

MARILDA FERREIRA MARTINS

T636.089 69

M386c

2004



**COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES IDGA (p26) E ELISA INDIRETO
(rgp90) NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2004



358009

M386c Martins, Marilda Ferreira, 1957-

Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp90) no diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina / Marilda Ferreira Martins. – 2004.

59 p. :il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Bibliografia: p.

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Anemia Infecciosa Equina -
Teses. 3. ELISA – Teses. 4. Imunodifusão – Teses. I. Reis, Jenner
Karlisson Pimenta dos, 1965- II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 969 2

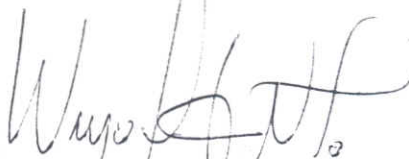
Dissertação defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2004 pela Comissão Examinadora DA UFMG constituída por:



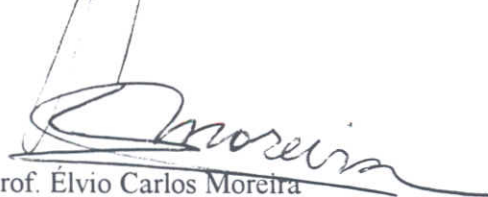
Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Orientador



Profa. Zélia Inês Portela Lobato



Dr. Miguel Hourm Neto



Prof. Elvio Carlos Moreira

Dedico este trabalho a meus pais Joaquim e Lúcia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Professor Joaquim Martins Ferreira Neto e a minha mãe Lúcia Ferreira Martins, que me ensinaram com maestria a caminhar na vida.

A minha irmã, professora Marília Martins Melo, pelos conselhos e amizade.

Ao Diretor Geral do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), Dr. Altino Rodrigues Neto pelo apoio e amizade, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pelo incentivo.

Ao meu orientador, Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, pelo carinho, apoio, ensinamentos e amizade.

A equipe do Laboratório de Saúde Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) Dra. Eneida de Souza Costa e Dr. Ronaldo Furtini, pela ajuda na leitura dos testes; e aos servidores Maria da Glória Junqueira Goulart, Vera Lúcia dos Santos, Cláudia Lúcia Martins, Ademildes Alves Gonçalves, Marcos Aurélio da Silva, Cláudio Câmara Lopes e Raquel Viana pela recepção, ordenação, digitação, lavagem e preparo dos materiais.

Aos médicos veterinários do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), profissionais valorosos que realizaram a coleta do material: Adriana de Cássia Neves, Danilo Teixeira Araújo, João Diogo Filho, André Andrade Ribeiro de Oliveira, Cristiane Almeida Santos, Juliana Laender, Francisco José Corrêa Filho, Paulo Garcia de Carvalho, Ozório de Souza Cunha, Sérvio Túlio de Oliveira Silva, Marco Túlio Pelaquim, Antônio Eustáquio da Fonseca, Fábio Konovallof Lacerda, Antônio Marcos de Freitas Monteiro, Altino de Deus Filho, Manoel da Costa Lima, Joel Ferreira, Gustavo Sturzenecker Moreira, Antônio Caio Alcântara Botelho, Geraldo Magela Gonçalves Lacerda e Aguinaldo José Reis.

A equipe da Divisão de Educação Sanitária do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), especialmente a Gentileza Mendes de Souza pela valiosa ajuda na elaboração da apresentação.

A equipe do Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, em especial ao Leandro Moreira Lessa, pela ajuda na realização dos testes diagnósticos.

Ao professor Ivan Barbosa Machado Sampaio pela colaboração nos dados estatísticos.

Aos funcionários e professores da Escola de Veterinária da UFMG e colegas de turma pelo apoio e amizade.

