. 62-67, 2002.

LI, F. et al. The S2 gene of equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. **J. Virol.**, v. 74, p. 573-579, 2000.

LIMA, C. M. S. N. M. **Fatores de risco e distribuição espacial da anemia infecciosa equina no Estado do Maranhão, no período 2008 a 2010.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2012.

MARTARANO, L. et al. Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. **J. Virol.**, v. 68, p. 3102-3111, 1994.

MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L. K.; PORTER, J. P. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p. 50-52, 1989.

MAYER, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. 3 ed. Porto Alegre: Sulina, 1988.

MCGUIRE, T.C.; FRASER, D. G.; MEALEY, RH. Cytotoxic T lymphocytes in protection against equine infectious anemia virus. **Anim. Health Res. Rev.**, v.5, n. 2, p. 271-276, 2004.

MOTA, R. A. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo. **Vet. e Zootec.** v.13, n.2, p. 117-124, 2006.

MOTA, R. A. et al. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 4, p. 15-159, 2000.

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

MONTELARO, R. C. et al. Isolation and comparative biochemical of the major internal polypeptides of equine infectious anemia virus. **J. Virol.**, v. 42, n. 3, p.1029-1038, 1982.

MONTELARO, R. C. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia vírus, a retrovirus. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 10539-10544, 1984.

MORAES, D. D. A. **Prevalência de mormo e anemia infecciosa equina em equídeos de tração do Distrito Federal**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MURPHY, F. A. et al. **Veterinary virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999.

NAGARAJAN, M. M; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **J. Virol Methods**. v.94, p. 97-109, 2001.

NAUREEN, A. et al. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.19. p.362-367, 2007.

NEUBAUER, H. et al. Serodiagnosis of Burkholderia mallei infections in horses: state-of-the-art and perspectives. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.** v. 52, p. 201-205, 2005.

NOCITI, R.P. et al., 2008. Prevalência da anemia infecciosa equina no estado do Mato Grosso de 2004 a 2007. Disponível em:  
<<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0630-3.pdf> >  
Acesso em: 09 de jul. 2014.

OAKS, J.K. et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **J. Virol.** v. 72, p.7263-7269, 1998.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Glanders. **OIE Terrestrial Manual.** OIE, Paris, France, 2013. cap. 2.5.11. Disponível em:  
< <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> >. Acesso em: 09 jul. 2014.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Equine Infectious Anaemia. **OIE Terrestrial Manual.** OIE, Paris, France, 2013. cap. 2.5. 6. Disponível em:  
<<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 25 maio 2014.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Disease distribution maps. Terrestrial: Equine Infectious Anaemia. Report: Jul. – Dec., 2013. Disponível em:<[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang/en?disease\\_type\\_hidden=&disease\\_id\\_hidden=&selected\\_disease\\_name\\_hidden=&disease\\_type=0&disease\\_id\\_terrestrial=59&species\\_t=0&disease\\_id\\_aquatic=999&species\\_a=0&sta\\_method=semesterly&selected\\_start\\_year=2013&selected\\_report\\_period=2&selected\\_start\\_month=1&date\\_submit=OK](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang/en?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=59&species_t=0&disease_id_aquatic=999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2013&selected_report_period=2&selected_start_month=1&date_submit=OK)>. Acesso em: 09 jul. 2014.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Disease distribution maps. Terrestrial: Glanders. Report: Jul. – Dec., 2013. Disponível em:<[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease\\_type\\_hidden=&disease\\_id\\_hidden=&selected\\_disease\\_name\\_hidden=&disease\\_type=0&disease\\_id\\_terrestrial=63&species\\_t=0&disease\\_id\\_aquatic=999&species\\_a=0&sta\\_method=semesterly&selected\\_start\\_year=2013&selected\\_report\\_period=2&selected\\_start\\_month=1&date\\_submit=OK](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=63&species_t=0&disease_id_aquatic=999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2013&selected_report_period=2&selected_start_month=1&date_submit=OK)>. Acesso em: 09 jul. 2014.

