

LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION
EN GEL DE AGAR EN EL
DIAGNOSTICO DE LA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA EN URUGUAY

Capano, F. (1)

C. I. Vet. Rubino M.A.P.

Resumen:

Se describe detalladamente la prueba de gel-difusión para el diagnóstico de la Anemia Infecciosa Equina (Prueba de Coggins) utilizada en Uruguay. Se expresan numéricamente los resultados obtenidos hasta la fecha y se discuten las ventajas e inconvenientes de la técnica. Son sugeridas recomendaciones a tener en cuenta en la futura planificación del control de esta afección equina.

I — INTRODUCCION

La Anemia Infecciosa Equina (A.I.E.) es una enfermedad viral que afecta solamente a los Equidos, caracterizada clínicamente en su forma aguda y sub-agudas por fiebre recurrente, astenia, pérdida de peso, edemas en zonas en declive, anemia y muerte, o pasaje al estado crónico de los animales infectados (portadores asintomáticos).

Fue descrita por primera vez en 1843 por Lignéé y fue recién en 1904 que Vallée y Carré identificaron un virus como el agente etiológico de dicha enfermedad.

El reconocimiento de esta afección en el Uruguay data del año 1948 (4). La misma se detectó en una zona de campos bajos y húmedos denominada Rin-

cón de Ramírez (Dpto. de Treinta y Tres).

A partir del 21.9.72 y como consecuencia de trabajos realizados por Mireya Frioni de Pollak y col. (cit. en 3) en equinos provenientes de los Hipódromos de Maroñas y Las Piedras y teniendo en cuenta que la AIE se encuentra en la lista B de las enfermedades denunciabiles adoptada por la OIE, se incluye la misma "en la nómina de las que dan lugar a aplicación de las medidas sanitarias establecidas por la ley N° 3606 del 13 de abril de 1910" (Decreto del Poder Ejecutivo del 21.9.72).

La prueba de inmunodifusión en gel de agar se comenzó a aplicar con fines diagnósticos en el C.I.VET "Dr. Miguel C. Rubino" en 1973(*), pero fue en realidad en el año siguiente que se pone en práctica en forma rutinaria.

(1) Médico Veterinario C.I.Vet. "Miguel C. Rubino", M.A.P., Uruguay. Casilla de Correo 177.

(*) Dr. Eduardo Quintana (comunicación personal).

En el transcurso de los años 1975/76 se ha efectuado un muestreo serológico programado, llevado a cabo con sueros equinos obtenidos en varios hipódromos, clubes hípicos y un establecimiento privado de la industria frigorífica.

Del mismo modo, se han procesado muestras procedentes de las Repúblicas de Argentina y Bolivia.

De acuerdo a la bibliografía estudiada es una prueba de laboratorio que se realiza prácticamente en todo el mundo donde la especie equina es de importancia económica, con la finalidad de encarar positivos planes de lucha (1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 18, 23, 24).

Actualmente esta técnica de laboratorio se practica en sueros de animales de exportación y en tránsito, en equinos que participan en competencias hípico-deportivas, exposiciones, etc.

El presente trabajo tiene por finalidad la descripción de esta técnica en forma pormenorizada, dando a conocer al mismo tiempo los primeros resultados encontrados en Uruguay y comunicando en parte la experiencia de otros investigadores con relación al diagnóstico y control de la A.I.E.

II MATERIALES Y METODOS

La prueba de inmunodifusión o precipitación en gel de agar (también denominada prueba o test de Coggins) utilizada para el diagnóstico de la A.I.E., consiste en una reacción del tipo antígeno-anticuerpo.

La misma es una modificación de la antigua técnica de Ouchterlony (1948) y se basa en la migración concurrente de un antígeno y un anticuerpo presente en el suero sanguíneo, en un gel de agar tamponado. La reacción se visualiza por

una línea de precipitación de color blanco lechoso.

A) EXTRACCION DE LA MUESTRA

Para la obtención de las mismas se procede a la extracción de sangre de la vena yugular según la metodología clásica. Es de suma importancia destacar que la jeringa y aguja utilizadas para esta finalidad deben estar debidamente esterilizadas y su uso debe ser exclusivo para cada equino en estudio.