E a Deus que me deu oportunidades, saúde, família e amigos leais.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. LITERATURA CONSULTADA	10
2.1 Histórico da AIE	10
2.2 Fases da doença	11
2.3 Transmissão	13
2.4 Vírus	13
2.4.1 Estrutura	13
2.4.2 Replicação e viremia	15
2.4.3 Mecanismos de escape, variação genética e antigênica	16
2.5 Resposta imune	17
2.6 Diagnóstico	17
2.6.1 Histórico	17
2.6.2 IDGA	18
2.6.3 PCR e DOT/WESTERN BLOT	18
2.6.4 ELISA	19
2.6.5 Prova biológica	20
2.7 Controle da doença	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Local da realização do projeto	21
3.2 Local da coleta do material	21
3.3 Responsáveis pela coleta	22
3.4 Técnica da coleta	22
3.5 Número de coletas	22
3.6 Sexo, espécie e idade dos animais coletados	22
3.7 Período da coleta	22
3.8 Testes de diagnósticos	22
3.8.1 IDGA	22
3.8.2 ELISA rgp90	23
3.8.3 CELISA	27
3.8.4 DOT BLOT	27
3.9 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	29
4.1 Primeira coleta	29
4.1.1 IDGA	29
4.1.2 ELISA	31
4.1.3 Resultados em ambos os testes	37
4.2 Segunda coleta	39
4.2.1 IDGA e ELISA rgp 90, CELISA e DOT BLOT	39

4.3 Análise estatística	43
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de propriedades, municípios, animais e 35 média animais/propriedade coletados pelas Delegacias Regional do IMA em MG, 20023	21
Tabela 2. Diagnóstico de AIE por IDGA em soros de eqüídeos de acordo com as Delegacias Regionais do IMA em MG, 2002	31
Tabela 3. Correlação entre os resultados de IDGA com a DO/ELISA em soros de eqüídeos de MG, 2002	33
Tabela 4. Diagnóstico da AIE por ELISA em soros de eqüídeos de acordo com as Delegacias Regionais do IMA em MG, 2002	35
Tabela 5. Diagnóstico da AIE por IDGA e ELISA de acordo com o sexo, em soros de eqüídeos de MG, 2002	37
Tabela 6. Diagnóstico da AIE por IDGA e ELISA de acordo com a idade, em soros de eqüídeos de MG, 2002	39
Tabela 7. Diagnóstico da AIE pr IDGA e ELISA de acordo com a espécie, em soros de eqüídeos de MG, 2002	39
Tabela 8 . Correlação entre os resultados de IDGA com a DO/ELISA em soros de eqüídeos de MG, 2002	39
Tabela 9. Resultados de IDGA e ELISA em soros de eqüídeos em 09 e 10/02 e 05/03 em MG, 2003	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cavalo com sinais de AIE	11
Figura 2. Organização genética do vírus da AIE	13
Figura 3. Teste IDGA	23
Figura 4. Teste ELISA(diluição do soro)	25
Figura 5. Teste ELISA(distribuição dos soros)	25
Figura 6. Teste ELISA(lavagem)	25

Figura 7. Teste ELISA (leitor)	25
Figura 8. Representação esquemática das áreas de interpretação	27
Figura 9. DOT BLOT em 10 soros de eqüídeos da 2ª coleta	41
Figura 10. Representação dos dados para o cálculo da sensibilidade e especificidade comparada	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do diagnóstico da AIE por IDGA em 1007 soros de eqüídeos coletados em MG, 2002	29
Gráfico 2. Distribuição do diagnóstico da AIE por ELISA em 1007 soros de eqüídeos coletados em MG, 2002	31
Gráfico 3. Correlação entre os resultados de IDGA com a DO/ELISA em soros de eqüídeos de MG, 2002	35
Gráfico 4. Porcentagem de soros de eqüídeos positivos e negativos para AIE por IDGA e DO/ ELISA em MG, 2002	37

LISTA DE QUADROS

Quadro1. Lentiviroses	15
Quadro2. Classificação dos lentivírus pelo tropismo celular	16

