

# COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE IDGA Y cELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EN CABALLOS CRIOLLOS VENEZOLANOS

## COMPARISON OF AGID AND cELISA TEST FOR EQUINE INFECTIOUS ANEMIA DIAGNOSIS IN CREOLE HORSES FROM VENEZUELA

Ysabel Márquez-Alvarado.<sup>1\*</sup>, Adelys Márquez-Alvarado.<sup>1</sup>, Carmen Meléndez-Pereira<sup>1</sup>, Villanny Villarreal-Alvarez<sup>1</sup>, Yaritza Salas-Araujo.<sup>1</sup> y José Canelón-Pérez.<sup>2</sup>

Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA)- Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV). <sup>1</sup>Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM), \*0251-2592630 isabelmarquez@ucla.edu.ve <sup>2</sup>Departamento de Producción e Industria Animal Barquisimeto – Venezuela.

### RESUMEN

El caballo criollo forma parte de la biodiversidad venezolana, además de ser utilizado como animal de trabajo por su rusticidad. Se encuentra frecuentemente expuesto a patógenos, entre ellos el virus de la anemia infecciosa equina (AIE), el cual produce una enfermedad transmisible de carácter crónico que afecta a los équidos. La prueba de inmunodifusión en gel agar (IDGA) es utilizada para detección de anticuerpos contra esta enfermedad y el diagnóstico de un animal positivo es de declaración obligatoria. Ante la necesidad de un mejor control de esta importante enfermedad, se planteó comparar las técnicas de IDGA y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (cELISA) para el diagnóstico de AIE en caballos criollos venezolanos. Se tomaron muestras de sangre a 101 caballos del hato Las Palmeras, distrito Muñoz, estado Apure, a partir del suero se realizó el diagnóstico por IDGA, según la técnica del test de Coggins y prueba de cELISA para detección de anticuerpos en suero equino. Los resultados fueron analizados mediante índice de concordancia Kappa y prueba de sensibilidad y especificidad para pruebas diagnósticas por SPSS. Con la técnica de IDGA se obtuvo 96 % de animales negativos y 4 % positivos, mientras que con cELISA se obtuvo 89,8 % negativos y 10,2 % positivos, es decir, que por esta última se obtuvo 6 % más de animales positivos. El índice de concordancia Kappa fue de 0,53. Además, la prueba de cELISA es confiable por ser altamente específica y sensible por lo que la probabilidad de un falso positivo o falso negativo es baja en comparación a IDGA. Así mismo, es evidente la necesidad actual de la aprobación oficial de pruebas serológicas más eficaces y el desarrollo continuo de técnicas adecuadas para la detección de la AIE.

**Palabras clave:** Caballo criollo; AIE; IDGA; cELISA

### ABSTRACT

The Venezuelan creole breed of horses is part of the biodiversity landscape, also it is used for work due to its hardiness. It is often exposed to pathogens including equine infectious anemia virus (EIAV), which produces a chronic transmissible disease affecting equines. Agar gel immunodiffusion test (AGID) is used for detection of antibodies against EIAV and the diagnosis of a positive animal is of mandatory notification. Due to the need for better control of this important disease, this investigation proposed to compare AGID and competitive techniques (cELISA) for EIA diagnosis in Venezuelan creole breed of horses. One hundred and one (101) blood samples were taken from horses in the Palmeras farm, Muñoz Municipality, Apure State. Afterwards, EIA diagnosis through AGID and cELISA from equine sera was performed. Results were analyzed using Kappa index and sensitivity and specificity of diagnostic tests were calculated by SPSS. 96% of negative and 4 % of positive animals were obtained through AGID, whereas through ELISA 89.8 % of negative and 10.2 % of positive animals were obtained, that is to say that for ELISA test 6 % more positive animals were observed. The Kappa index of concordance was 0.53. On the other hand, cELISA test is reliable, highly specific, and sensitive so that the probabilities of false positives or false negatives are low compared to AGID. Moreover, the current need for the official approval of more effective serological tests and the continued development of appropriate techniques for the detection of EIA, is evident.