En nuestro caso en particular, venimos usando con éxito los tubos denominados VACUTAINER(*) con su adaptador de plástico y aguja de doble punta. Con este instrumental no sólo se gana tiempo en la extracción, sino también se asegura el uso individual de cada aguja.

Luego de obtenidas las muestras de sangre, éstas deben ser enviadas al Centro sin refrigerar y del modo más expeditivo posible, si es factible que las mismas lleguen dentro de un plazo de pocas horas; en su defecto, se solicita el envío en cajas de material aislante y suficiente cantidad de refrigerante para su traslado.

Es de capital importancia para el laboratorista que los tubos vengán correctamente identificados (nombre o número correspondiente al animal) y en hoja adjunta se detallen las señas que individualicen perfectamente al equino (edad, sexo, raza, pelaje, categoría), la historia clínica del o los animales afectados conjuntamente con datos referentes al propietario, Médico Veterinario actuante, y establecimiento o Stud de donde proceden.

B — OBTENCION DEL SUERO SANGUINEO

Generalmente esta etapa se cumple en el Centro Diagnóstico. Para ello se re-

(*) B - D VACUTAINER, División of Becton - Dickinson and Company Rutherford, New Jersey.

mueven los coágulos sanguíneos y posteriormente se llevan los tubos remitidos a estufa a 37° C (aceleración del proceso de coagulación). Luego de un período de 30 minutos, se transportan los mismos a un refrigerador (4°C) con el cometido de efectuar una mejor retracción de los coágulos.

Finalmente las muestras son centrifugadas (1.000 RPM - 15 minutos) y los sueros son transferidos a nuevos tubos o frascos Bijou con la misma identificación, siendo mantenidos en congelador a -70°C hasta su ulterior procesamiento.

Se aconseja como regla general, no utilizar sueros hemolizados ni con alto contenido lipídico, debido a la dificultad que provocan en la lectura de las placas. También deben evitarse para el montaje de la prueba, sueros que estén contaminados por la posibilidad de crecimiento bacteriano o micótico en el gel de agar antes de las 72 hs. (lectura final de las placas).

C) PREPARACION DEL MEDIO PARA GEL-DIFUSION

La técnica seguida para la ejecución de la prueba de inmunodifusión es la recomendada por el laboratorio Pitman-Moore, Inc. (USA) con ligeras modificaciones (1, 19, 24).

—Preparación de la solución buffer

La solución consiste en mezclar 2 gramos de Hidróxido de Sodio (NaOH) y 9 gramos de Acido Bórico p.p.A. (H₂BO₃) en un litro de agua destilada estéril. El pH resultante es de 8.6 aproximadamente.

Posteriormente se prepara el medio semisólido a partir de la solución boratada descrita en el párrafo anterior, agregando a la misma Special Agar Noble^(*) en cantidad tal, de obtener dos solucio-

nes diferentes al 1 y 2 % respectivamente. La disolución completa del agar se realiza mediante ebullición en bañomaría durante 15 minutos.

D) PREPARACION DE LOS ESTRATOS Y PLACAS PARA GEL-DIFUSION

Las placas de Petri que se utilizan son habitualmente de vidrio, esterilizadas, y de un diámetro de 90 mm. sin rayas en el fondo que dificulten la posterior lectura (actualmente también se lleva a cabo la prueba en placas de plástico de 85 mm. de diámetro externo).

En primera instancia, es el medio tamponado semisólido al 2 % que se vierte con una pipeta en cantidad de 7 ml. en las mencionadas cajas, tratando de cubrir uniformemente todo el fondo.

Las placas teniendo esta capa de agar, pueden guardarse en refrigerador (4° C) hasta 2 semanas en un recipiente cerrado.

Habiendo cumplido esta etapa, se agrega finalmente encima del estrato anterior, 18 ml. de la solución tamponada en gelosa al 1 % a una temperatura aproximada a 45° C. Es fundamental que antes de verter la solución al 1 % no exista vapor de agua en la superficie del estrato anterior. Para evitar este inconveniente de orden práctico, es menester dejar enfriar y solidificar los estratos manteniendo las cajas destapadas, permitiendo de esta manera la evaporación del agua acumulada.

—Perforación del medio solidificado.