ANEXOS

Anexo A. Manual de coleta	52
Anexo B. Formulário de coleta	53
Anexo C. Manual da 2ª coleta	54
Anexo D. Formulário da 2ª coleta	55
Anexo E. Mapa de Minas Gerais com as Delegacias Regionais do IMA	57
Anexo F. Histórico dos animais negativos ao IDGA na 1ª coleta e positivos ao ELISA submetidos a 2ª coleta	59

RESUMO

O teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilizando o antígeno recombinante rgp90 (Reis, 1997), e o teste clássico IDGA (Imunodifusão em Gel de Agar) p26 foram comparados com o objetivo de validar o ELISA para uso no diagnóstico da AIE. Foram coletadas 1007 amostras de soros de equídeos de diversas regiões de Minas Gerais perfazendo um total de 32 municípios e 156 propriedades. Os resultados do teste ELISA basearam-se em áreas de interpretação sorológica. Os soros que apresentaram densidade ótica (DO) menores que 0,220 foram considerados negativos e os que apresentaram DO iguais ou maiores que 0,220 indeterminados (até 0,263) e positivos ($\geq 0,264$). O IDGA detectou 95 soros positivos (9,4%) enquanto que o ELISA 128 (12,7%). A sensibilidade comparada dos dois testes foi de 97,81% e a especificidade de 96,16%. Dez animais negativos no IDGA e indeterminados/positivos no ELISA foram localizados para uma segunda coleta (três deles com sinais compatíveis de AIE) e testados pelo ELISA, IDGA, CELISA e DOT BLOT. Um animal tornou-se positivo no IDGA (CELISA, DOT p26 e gp90 positivos) e já no primeiro exame era detectado pelo ELISA. O ELISA rgp 90 mostrou ser sensível, específico e rápido podendo ser utilizado como teste de triagem e viabilizar os levantamentos oficiais do estado.

Palavras chave: Anemia Infecciosa Equina, ELISA, IDGA.

ABSTRACT

The ELISA test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), using recombinant rgp90 (Reis, 1997), and the classical test AGID (Agar Gel Immunodiffusion) p26 were compared to validate the ELISA for using in the diagnosis of EIA. One thousand and seven samples from several areas of the Minas Gerais state were collected, including 32 counties and 156 properties. The results of the ELISA test were based on the areas of serological interpretation. Sera with optic density (OD) lower than 0,220 were considered negative, sera with OD higher or equal to 0,220 were considered not conclusive (up to 0,263) and true positive ($\geq 0,264$). AGID detected 95 positive sera (9,4%) while ELISA 128 (12,7%). The compared sensibility and specificity of two tests were 97,81% 96,16%, respectively. Ten negative animals by the IDGA test and not conclusive/positives by ELISA were selected for a second bleeding (three of them with compatible clinical signs of EIA) and tested by ELISA, IDGA, CELISA and DOT BLOT. One animal that was positive only by ELISA in the first test, became also positive in AGID during the reteste (CELISA, DOT p26 and gp90 positive). The ELISA rgp 90 has showed to be sensitive, specific and fast. It could be elected as a good screening test for official epidemiological surveys in the state.

Words key: Equine Infectious Anemia, ELISA, AGID.

1. INTRODUÇÃO

A história dos retrovírus eqüinos é predominantemente a história do vírus da Anemia Infecciosa Eqüina (VAIE), um lentivírus que causa infecção persistente em cavalos atribuída a variações antigênicas em suas proteínas de superfície (Montelaro et al., 1984 a; Montelaro et al., 1993).

A AIE ocorre somente em animais da família *Eqüidea* (eqüinos, muares e asininos) e está distribuída por todo o mundo (Issel e Coggins, 1979). É mais prevalente em áreas geográficas de clima quente e úmido, refletindo a importância da transmissão pelo inseto hematófago (Issel et al., 1988). O rebanho mundial está estimado em 120 milhões, sendo 90 milhões criados em áreas tropicais e subtropicais, incluindo o território brasileiro (Bevilacqua, 1993). O quadro epidemiológico no Brasil, no período de 1989 a 1998, permaneceu sem grandes alterações segundo dados do Ministério da Agricultura com uma prevalência média de 2,20% em 2.163.657 soros testados (Ministério da Agricultura, 2001). Em Minas Gerais a prevalência de animais positivos no período de 1995 a 2002 foi de 0,73% em 152.219 soros testados (Carvalho, 2002) de um efetivo eqüídeo de 1.128.754 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2001).