**Key words:** Creole horse breed; EIA; AGID; cELISA.

## INTRODUCCIÓN

El caballo criollo venezolano (CCV) forma parte de la biodiversidad venezolana, el mayor número de ejemplares está en el estado Apure, Venezuela. Este ejemplar se cría de manera extensiva y su población ha disminuido notablemente, debido a la reducción del espacio donde vive (cerca de grandes explotaciones ganaderas), por el cruzamiento con razas exóticas (Cuarto de Milla, Árabe, Pura Sangre de Carrera, entre otras) y las enfermedades enzoóticas que lo afectan. Además, es un patrimonio zootécnico con características específicas que vale la pena preservar como factor de experimentación y como elemento genético. Su desempeño más importante es como animal de trabajo por su rusticidad, utilizado preferentemente para faenas de arreo, aparte y captura de bovinos (*Bos primigenius*) destinados a la producción de carne y en menor escala es medio de transporte y carga [4].

Según el medio donde habita, frecuentemente está expuesto a diferentes agentes patógenos, entre ellos al virus de la anemia infecciosa equina (AIE), enfermedad vírica transmisible y crónica que afecta a los equinos. Otra denominación de la enfermedad es Sida de los equinos, debido a que es causado por un lentivirus el cual es una subclasificación de los retrovirus [22]. Esta es una enfermedad que se ha comprobado que es transmitida por insectos hematófagos (*Tabanus*, *Stomoxys*, *Aedes* y *Anopheles*), al igual que por agujas hipodérmicas contaminadas [5]. Varios autores han demostrado la transmisión de la enfermedad de la madre a la descendencia [12, 18, 24, 25].

La AIE es una enfermedad de distribución mundial [2, 9, 24] que ocasiona grandes pérdidas en la especie equina [9] incluyendo al CCV, al igual que la leucosis bovina es transmitida por agentes hematófagos. Es descrita por primera vez en Venezuela por Kubes [13] y posteriormente confirmada por Gallo y Vogelsang [8]. En Venezuela se ha descrito un 38,27% de positividad de la AIE en el periodo de septiembre 1974 a octubre 1988, y 10,07% para 1985 [22]. Para el estado Portuguesa, que forma parte de la región de los llanos venezolanos, se encuentran diferentes porcentajes de prevalencia: Liendo en 2004 [14] describe una prevalencia de 33%; por su parte Linares [15] en época de lluvia la ubica en 37%, mientras que en sequía de 34,10% diagnosticados por IDAG.

El poder patógeno del agente viral de esta enfermedad varía según la cepa: cepas muy virulentas como por ejemplo la cepa Wyoming poseen un período de incubación corto y causan una enfermedad mortal, mientras que cepas poco virulentas como la francesa tienen un período de incubación largo y cursan con enfermedad benigna. Por su parte, el poder antigénico está caracterizado por la existencia de antígenos internos (p15, p26) comunes a todas las cepas virales y que se pueden poner de manifiesto por medio de la prueba de fijación de complemento, inmunofluorescencia y especialmente por IDGA (test de Coggins) la cual se ha oficializado como prueba diagnóstica [21].

La técnica de cELISA se ha utilizado para el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, sus resultados son discrepantes si se le compara con la IDGA, así tenemos que Pare y Simard [19] han

demostrado equivalencias en dos kits de IDGA y tres diferentes kits comerciales de cELISA utilizando la proteína recombinante p26, considerando la posibilidad de su implementación en Canadá como prueba oficial, mientras que Burki y Rossmanith [3] reportan diferencias de sensibilidad del IDGA contra ELISA no competitivo, siendo este último menos sensible. En Venezuela no se han realizado estudios comparativos entre la prueba IDGA y el análisis inmunoenzimático ELISA.

Actualmente, la prueba de IDGA es la prueba oficial utilizada para la identificación de anticuerpos contra esta enfermedad en el país y el diagnóstico de un animal positivo es de declaración obligatoria y conlleva al sacrificio del animal. En virtud de lo grave del problema y en vista de la disminución del número de ejemplares de la raza criolla, se plantea a efectos de establecer estrategias de control y erradicación de la enfermedad, comparar las técnicas de IDGA y cELISA para el diagnóstico de AIE en el CCV en un hato comercial del distrito Muñoz del estado Apure.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población y muestra