Se perfora el agar con un perforador de bronce hecho expresamente para la realización de las pruebas de gel-difusión (A.I.E., Peste porcina clásica, virus aviáres). El mismo consiste en 7 cilindros huecos, uno central y 6 periféricos de 7 mm de diámetro cada uno siendo de 4 mm la separación equidistante entre éstos y el cilindro central.

(*) Difco Laboratirios, Detroit, Michigan, USA.)

Cabe destacar que a diferencia con otra metodología usada para el diagnóstico de enfermedades bacterianas y víricas, únicamente es seccionada la capa superior (1 por ciento) dejando intacto el estrato inferior que obra de piso. Los cilindros de agar de la capa que ha sido perforada se extraen manualmente con una pipeta Pasteur o con una cánula conectada a una bomba de vacío.

Posteriormente, se evapora el agua que queda en los hoyos o cavidades por medio de aire tibio suministrado por un secador de cabellos. En cada placa preparada de este modo, se realizan 4 juegos de perforaciones, pudiendo ser llenadas 28 cavidades.

E) REACTIVOS Y MONTAJE DE LA PRUEBA

— Antígeno y suero positivo hiperinmune

El virus de la A.I.E. tiene muchas características comunes con los virus tumorales (oncornavirus) (13). Se presenta bajo la forma de partículas virales esféricas de aproximadamente 90 - 140 $m\mu$ a la microscopía electrónica.

Hasta la fecha se han utilizado varios tipos de antígeno, empleando para ello diversos órganos con mayor o menor poder antigénico (páncreas, bazo, etc.) (9, 16) obteniéndose resultados no siempre satisfactorios.

Si bien, en una primera etapa se utilizó el bazo como antígeno en el C.I.V.E.T. actualmente se realiza la prueba con un antígeno liofilizado preparado en citocultivo. La sustancia antigénica del bazo es idéntica a la encontrada en el antígeno preparado en citocultivo (16). El suero hiperinmune generalmente es preparado en equinos de raza Ponny.

Ambos reactivos biológicos usados en nuestro muestreo y exámenes de rutina, se importaron de E.U.A. del laboratorio Pitman-Moore Inc. (*).

Cada juego de reactivos (antígeno y suero positivo) proporcionan 3 ml. de antígeno y 9 ml. de suero anti. El antígeno reconstituido y el suero hiperinmune son mantenidos a -70° C hasta su empleo en la prueba de gel-difusión.

Por otra parte, debe evitarse que los mismos permanezcan excesivos períodos de tiempo a temperatura ambiente debido a la caída de sus respectivos títulos precipitantes.

—Montaje

Luego de perforado el medio anteriormente señalado y previo al llenado de las cavidades, se protocoliza en hojas diseñadas para este fin, la ubicación de los sueros problemas y los reactivos en las diferentes placas en un orden preestablecido.

Por cada placa de Petri se pueden analizar 12 sueros problemas, procediendo a un montaje que tiene lugar de la manera siguiente (20):

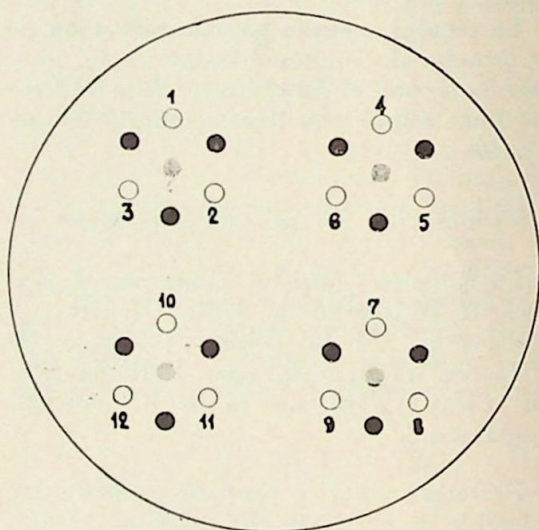


Fig. 1

Punto negro — Antígeno.
Punto blanco — Suero problema
Punto gris — Suero control

(*) Pitman - Moore, Inc. Washington Crossing, N. J. 08560 (U.S.A.)

En primer término se llenan los pozos centrales de los 4 juegos hexagonales con el antígeno (A), descongelado y llevado a temperatura ambiente, mediante pipeta Pasteur. A continuación, se coloca el suero positivo en tres pozos externos en c/u de los conjuntos con otra pipeta Pasteur.