A AIE não tem tratamento nem vacina, portanto o seu controle é feito através do isolamento e sacrifício ou segregação dos animais soropositivos (Issel e Coggins, 1979). O IDGA é o teste aceito internacionalmente e detecta anticorpos anti-p26 do VAIE (Langemeier et al., 1996). Foi o primeiro teste comercial confiável (Coggins et al., 1972; Issel e Coggins, 1979), e apesar de ser usado em larga escala apresenta algumas limitações. As mais óbvias são o seu baixo potencial para automação e a incapacidade em detectar animais infectados pelo VAIE nos estágios iniciais da infecção. Estes animais quando

não diagnosticados podem servir como importantes disseminadores da doença (Shen et al., 1984; Langemeier et al., 1996). Os níveis de anticorpos específicos contra outra proteína viral do VAIE, a gp90, são cerca de 100 a 1000 vezes maiores que dos anticorpos específicos contra a p26, além de serem os primeiros a serem detectados no sangue. O uso da gp90 em testes de diagnóstico além de aumentar a sensibilidade constitui um importante marcador da fase aguda indicando animais recentemente infectados que são transmissores em potencial do vírus da AIE (Reis, 1997).

O objetivo deste trabalho foi a comparação dos testes de IDGA p26 e ELISA rgp90 no diagnóstico da AIE em soros de eqüídeos.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Histórico da AIE

A AIE foi descrita em 1843 na França e associada com a etiologia viral em 1904 (Montelaro et al., 1993). Foi diagnosticada pela primeira vez na América em 1881 no Canadá, na Venezuela em 1960 e na Argentina em 1964. No Brasil Dupont et al. em 1968 diagnosticaram e descreveram o quadro clínico, hematológico e anatomopatológico em animais da raça Puro Sangue Inglês (PSI) no extinto estado da Guanabara. No mesmo ano a doença foi constatada e descrita em um animal da cavalaria da Polícia Militar na cidade de Niterói, no Rio Grande do Sul e em Minas Gerais em um cavalo da raça PSI de sete anos de idade, alojado na Vila Olímpica de Belo Horizonte, com comprovação através da prova de inoculação (Batista e Fonseca, 1971). A AIE apresentou duas fases em Minas Gerais, a primeira ocorreu no período de 1973 a 1977 nas entidades hípias fechadas onde foi erradicada. A segunda fase ocorreu em fazendas de criação acometendo animais de serviço. As regiões

noroeste e nordeste foram consideradas ecossistemas endêmicos e epiendêmicos respectivamente e as demais regiões paraendêmicas (Bevilacqua, 1993).

2.2. Fases da doença

O curso clínico da AIE é variável, depende da dose e virulência da amostra e da susceptibilidade individual do cavalo (Kemeny et al., 1971). Normalmente podem ser distinguidas três fases: aguda, crônica e assintomática (Issel e Coggins, 1979).

A fase aguda é caracterizada por febre, anorexia e pronunciada viremia resultante da maciça replicação do vírus em macrófagos periféricos ou teciduais, e sua destruição, 5 a 30 dias pós-infecção (Mc Guire et al., 1971; Issel e Coggins, 1979; Montelaro et al., 1993). Cavalos no início desta fase podem ser soronegativos por 14 a 42 dias (Coggins et al., 1972; Issel e Coggins, 1979). Esta fase desaparece em alguns dias embora uma pequena porcentagem dos animais (<5%) desenvolva uma forma grave e freqüentemente fatal da AIE caracterizada por viremia prolongada, grave anemia e persistência de altos títulos de vírus na

maioria dos tecidos. Alguns animais podem desenvolver uma infecção inaparente e cerca de 95% progridem para a fase crônica (Montelaro et al., 1993).