La población estuvo constituida por 200 CCV, de los cuales se seleccionó al azar una muestra de 101 animales que forman parte de la población de riesgo, al convivir con animales enfermos de AIE provenientes del hato Las Palmeras, municipio Muñoz del estado Apure, el cual se ubica a una altitud de 125 m, latitud 07° 14' 48" N, longitud 070° 43' 45" O. Pertenecen a un grupo de hatos que colaboran con la Cátedra Libre de Estudio y Conservación del Caballo Criollo Venezolano (DCV-UCLA), el clima se encuentra ubicado en un piso térmico tropical de sabana y bosque tropofitos semi-húmedo, caracterizado por tener un periodo lluvioso de seis a siete meses y el resto de sequía. La temperatura media anual es de 27,5°C con mínima de 18,4°C en los meses de enero y febrero en horas de la mañana y máximas de 40,2°C en horas de la tarde [7].

### Toma de muestras de Sangre

Se tomó una muestra de sangre por punción en la vena yugular con un sistema de tubos al vacío sin anticoagulante (BD vacutainer®, NJ, EUA), las cuales fueron identificadas y centrifugadas a 600 g por 15 minutos en una centrífuga Clay Adams modelo 21152® (sparks, MD, EUA) para separar el suero. Posteriormente fueron introducidas en una cava contentiva de hielo y llevadas al laboratorio de la Unidad de Investigación de Ciencias Funcionales "Dr. Haity Moussatché" (UNIHM), del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Allí una alícuota fue mantenida a -20°C en un congelador vertical marca Philco® (EUA) hasta su procesamiento por ELISA y otra se refrigeró para la prueba de IDGA. Para el diagnóstico se utilizaron pruebas inmunológicas antígeno-anticuerpo, como IDGA, según la técnica del test de Coggins, específica para AIE, mediante un kit comercial (VMRD, Inc; EUA), y para la prueba de cELISA se usó otro kit (IDEXX HerdCheck®, Madrid; España) para la

detección de anticuerpos en suero equino. Se tomaron 100 µl de muestras de suero por duplicado de cada animal y se colocaron en los pocillos que poseían un anticuerpo monoclonal específico. Posteriormente se agregaron 50 µl de solución conjugado de antígeno p26 con peroxidasa de rábano picante (HRPO), se mezclaron y se incubaron por 30 minutos a 37°C, tras tres lavados para eliminar los restos de solución se colocaron 100 µl de solución sustrato, se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó solución de frenado (SDS) para parar la reacción y se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda de 650 nm en el lector de placas Sun Rise (marca Tecan®, Austria). La cantidad de peroxidasa unida era inversamente proporcional a la concentración de los anticuerpos anti-p26 del suero de los equinos [16].

**Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante el grado de coincidencia entre las dos técnicas en base al índice de concordancia Kappa. Para el análisis de sensibilidad (S) o capacidad de la prueba de detectar los animales enfermos, especificidad (E) referido a la posibilidad de detectar correctamente los animales sanos, el valor predictivo positivo (VPP) o probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo y el valor predictivo negativo (VPN) o probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano [1]. Se consideró la IDGA como prueba de oro por ser la prueba oficial para el diagnóstico de la enfermedad. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17 (IBM, Madrid, España) [20].

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El diagnóstico definitivo de la AIE no puede realizarse en base a los signos clínicos o hallazgos de patología clínica, debido a que en muchos casos los animales no presentan signos evidentes de enfermedad o presentan alteraciones inespecíficas en los parámetros sanguíneos. En la actualidad para el comercio internacional, la prueba requerida para el diagnóstico de AIE es el test de Coggins; sin embargo, la prueba de ELISA ha sido probada y ha demostrado un alto grado de precisión. Ambas pruebas detectan los anticuerpos producidos contra el antígeno proteico de la cápside p26, la cual es una proteína antigénica altamente específica obtenida de la cápside viral, además de algunos otros antígenos que pueden ser detectados en los cELISA [5].

En el presente trabajo, con la técnica de IDGA se obtuvo 96% de animales negativos, mientras que con cELISA se obtuvo 89,8% de negativo y 10,2% de positivos, es decir que por esta última prueba se obtuvo 6% más de animales positivos. El índice de concordancia Kappa fue de 0,53 (TABLA I). El coeficiente de variación intraensayo fue de 0,66 y el interensayo de 5,01%.