OLIVEIRA, F. G. **Validação da imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico da anemia infecciosa equina em equídeos e comparação com o elisa rgp90 e imunoblot.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA, R. A., 2007. **Vacinação e vermifugação de equinos no Brasil.** Disponível em: < <http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/vacinacao.htm> >. Acesso em: 20 abr. 2014.

PARREIRA, D. R. **Coinfecção por *Trypanosoma evansi* (Steel 1885), Balbiani 1888, e pelo vírus da anemia infecciosa equina em cavalos do Pantanal Sul Matogrossense.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

PASICK, J. Maed-Visna vírus and caprine arthritis encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Can J Vet Res.** v. 62, p. 241-244, 1998.

QUINN, P. J. et al. **Retroviridae.** In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. p. 346-58.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2002.

**RANGE OF REACTIONS TO EXPECT IN THE AGID.** Disponível em: <<http://dept.ca.uky.edu/eia/index.aspx>>. Acesso em: 01 maio 2014.

RASTY, S. et al. Proviral DNA integration and transcriptional patterns of equine infectious anemia virus during persistent and cytopathic infections. **J. Virol.**, v. 64, p. 86-95, 1990.

RAVAZZOLO A. P.; COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 809-38.

REIS, J. K. P. et al. 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, 1997.

SANFORD, J.P. *Pseudomonas* species (including maloidosis and glanders). In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. P. **Principles and practice of infectious diseases**. 8. ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone. p. 2003-2008, 1995.

SANTOS, E. M. et al. Avaliação da Nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e Elisa para diagnóstico da anemia infecciosa equina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 36, n. 2, p. 296-301, 2011.

SANTOS, E. M. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) em PBMC e lavado broncoalveolar para diagnóstico da anemia infecciosa equina**, 2006. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

SANTOS, F. L.; FILHO, H. C. M.; MENDONÇA, C. L. Mormo. In: RIET, et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3. ed., v.1, Fernovi Editora, p. 394-404, 2007.

SCHELL, M. A. et al. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. **Mol. Microbiol.** v. 64, n. 6, p. 1466-1485, 2007.

SEARCY, G. P. Sistema hemopoiético, In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. Patologia veterinária especial de Thomson. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 305-352, 1998.

SILVA, K. P. C. et al. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.5, p. 439-444, 2009.

SILVA, A. R. S. **Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina: análise comparativa de sistemas comerciais de diagnóstico por imunodifusão**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências na Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, L. B. G. **Diagnóstico Microbiológico do Mormo em Equídeos e Infecção Experimental em Cobaias (*Cavia porcellus*) pela *Burkholderia mallei*: Aspectos clínicos e Anátomo-histopatológico**, 2003. 70f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2003.

SOUTULLO, A. et al. Design and validation of an Elisa for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. **Vet. Microbiol.** n. 79, p. 111-121, 2001.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS: user's guide statistics. Versão 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 1 CD-ROM. SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus Res.** v. 32, p. 111-138, 1994.

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

SULZBECK, C. E. B.; PEREIRA, J. R. Ocorrência da anemia infecciosa equina no município de Campos do Jordão, no período de abril de 1996 a julho de 2000. **Arq. Inst. Biol.** v. 67 (supl.), p.1-145, 2000.

TELES, J. A. et al. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n.9, p.838-842, 2012.

TRAUB-DARGATZ, D.C. Equine Infectious Anemia. In: SELLON, D.C. **The Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**. 1.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. p. 321-336.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**. 8. ed. Cornell University Press. Ithaca.p.951, 1988.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p

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

USAHA. United States Animal Health Association. Foreign Animal Diseases. 7.ed. Canada: Boca Publications Group, 2008. p.281-286.

VERMA, et al. Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. **Vet. Microbiol.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p.2577-2585.

WEIBLEN, R. Doenças Víricas. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Pelotas: UFPEL, 1998. p. 41-44.

WILKINSON, L. Glanders: medicine and veterinary medicine in common pursuit of contagious disease. **Med.Hist.** v. 25, 1981.