A fase crônica é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia associados com febre, anorexia, edema, leucopenia, anemia, trombocitopenia, hemorragia, diarreia, glomerulonefrite e letargia (Figura 1). Cada episódio clínico dura de 3 a 5 dias e o intervalo entre os ciclos é irregular, variando de semanas a meses. Os episódios recorrentes durante a fase crônica da AIE podem produzir uma síndrome "devastadora", similar as manifestações clínicas observadas com as infecções do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Imunodeficiência dos Símios (SIV). A freqüência e a gravidade dos episódios da doença usualmente declinam com o tempo e terminam no primeiro ano. Neste período a maioria dos cavalos (>90%) tornam-se portadores inaparentes, fato único entre as infecções por lentivírus (Issel e Coggins, 1979; Montelaro et al., 1993), que normalmente evoluem de uma forma inaparente para aguda.



Figura 1. Cavalo com sinais de AIE.

Na fase assintomática estão a maioria dos cavalos positivos para AIE. Estes animais não mostram sinais clínicos e tem baixíssimos níveis de viremia e quando não identificados continuam a trabalhar podendo servir como fonte de infecção (Montelaro et al., 1993). Em alguns portadores assintomáticos a fase de viremia pode ser induzida por "stress" ou administração de corticoides mesmo depois de anos de queiscência (Kono et al., 1976). Nestes cavalos a replicação viral e a doença estão sob controle imunológico ativo, apesar dos mecanismos de escape empregados pelo vírus. (Montelaro et al., 1993).

2.3. Transmissão

O sangue dos cavalos contaminados é a forma mais importante de transmissão do VAIE e pode ser transferido por vetores (insetos hematófagos). A importância do proprietário ou veterinário na indução da infecção através de agulhas contaminadas e instrumentos cirúrgicos deve ser enfatizada. O uso múltiplo de agulhas hipodérmicas tem sido responsável por alguns surtos da doença. O resultado do estudo da sobrevivência do vírus em agulhas indica que o VAIE permanece relativamente estável por pelo menos 24 horas e infectivo por até 96 horas (Williams et al., 1981). Os artrópodes relacionados com o mecanismo de transmissão são da ordem Diptera: *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp, *Tabanus* sp, *Hybomitra* spp. Os tabanídeos (*Tabanus* sp) parecem ser os principais vetores para a transmissão do VAIE (Issel e Coggins, 1979; Issel et al, 1988). A transmissão da AIE pode ocorrer também pela placenta em éguas com altos títulos de vírus que infectam

o feto ao nascer. A resposta fetal para a infecção é variável, podem ser abortados ou nascerem "vírus positivo" ou portadores "soro positivo" (Issel e Coggins 1979; Issel et al, 1988 e 1990). Desde que o VAIE foi demonstrado no sêmen de garanhão com sinais agudos, a transmissão venérea é teoricamente possível, apesar de não ter sido documentado nenhum caso de transmissão natural em éguas expostas a garanhões contaminados (Issel et al., 1990).

2.4. Vírus

2.4.1. Estrutura

Os retrovírus compreendem uma grande e diversa família de vírus RNA envelopados definidos taxonomicamente por sua estrutura, composição e propriedades de replicação. A sua marca é a estratégia de replicação que inclui como etapa essencial a transcrição reversa do RNA viral linear em DNA de fita dupla e a subsequente integração ao genoma celular (Coffin, 1997). Os retrovírus estão associados com muitas doenças de longo período de latência, desordens neurológicas e imunodeficiências, bem como viremia sem sintomas. Apesar da variedade de interações com o hospedeiro, todos os retrovírus são similares na estrutura, genoma, organização e modo de replicação (Fields e Knipe, 1990; Crawford et al., 1996; Proietti, 1997). Contém três genes principais denominados *gag*, *pol* e *env*, que codificam a estrutura viral e proteínas enzimáticas (Figura 2). Já os genes moduladores que regulam o ciclo viral provavelmente contribuem para o mecanismo de latência e patogênese (Ball et al., 1988).