**TABLA I  
PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS Y NEGATIVOS  
CON IDGA Y cELISA**

Prueba	Positivos	Negativos	Total
IDGA	4%	96%	100%
cELISA	10,2%	89,8%	100%

Tomando como prueba de oro la IDGA, en la Tabla II se observa la relación entre los resultados obtenidos a partir de ambas pruebas, cELISA y IDGA, se muestran los casos verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN); a partir de los cuales se obtuvo una sensibilidad o proporción del cELISA para detectar los verdaderos positivos de 100% y una especificidad o probabilidad de la prueba de detectar los verdaderos negativos de 97%.

**TABLA II  
RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR  
IDGA y cELISA.**

		IDAG		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	6 <sup>VP (S)</sup>	3 <sup>FP</sup>	9
	Negativo	0 <sup>FN</sup>	92 <sup>VN (E)</sup>	92
	Total	6	95	101

Índice de concordancia Kappa=0,53; Valor Predictivo Positivo=0,66; Valor Predictivo Negativo= 1; VP=Verdaderos Positivos; FP= Falsos Positivos; FN= Falsos Negativos; VN=Verdaderos Negativos; S=Sensibilidad; E=Especificidad.

En el presente estudio comparativo entre el cELISA y IDGA para el diagnóstico de AIE en el CCV, los resultados corroboran que la cELISA es una prueba altamente sensible capaz de detectar el 100% de los animales, aún cuando posean una baja tasa de anticuerpos en fase aguda, o bien en algunos equinos asintomáticos crónicos [3]. Esto hace que esta técnica sea de gran utilidad en el diagnóstico en fases iniciales de la enfermedad, además facilita procesar un alto número de muestras constituyendo una ventajosa prueba para tamizaje en poblaciones numerosas y su interpretación cuenta con mayor objetividad. Por otra parte, muestra una especificidad alta, y en base al fundamento de la técnica y a estos resultados se considera al cELISA capaz de detectar animales seropositivos en etapas tempranas de la enfermedad cuando en el test de Coggins resulten aún negativos.

Matsushita y col. [17] probaron un cELISA en 420 muestras, de las cuales 297 resultaron negativas, 122 positivos y 1 sospechoso con una correlación con la IDGA del 100%, concluyeron que el cELISA resultó equivalente en cuanto a sensibilidad y especificidad a la prueba oficial IDGA, por lo tanto, sugirieron considerar al cELISA adecuado para la detección de la AIE.

Recientes investigaciones apoyan la aseveración que a través de un cELISA se pueden detectar animales infectados en estadios tempranos de la enfermedad [11, 19, 21]. Se ha descrito que el periodo de incubación del virus de la AIE va a depender de la dosis del inóculo y la especie equina afectada, pero se estima entre 21 y 28 días (d), pudiendo ser mayor si la cepa involucrada posee una menor capacidad de virulencia [5, 11]. Issel y col. [11] reportaron sero-negatividad a través de test de Coggins en el 25% de casos, por lo menos 180 d post-inoculación (PI), mientras que a los 35 d PI resultaron positivos por cELISA e inmunoblot.

Por su parte, gracias a la alta especificidad del test de Coggins, el cual se caracteriza por su capacidad para detectar a los animales verdaderamente negativos, éste puede ser de gran utilidad para confirmar aquellos casos que resulten positivos al cELISA. Se ha sugerido comprobar un resultado positivo obtenido mediante cELISA utilizando IDGA debido a que se han detectado algunos resultados falsos positivos mediante cELISA [6]. Contrariamente, Scicluna y col. [23] observaron en un trabajo realizado en mulas (*Equus mulus*), que el uso exclusivo de IDGA para diagnóstico de la enfermedad es muy riesgoso ya que pueden resultar falsos negativos de animales realmente infectados, los cuales resultan positivos por cELISA, además concluyen que el IDGA es muy subjetivo ya que depende de la experiencia del personal de laboratorio.