Los sueros problemas van siendo transferidos a los 3 pozos externos restantes, con pipetas *individuales* siguiendo el movimiento de las agujas del reloj, según diagrama adjunto (ver fig. 1).

Cabe destacar que todas las cavidades deben llenarse hasta su borde (0.15 ml aprox.) sin sobrellenar las mismas, lo cual traería aparejado la posible mezcla de varios líquidos biológicos con la consiguiente invalidación de la prueba. Como paso siguiente las placas son incubadas a temperatura ambiente.

En nuestro caso en particular no hemos notado diferencias apreciables, si se incuban las placas en una cámara húmeda cerrada o si se dejan simplemente sobre la mesa de laboratorio.

F) LECTURA E INTERPRETACION DE LA PRUEBA

La lectura de las reacciones de precipitación se efectúan en un cuarto oscuro, colocando la placa de Petri en estudio sobre una caja prismática rectangular con paredes pintadas de negro y que deja escapar por su parte superior un pequeño haz luminoso proporcionado por una fuente de luz incorporada.

Para lograr una visualización más nítida de las líneas obtenidas, el laboratorista se vale de una lupa manual de poco aumento.

La observación de las placas montadas se realiza a las 48 horas pero algunos sueros requieren un mínimo de 72 horas para su visualización nítida.

Las líneas de precipitación del suero positivo control son la base de la lectura.

Si dicho suero no produce una línea neta de precipitación, la prueba debe realizarse nuevamente.

En nuestra casuística hemos obtenido líneas de sueros problemas positivos que se han mantenido visibles hasta 14 días después del montaje.

Las posibles lecturas que se pueden presentar son (ver fig. 2):

—Suero negativo (1). Las líneas del suero patrón positivo se dirigen hacia el suero problema sin curvarse.

—Suero positivo (2). Las líneas del suero patrón positivo se unen con la del suero problema y forman una línea continua quebrada. Esta se presenta generalmente a una distancia equidistante del antígeno y del suero problema.

—Suero débilmente positivo (3). Se forma en esta ocasión, una línea poco marcada muy cerca del hoyo donde se halla el suero problema, no continuándose en forma completa con las líneas de los sueros controles positivos. Estas reacciones son las más difíciles de detectar y son fácilmente desestimadas. Se recomienda en estos casos, repetir la prueba después de las 72 horas. Un suero débil positivo puede ocurrir si ha habido pasaje de suero control positivo entre los dos estratos de agar hasta un pozo con suero negativo problema.

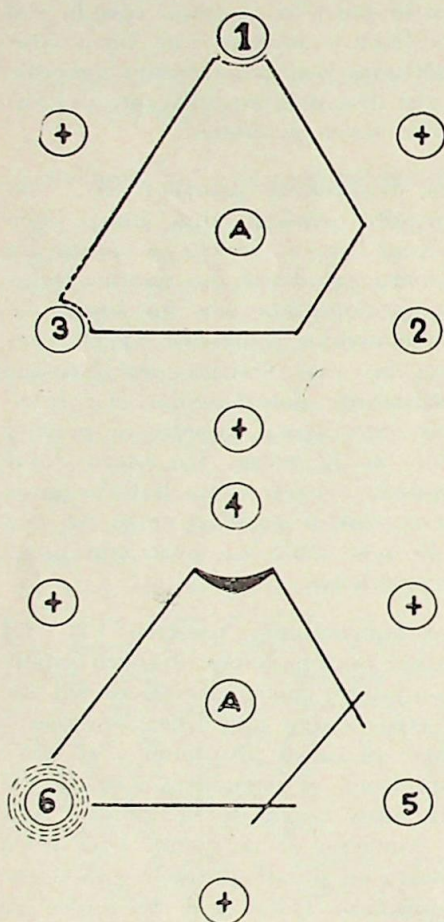
—Suero fuertemente positivo (4). La línea control perteneciente al suero hiperinmune, se vuelve hacia el orificio del antígeno y sigue como una línea borrosa o ancha entre el suero problema y el antígeno. Esta línea se encuentra situada comúnmente muy cerca de la cavidad central que contiene el antígeno. Una línea más definida se puede obtener practicando una dilución 1:4 ó 1:8 del suero en cuestión.