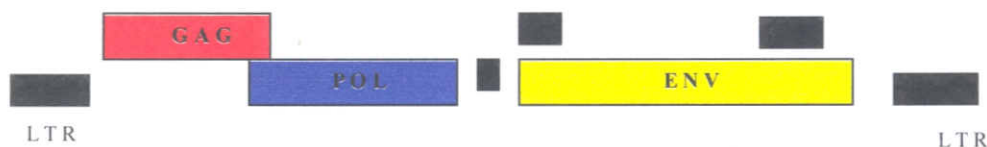


Figura 2. Organização genética do vírus da AIE (Toma et al., 1990).

A família *Retroviridae* é composta pelos gêneros: *Alfaretrovírus*, *Betaretrovírus*, *Gamaretrovírus*, *Deltaretrovírus*, *Epsilonretrovírus*, *Spumavírus* e *Lentivírus* (ICTU, 2001). Os lentivírus têm como representantes nos humanos o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e nos

animais os vírus da: Imunodeficiência dos Simios (SIV), Imunodeficiência Felina (FIV), Imunodeficiência Bovina (BIV), Maedi-Visna, Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e Anemia Infecciosa Equina (VAIE) conforme observado no Quadro 1 (Fields e Knipe, 1990).

Quadro 1 . Lentiviroses

Vírus	Espécie hospedeira
Vírus da Anemia Infecciosa Equina	Cavalo, burro
Vírus da Maedi-Visna	Carneiro
Vírus da Artrite Encefalite Caprina	Cabra
Vírus da Imunodeficiência Felina	Gato
Vírus da Imunodeficiência Bovina	Bovino
Vírus da Imunodeficiência dos Simios	Macaco
Vírus da Imunodeficiência Humana tipo I	Humano
Vírus da Imunodeficiência Humana tipo II	Humano

Adaptado de Fields e Knipe, 1990

Estes vírus possuem envelope fosfolipídico externo, que contém as glicoproteína de superfície (SU) e transmembrana (TM). As principais proteínas internas são as da matriz (MA), a do capsídeo (CA) e da nucleoproteína (NP) que está associada ao RNA genômico. Além desses componentes a partícula viral apresenta proteínas com propriedades enzimáticas, como a transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN) (Montelaro et al., 1993; Clements e Payne, 1994; Soutullo et al., 2001).

As propriedades antigênicas do VAIE dependem de numerosos grupos de antígenos com propriedades diferentes. As proteínas internas p26 e p15 induzem a

formação de anticorpos revelados pelas técnicas de fixação de complemento, imunofluorescência e imunodifusão. Estas proteínas são estáveis e são os antígenos utilizados nos testes diagnósticos. Já as glicoproteínas gp45 e gp90 intervêm na reação de neutralização viral (Toma et al., 1990).

2.4.2. Replicação e viremia

Os lentivírus podem ser divididos em dois grupos baseados no seu tropismo celular por monócitos/macrófagos ou linfócitos (Quadro 2), responsáveis por diferentes manifestações da doença (Clements e Zinc, 1996).