Issel y col. [11] han señalado la necesidad del uso de pruebas serológicas que se apoyen entre sí para el diagnóstico definitivo de la AIE. Proponen un algoritmo diagnóstico que consiste en repetir el ELISA en aquellos casos que resulten positivos, si la seropositividad continúa se debe realizar IDAG, si en esta última resulta positivo se reporta con confianza como tal, de lo contrario si resulta negativo sugieren realizar inmunoblot para emitir el diagnóstico definitivo. Sin embargo, en las explotaciones ganaderas de Venezuela probablemente el factor económico sea una limitante, siendo imperante el uso del ELISA que ha demostrado ser una prueba más sensible.

Desde finales de 1980, se han producido una serie de kits [27, 28] que utilizan formatos de las pruebas de ELISA y han recibido una amplia aceptación; sin embargo, el IDAG sigue siendo la prueba serológica de oro para la evaluación de la enfermedad. Basados en el carácter de denuncia obligatoria de la AIE y las consecuencias que implica reportar falsos positivos o negativos, se considera importante evaluar y reeditar constantemente los protocolos y método diagnósticos con el fin de minimizar los posibles errores teniendo en cuenta el valor económico, sentimental y genético de los animales, como es el caso del CCV, cuya población cada día se ve más reducida.

Posiblemente, con la técnica de cELISA se puedan detectar animales positivos antes que los mismos puedan ser detectados por el test de Coggins, esto debido a que esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad ya que se usa antígeno de AIE purificado y anticuerpos monoclonales frente a la p26 [21]. Debido a las bondades de la prueba de cELISA, las probabilidades de un falso positivo o falso negativo son muy bajas en comparación al IDGA [21].

## CONCLUSIÓN

Sobre la base de los resultados se puede concluir que existe una concordancia moderada entre ambas técnicas. Por lo tanto, la prueba de cELISA se puede recomendar como herramienta para el diagnóstico de AIE. Así mismo, este trabajo evidencia la necesidad actual de la aprobación oficial de pruebas serológicas más eficaces y el desarrollo continuo de protocolos de diagnóstico para la detección de esta enfermedad.

## AGRADECIMIENTO

Agradecimientos al CDCTH-UCLA por financiamiento del proyecto 031-VE-2009.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALTMAN, D.; BLAND, J. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. **British Med. J.** 308:1552. 1994.
- [2] BUIDE, R. Diagnostico Serológico de la Anemia Infecciosa Equina. **Manejo de Haras Problemas y Soluciones.** Hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina. Pp. 557-604. 2008.
- [3] BURKI, F.; ROSSMANITH, E. Comparative evaluation of the agar gel immunodiffusion test two commercial ELISA kits for the serodiagnosis of equine infectious anemia. **Zentralbl Veterinarmed.** 37(6): 448-458. 1990.
- [4] CANELÓN, J. El caballo de trabajo en Venezuela: cría y manejo. **3er Coloquio Internacional sobre équidos de trabajo.** Div. Educ. Cont., México, 5 y 6 de Octubre, D.F. 37 pp. 1998.
- [5] COOK, R.; LEROUX, C; ISSEL, J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. **Vet Microbiol.** 167(1): 81–204. 2013.
- [6] DE LA SOTA, M. **Manual de Procedimientos para la detección de anemia infecciosa equina (AIE).** Servicio Nacional de Sanidad Animal Calidad Agroalimentaria. Argentina. Pp. 36-38. 2005.
- [7] EWEL, JJ.; ARNOLD, M.; TOSI, JP. Estado Apure y su topografía. En: **Zonas de Vida de Venezuela.** 2da ed. Ministerio de Agricultura y Cría. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Editorial Sucre, Caracas, Venezuela. 76-88. 1976.
- [8] GALLO, P.; VOGELSANG, G. Sinopsis nosográfica de las principales afecciones bacterianas por ultravirus y parasitaria de los mamíferos y aves domésticas de Venezuela. **Rev. Med. Vet. Parasitol.** 3(1): 157-162. 1941.