—Líneas no específicas (5). Estas líneas cruzan o no se unen con las líneas controles positivas. Se considera que la for-

mación de dichas líneas se deben a otras reacciones antígeno-anticuerpo de carácter inespecífico.

Ocasionalmente puede presentarse así mismo debido a un alto contenido lipídico de los sueros problema, un halo difuso alrededor del pozo que los contiene lo que trae aparejado una imagen borrosa de las líneas controles de referencia (6).

FIGURA N.º 2



Ref.: A — Antígeno
 + — Suero positivo control
 (1-6) — Sueros problemas.

III — RESULTADOS

En el cuadro I se presentan los primeros datos recabados en el C.I.VET precedentes de un muestreo serológico realizado en Uruguay (1975-76).

Del mismo se desprende que la presencia de A.I.E. en nuestro país se registró en los dos centros de mayor concentración de equinos S.P.C. (Hipódromos de Maroñas y Las Piedras).

En el Cuadro II se tabulan resultados de sueros extranjeros y en el Cuadro III, se expresan numéricamente los datos obtenidos por años y el total de sueros procesados en el C.I.VET hasta el momento (sueros pertenecientes a equinos exportados, en "training", presentados en exposiciones o competencias hípico-deportivas, sueros remitidos del exterior, etc.).

IV — DISCUSION

La técnica de gel-difusión para el diagnóstico de la A.I.E. se considera en varios países del mundo como la única prueba válida con carácter oficial (18, 25 y teniendo una utilidad similar a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) para la enfermedad de Newcastle o de seroaglutinación para Bruceosis (11).

Como toda técnica de laboratorio presenta ventajas y desventajas.

2 VENTAJAS

—Fácil y rápida de ejecutar. La lectura se efectúa con un tiempo máximo de 72 horas.

—Se puede aplicar a gran número de equinos en un lapso relativamente breve. (de gran utilidad en aplicación de planes de control de la enfermedad).

—Su interpretación se hace individualmente a diferencia con la técnica de gel-difusión realizada en aves (26).

CUADRO I — MUESTREO SEROLOGICO PROGRAMADO (C.I.VET)

<i>Lugar y fecha - Depto. - Méd. Veterinario</i>	<i>Nº sueros</i>	<i>Pos(+)</i>	<i>Neg(—)</i>	<i>% Pos.</i>
Hip. Maroñas, Montevideo, R. Peyrallo 17.6/11.7.75	933	5	928	0.53
Gdia. Coraceros, Montevideo, A. Perdomo 8.9/2.10.75	55	0	95	—
Carrasco Pólo, Montevideo, R. Peyrallo 6.11.75	79	0	79	—
Hip. de Salto, Salto, J. Gilardoni 21.11.75	154	0	154	—
Club Híp. Solymar, Canelones, R. Peyrallo 27.11.75	52	0	52	—
Hip. Las Piedras, Canelones, R. Peyrallo 12.12.75	353	4	349	1.13
Frigo. Clay, Canelones, J. C. Arambillete 26.3/29.4.76	249	0	249	—
TOTALES	1.915	9	1.909	9.46

CUADRO II — SUEROS EXTRANJEROS PROCESADOS (1975)

<i>Procedencia</i>	<i>Nº de sueros procesados</i>	<i>Pos(+)</i>	<i>Neg(—)</i>	<i>% Pos.</i>
Dr. Raúl Casas Azul. Prov. Bs. As. (Rep. Argentina) 4.2.75	42	2	46	4.76
Dr. Paul Mc Cosker Bolivia 14.3/21.4.75	15	4	11	26.66

CUADRO III — SUEROS PROCESADOS DESDE 27.3.74 HASTA LA FECHA

<i>Nº de sueros procesados</i>	<i>Pos(+)</i>	<i>Neg(—)</i>	<i>%Pos.</i>	<i>Procedencia sueros positivos</i>
Año 1974	239	3	236	1.25 1 suero nacional 2 sueros extranjeros
Año 1975	2.489	20	2.469	0.80 14 sueros nacionales 6 sueros extranjeros
Año 1976 (parc.)	500	3	497	0.60 3 sueros nacionales
TOTALES	3.228	26	3.302	0.80
TOTALES (sueros nacionales)	3.171	18	3.153	0.56

—Es una prueba específica de diagnóstico ofreciendo por lo menos un 95 % de exactitud (7) (comparación con el test de inoculación en "ponny" virgen. No se han evidenciado reacciones cruzadas con anticuerpos pertenecientes a otras enfermedades equinas (Herpes I y II, Influenza, Encefalomiелitis, Bebesiosis, Peste equina africana, Arteritis equina, Adenitis equina) (7, 17, 24).