Quadro 2. Classificação dos Lentivírus pelo tropismo celular

Vírus	Hospedeiro	Células primárias infectadas	Alterações clínicas
VAIE	equino	Macrófagos	Alterações hemolíticas
Maedi/Visna V	carneiro	Macrófagos	Encefalopatia
CAEV	caprino	Macrófagos	Imunodeficiência, encefalopatia
FIV	felino	Linfócito T	Imunodeficiência
SIV	primata	Linfócito T	Imunodeficiência
HIV	humano	Linfócito T	Imunodeficiência

O sítio primário da replicação do VAIE em cavalos são os monócitos e macrófagos. A maior concentração do antígeno e DNA viral está no fígado, linfonodo, medula óssea e baço tanto na fase aguda como crônica. A replicação viral é dependente da maturação e diferenciação de monócitos em macrófagos, portanto promonócitos e monócitos da medula óssea e sangue são infectados, mas a replicação viral nestas células é restrita ficando o vírus na forma de DNA proviral (Clements e Zinc, 1996; Sellon et al., 1992). O VAIE *in vitro* pode se replicar em células de derme equina (ED), células de cães (Cf2Th) (Toma et al., 1990) e células fibroblásticas de gatos (FLK).

Os sinais clínicos da AIE, nas fases aguda e crônica, estão associados com altos níveis do vírus no sangue e em vários órgãos (Mc Guire et al., 1971; Issel e Coggins, 1979). Nos casos crônicos de AIE a viremia varia de 10^3 a 10^6 TCID₅₀ por ml. Durante os períodos afebris, da fase crônica ou inaparente, o nível de viremia está marcadamente reduzido para menos de $1 \cdot 10^3$ TCDI₅₀ por ml (Montelaro et al., 1993).

Em jumentos e mulas os níveis de viremia podem ser baixíssimos o que poderia explicar a falha das amostras patogênicas do VAIE em produzir sinais clínicos da doença nestes animais (Cook et al., 2001; Spyrou et al., 2003).

2.4.3. Mecanismos de escape, variação genética e antigênica

Os lentivírus em geral utilizam mecanismos de escape como estratégia para impedir sua eliminação do hospedeiro e para manter a infecção, mesmo na presença de uma competente resposta imune. Para o estabelecimento de uma infecção persistente é fundamental que ocorra uma integração estável do DNA do VAIE ao genoma das células alvo gerando os provírus (Montelaro et al., 1993).

Os lentivírus sofrem mutações genéticas com uma frequência de 10^{-1} a 10^{-2} substituições de bases por sítio por ano (Payne et al., 1987). Em vista desta notável alta taxa de variação genética e de relativos altos níveis de replicação viral observados durante o ciclo da viremia em cavalos as infecções com o VAIE estão associadas com o largo espectro de "quasi-espécies" que podem diferir significativamente na sua especificidade biológica (Alexandersen et al., 1991).

O fenômeno da variação antigênica durante a infecção persistente tem se tornado um princípio geral dos lentivírus. Cada episódio da doença tende a ser menos grave que o anterior. O VAIE, sofre uma rápida mutação aleatória e produz nova variante antigênica. À medida que se produzem as cepas variantes do vírus o equino infectado produz anticorpos neutralizantes desta variante, e

como resultado o período de viremia termina. O surgimento de uma nova variante não neutralizável leva a reincidência clínica. Depois do vírus ter sofrido várias destas mutações e do equino ter respondido a todas elas, o espectro de anticorpos neutralizantes no soro do equino fica muito grande e a viremia cai a níveis muito baixos (Tizard, 2002).

2.5. Resposta imune

Os primeiros anticorpos a aparecer são contra a gp90, e são tipicamente detectados aos 7-10 dias pós-infecção, até atingir o ápice constituindo assim o anticorpo predominante da infecção. O segundo anticorpo é contra a principal proteína do core viral a p26, e é observado aos 10-14 dias pós-infecção, atingindo o ápice rapidamente, mas 100 vezes menor que o observado na gp90 (Montelaro et al., 1993; Mc Guire, 1976). Apesar da variação no mecanismo de escape empregado pelo VAIE, parece que o sistema imune do cavalo é capaz de estabelecer rotineiramente o controle da doença e da replicação viral resultando em um indefinido período de infecção inaparente (Montelaro et al., 1993).