- [9] HOURRIGAN, J.; KNOWLES, R. Technical and regulatory aspects of equine infectious anemia. **Seminar on practical aspects of exotic disease control**. Wellington, 2 al 4 de Noviembre, New Zealand, Pp 1-242. 1974.
- [10] HYSLOP, N. Equine infectious anemia (Swamp fever) Review. **Vet. Rec.** 78(25): Pp 858-864. 1966.
- [11] ISSEL, C.; SCICLUNA, M.; COOK, S., COOK, R.; CAPRIOLI, A.; RICCI, I.; ROSONE, F.; CRAIGO, J.; MONTELARO, R.; AUTORINO, G. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. **Vet. Rec.** 172: 210-220.2013.
- [12] KEMEN, J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: transmission from infected mares to foals. **J. Amer. Vet. Med. Asso.** 161: 496-499. 1972.
- [13] KUBES, V. **Estudio acerca de la existencia de la anemia infecciosa de los equinos en América del sur. Su presencia en Venezuela y confusión con la tripanosomiasis caballar. Las llamadas peste boba y Derrengadera.** Segunda comunicación preliminar. Ministerio de Agricultura y Cría. Venezuela. Pp 1-35. 1939.
- [14] LIENDO, E. **Estudio retrospectivo en anemia infecciosa equina (AIE) en el estado Portuguesa de análisis serológicos ingresados en el centro diagnóstico Rosaura Pérez Gil comprendido en el periodo 2000-2003.** Trabajo Especial de Grado. Instituto Universitario de Tecnología del estado Portuguesa. Pp. 15-24, 2004.
- [15] LINAREZ, A. **Prevalencia de Anemia Infecciosa Equina en el Estado Portuguesa.** Universidad Experimental de los Llanos "Ezequiel Zamora". Guanare, Estado Portuguesa. Trabajo de Ascenso. Pp. 23-35, 2000.
- [16] MÁRQUEZ, Y.; SABALLO, A.; MÁRQUEZ, A.; LÓPEZ-ORTEGA, A. Validación de la técnica de ELISA para la determinación de las concentraciones séricas de las hormonas luteinizantes, folículo estimulante y 17  $\beta$  estradiol en cerdas adultas mestizas Landrace x Large White. **Gac. Cien. Vet.** 12(2): 77-79. 2007.
- [17] MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.; PORTER, J.; SMITH, B.; NEWMAN, L. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. **J. Vet. Diagnos. Invest.** 1: Pp 50-52. 1989.
- [18] MCCONNICO, R.; ISSEL, C.; COOK, S.; COOK, R.; FLOYD, C.; BISSON, H. Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares. **J. Equine Vet. Sci.** 20: 387-92. 2000.
- [19] PARE, J.; SIMARD, C. Comparison of comercial enzyme-linked inmunoabsorbent assay and agar gel immunodiffusion test for the serodiagnosis of equine infectious anemia. **Canad. J. Vet. Res.** 68(4): 254-258.2004.
- [20] PARDO, A. RUÍZ, M. Análisis de variables categóricas. En: **Análisis de datos con SPSS**. McGraw-Hill/ Interamericana (Ed), Madrid, España. Pp 294-296. 2005.
- [21] PISA, A.; PEREIRA, A.; TERRERAN, M.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDAO, P.; RICHTZENHAIN, L. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* antigen. **Prev. Vet. Med.** 78(3-4): 239-245. 2007.
- [22] PRADA, E. Consideraciones sobre la anemia infecciosa equina en Venezuela. **Rev. Carabobo Pec.** 2: 14. 1989.
- [23] SCICLUNA, M.; ISSE, C.; COOK, F.; MANNA, G.; CERCINE, A.; ROSONE, F.; CAPRIOLI, A.; ANTONETTI, V.; AUTORINO, G. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread equine infectious anemia? **Vet. Microbiol.** 165: 123-134. 2013.
- [24] STEIN, C.; MOTT, L. Equine infectious anemia in brood mares and their offspring. **Vet. Med.** 41: 274-8. 1946.
- [25] TASHJIAN, R. Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. **J. Amer. Vet. Med. Asso.** 184: 282-288. 1984.
- [26] SAMPIER, R.; COLLADO, C.; BAPTISTA, P. Marco metodológico. En: **Metodología de la Investigación**. McGraw-Hill/Interamericana (Ed), Mexico, D.F. Pp 5-12. 1998.
- [27] SHANE, B.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. **J. Clin. Microbiol.**, 19:51-355. 1984.
- [28] SOTULO, A.; VERWIMP, V.; RIVEROS, M.; PAULI, R.; TONARELLI, G. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. **Vet. Microbiol.** 79(2): 11-121. 2001.