—Posee un alto grado de repetibilidad.

—Técnica que permite detectar la afección prácticamente desde sus inicios (8-10 días posteriores al primer pico térmico) (24).

—Los anticuerpos precipitantes permanecen en sangre durante largos períodos de tiempo. Según algunos autores manifiestan que pueden evidenciarse hasta un lapso de 7 años (13, 17). Tiene la ventaja sobre la prueba de Fijación de Complemento con los títulos encontrados no fluctúan notoriamente en el transcurso de los días o meses.

Frente a la técnica de Seroneutralización posee la ventaja de que ésta sólo detecta anticuerpos neutralizantes recién a los 40 días post inoculación (P.I.) y con relación a la Inhibición de la Fijación de Complemento que la misma carece de practicidad.

—Por medio de esta técnica se evidencia un anticuerpo común a cepas inmunológicamente diferentes a la prueba de Seroneutralización (16).

—Los anticuerpos precipitantes contenidos en los sueros equinos no son destruidos a 56° C, por más de 1 hora o por el fenol a concentraciones que van del 0.1 al 1 % (17).

—Los sueros positivos conservados en congelador, siguen dando reacción positiva durante varios meses (26 meses a — 20° C — Bettinetti y col. (1)) En el C.I.VET se mantiene un suero positivo a — 70° C desde el 2.4.75 y continúa

dando una reacción muy neta tanto frente al antígeno preparado en bazo como al obtenido en citocultivo (21, 22, 24).

—Antígeno que presenta una aceptable termorresistencia. Con respecto al antígeno comercial preparado en citocultivo, hemos comprobado en el laboratorio que recién a los 30 minutos a 56° C (baño maría) deja de producir una línea de precipitación frente a un suero positivo de referencia. Este hallazgo concuerda totalmente con lo comunicado por Nakajima (16).

DESVENTAJAS

—El antígeno y suero positivo hiperinmune se deben importar en una primera etapa. Con ello a pesar del alto costo que implica, se gana exactitud y seguridad en el diagnóstico.

—Error de lectura debido al laboratorista. Es una falla que puede ser subsanable con la práctica.

—Posible contaminación del medio. También es subsanable con el agregado al gel de Thiomerosal al 0.01 % (16).

—La prueba de Coggins no diferencia entre anticuerpos activos y pasivos (adquiridos por vía calostrada).

La presentación de este inconveniente en la lectura de sueros provenientes de potrillos debe interpretarse así: en primer término se debe sacar una muestra de sangre antes de que el potrillo mame por primera vez. En este caso si la madre da reacción negativa a la prueba de gel-difusión y el potrillo es reactor positivo, el mismo debe ser considerado infectado (15, 19). Si ambos son positivos, el potrillo debe ser nuevamente muestreado un mes post-destete a la edad de 6-8 meses (2, 15, 19).

—Presencia de débiles positivos. Fundamentalmente son evidenciados durante el período de incubación (primeros 45 días P.I.). Los reaccionantes positivos débiles

deben ser muestreados luego de un período de 2-3 semanas, donde existe la posibilidad de que den lugar a la formación de una línea de precipitación más nítida.

En nuestro caso en particular, no ha dado resultados convincentes la tinción de dichas líneas por medio de colaboraciones en base al negro amido 10 B (8, 16).

—Factibilidad de la aparición de un inconveniente no subsanable. Algunos sueros dan reacciones débilmente positivas durante meses; ello sucede en equinos que no han exhibido signos clínicos agudos de la enfermedad en el transcurso de lapsos muy prolongados de tiempo.

En nuestra casuística (3.228 sueros procesados) únicamente hemos hallado 1 solo suero con estas características.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se concluye que es una prueba de laboratorio que ha revolucionado el diagnóstico y control de la A.I.E. Hoy en día, existe unanimidad de criterio de los diferentes investigadores que han trabajado en esta afección equina, en considerarla como la única prueba de validez indiscutida en la detección de animales infectados tanto clínicamente como en equinos portadores crónicos asintomáticos.

Con relación a los resultados expresados en los cuadros adjuntos, se puede afirmar que los porcentajes de reaccionantes positivos obtenidos (0.46 % para el muestreo serológico programado y 0.56 por ciento para la totalidad de los sueros nacionales procesados) son bajos y se asemejan a los encontrados en otros países donde se realizan efectivos planes de lucha (2, 5, 10, 12, 23).

Mediante la prueba de inmunodifusión se comprobó que la A.I.E. afecta actualmente al S.P.C. en lugares de grandes concentraciones de equinos (Hipódromos). Desde el año 1974 a la fecha, no se han encontrado animales reaccionantes positivos en otras razas equinas presentadas en

exposiciones o con destino a la exportación (Criolla, Belga, Shetland Pony, etc.) ni en mestizos (Guardia de Coraceros, Frigorífico Clay).

Nuestros datos serológicos obtenidos, estarían de acuerdo con lo expresado por Ibañez y col. (14) al manifestar que el S.P.C. presenta una mayor susceptibilidad a la A.I.E. que los caballos criollos.

Finalmente se deja constancia de que los sueros positivos a A.I.E. provenientes del exterior, fueron procesados desconociéndose el estado clínico de los animales en el momento de la extracción de sangre.

V — CONCLUSIONES

Se confirma por primera vez en Uruguay la presencia de la A.I.E. en equinos S.P.C. por medio de la prueba de inmunodifusión en agar y se comunican los resultados obtenidos. Dicha prueba dada su fácil realización y su alto porcentaje de efectividad, permite llevar a cabo una planificación racional en el control de esta afección equina en una raza de importancia económica para el país.

VI — RECOMENDACIONES

En base a los datos procesados, a la bibliografía consultada y a la experiencia adquirida en estos años de convivencia estrecha con la enfermedad, se recomiendan algunas medidas complementarias a las ya tomadas con anterioridad:

1) Que se reconozca formalmente a la prueba de inmunodifusión en gel de agar (prueba de Coggins), como única prueba oficial valedera en todo el territorio nacional.

2) Que las autoridades competentes aprueben y promulguen a la brevedad posible, el Anteproyecto de Decreto relativo a las afecciones equinas, entre las cuales resalta por su importancia del punto de vista de la exportación, la A.I.E.

3) Que se continúe con el muestreo serológico en forma sistemática en haras y centros de cría, hipódromos, clubes hípicas, exposiciones, remates-ferias, frigoríficos, etc. También se exhorta a que se aplique esta prueba de laboratorio a los equinos dadores de sueros hiperinmunes (ej.: suero antitetánico).

4) Que sean tenidas en cuenta las recomendaciones formuladas en el informe elevado a la Dirección General de los Servicios Veterinarios con referencia a la A.I.E. (3).

Summary:-

The gel-diffusion test (Coggins test) for the diagnosis of Equine Infectious Anaemia in Uruguay is described in detail. The numbers of the test carried out and the results obtained to the present time are given in detail and the advantages and disadvantages of the technique are discussed. Recommendations are suggested which should be born in mind in future planning for the control of this equine disease.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la eficaz asistencia técnica proporcionada por los Ayudantes, Aldo Taibo y Alicia Barceló Peirano en la ejecución de las pruebas de inmunodifusión.

Del mismo modo se hace extensivo el agradecimiento a los Médicos Veterinarios que colaboraron con este trabajo mediante el envío de muestras de sangre.

REFERENCIAS

1. Bettinotti, C.M., Ibáñez, Esteban A. y Moretti, Oscar F. El diagnóstico de la Anemia Infecciosa Equina realizado por pruebas de Inmunodifusión en agar. *Gac. Vet.* 34:235-244, 1972.

2. Burns, S.J. Equine Infectious Anemia: Plasma clearance times of passively transferred antibody in foals. *J.A.V.M.A.* 164:64-65, 1974.

3. Capano, F., Perdomo, E. y Peyrallo, R. Informe sobre el estado actual de la A.I.E. en R.O.U. (Informe presentado

a la Dirección General de los Servicios Veterinarios con fecha 28.4.76).

4. Cassamagnaghi, A. y Cassamagnaghi A. (h.) Anemia Infecciosa. S ureconocimiento en los equipos del Uruguay. *Rev. Med. Vet.* (Montevideo). 4:772-807, 1948.

5. Ceccarelli, A. e Zaccaria, M.V. Diffusione dell'Anemia Infettiva del cavallo in Italia. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa.* 26:241, 1973.

6. Coggins, Leroy and Norcross, N.L. Immunodiffusion reaction in Equine Infectious Anemia. *Corenl Vet.* 60:330-335, 1970.

7. Coggins, Leroy, Norcross, Neil L. and Nusbaum, Sidney R. Diagnosis of Equine Infectious Anemia by Immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* 33:11-18, 1972.

8. Crowle, Alfred J. Immunodiffusion. Academic Press Inc., New York and London, 1961.

9. Darbyshire, J.H. The gel diffusion technique in studies of viruses of Veterinary importance. Part I. General applications. *The Vet. Bull.* 34:699-705, 1964.

10. Feiling, O. La polizia veterinaria dell'Anemia Infettiva degli equini alla luce della situazione epidemiologica attuale (trad.). *Selezione Vet.* 16:262-263, 1975.
11. Goret, P. et Toma, B. A propos de L'Anémie Infectieuse des Equides et du test de Coggins. *Bull. Acad. Vét. France.* 44:135-137, 1973.
12. Goret, P. e Toma, B. Profilassi dell'anemia infettiva degli equini (trad.) *Selezione Vet.* 15:595, 1974.
13. Henson, J. B. e Mc Guire, T.C. L'anemia infettiva degli equini (trad.) *Selezione Vet.* 15:593-594, 1974.
14. Ibáñez, E.A., Moretti, Oscar F. y Resoagli, Edmundo H. Epidemiología en la Aemia Infeciosa Equina. *Gac. Vet.* 33: 635-643, 1971.
15. KEMEN, Mathias J. Jr. and Coggins, Leroy. Equine Infectious Anemia: Transmission from infected mares to foals. *J.A.V.M.A.* 161:496-499, 1972.
16. Nakajima, Hideo. Diagnóstico de la Anemia Infeciosa Equina por la prueba de inmunodifusión. División de Investigación de Anemia Infeciosa Equina. Instituto Nacional de Salud Animal, Kodaira, Tokio. 1973.
17. Pearson, J. E., Becvar, C. S. and Mott, L.O. Evaluation of the immunodiffusion test for the diagnosis of Equine Infectious Anemia. *Proceedings of 74th Annual Meeting U.S. Animal Health Association*, 1970.
18. Petrovic, D., Zupancic, Z., Jukic, B. Incidence of Equine Infectious Anemia in Yugoslavia, its determination by agar gel diffusion test from May 1971 to May 1975, and results of its systematic control in the same period. *Veterinarski Archiv.* 45: 103-115, 1975. (*Journal of the Veterinary Faculty - University of Zagreb*).
19. Pitman - Moore, Inc., Washington Crossing, N.J. 08560 (U.S.A.). Folleto ilustrativo para la ejecución de la prueba de inmunodifusión en gel de agar.
20. Regional Poultry Laboratory (Neahi) Fanar, Lebanon. Protocolo de trabajo para pruebas de gel-difusión en virus aviares.
21. Toma, B. et Goret, P. Etude sérologique de l'anémie infectieuse des équidés. I. Production des précipitogènes G et C. *Bull. Acad. Vét. France.* 47:101-116, 1974.
22. Toma, B. et Goret, P. Etude sérologique de l'anémie infectieuse des équidés. II. Etude cinétique des précipitines G et anti C. *Bull. Acad. Vét. France.* 47:117-131, 1974.
23. Toma, B. e Goret, P. Ricerche epidemiologiche sull'anemia infettiva degli equini in Europa (trad.). *Selezione Vet.* 16:263-264, 1975.
24. Toma, B., Luka Iskander, G.E. et Goret, P. Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose. I. Mise au point de la technique. *Bull. Acad. Cét. France.* 44:403-413, 1971.
25. Umphenour, Norman, W. Kemen, Mathias J. and Coggins, Leroy. Equine Infectious Anemia: A retrospective study of an epizootic. *J.A.V.M.A.* 164:66-69, 1974.
26. Witter, Richard L. The diagnosis of Infectious Bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis.* 6:478-492, 1962.