Para identificar os fatores imunológicos do controle da replicação do VAIE, é necessário caracterizar a natureza e a cinética da resposta imune humoral e celular, desde o momento que o cavalo é infectado até a fase inaparente (Murakami et al., 1999). Os linfócitos T citotóxicos (LTC) CD8⁺ aparecem no início da viremia e são associados ao seu controle inicial. Os anticorpos neutralizantes aparecem depois da primeira viremia e estão associados com os episódios clínicos, embora as respostas imunes possam se desenvolver na ausência de aparentes ciclos da doença. O maior problema da proteção com os anticorpos neutralizantes é que eles aparecem tarde, depois da infecção, quando variantes que escapam destes anticorpos já ocorreram. Os episódios de viremia ocorrem porque

variantes do vírus escapam dos LTC e replicam, e posteriormente escapam dos anticorpos neutralizantes. Durante o período de quiescência, os LTC destroem as células que produzem proteína viral e os anticorpos neutralizantes previnem qualquer reconhecimento do vírus liberados de células lisadas pelo LTC. Os baixos níveis de replicação estimulam a memória dos linfócitos e mantém o animal no estágio de portador assintomático (Mc Guire et al., 2002).

2.6. Diagnóstico

2.6.1. Histórico

Até a década de 60 as pesquisas do VAIE eram restritas pela falta de confiáveis sistemas *in vitro* para seu isolamento, propagação e quantificação (Montelaro et al., 1993). O diagnóstico laboratorial era feito através de testes hematológicos que pesquisavam a presença de sideroleucócitos circulantes (macrófagos contendo hemosiderina) e pela inoculação do sangue de animal suspeito em equino sadio, que era monitorado até o aparecimento dos sinais clínicos característicos da AIE (Reis, 1997). Os japoneses abriram a era da pesquisa em AIE quando descobriram que o vírus poderia se propagar *in vitro* em culturas de leucócitos de equinos (Kobayashi e Kono, 1967; Kono e Yokizo, 1968 e Kono et al., 1970 b). Estes pesquisadores usaram deste sistema *in vitro* em um surto no Japão para documentar a cinética da persistência viral do VAIE e descobriram o fenômeno da variação antigênica manifestada na fase crônica da doença (Kono et al., 1970a, 1971, 1973). O desenvolvimento de linhagens de células para a produção do vírus em larga escala por Malmquist et al. (1973) possibilitou estudos que levaram a caracterização molecular do vírus. Com a introdução das técnicas de cultura de células equinas tornou-se possível a preparação de antígenos para uso em técnicas sorológicas e o desenvolvimento de vários testes: Fixação

de Complemento direto e indireto, Soroneutralização, Imunofluorescência, Inibição da Hemaglutinação, Hemaglutinação Indireta e ELISA (Reis, 1984).

Outro grande avanço veio em 1970 quando Coggins e Norcross descreveram um confiável teste sorológico para AIE, a imunodifusão em gel de agar (IDGA). Nakagima e Ushimi (1971) também descreveram um teste de imunodifusão e obtiveram um antígeno purificado a partir de cultura de leucócitos infectada com amostra P337 do VAIE.

2.6.2. IDGA

O teste IDGA baseia-se na migração do antígeno e do anticorpo presente no soro animal, em um meio semi-sólido (ágar-gel), com a formação de uma linha de precipitação visível a olho nu. Conhecido como “teste de Coggins” é a prova qualitativa reconhecida como o método laboratorial mais importante no diagnóstico da AIE por sua especificidade, facilidade de execução e precisão de 95%. Detecta anticorpos precipitantes específicos entre 14 e 45 dias pós-infecção (Coggins et al., 1972; Issel e Coggins, 1979) e apesar de ser usado em larga escala não detecta anticorpos anti-VAIE nos estágios iniciais da infecção, que estão presentes em quantidades muito pequenas (Reis, 1997). Estes animais podem servir como importantes disseminadores da doença já que a viremia está usualmente presente. A possibilidade de reação cruzada com a proteína da matriz (*MA*) de outros lentivírus e a resposta intermitente da p26 são descritas (Langemeier et al., 1996). Uma limitação adicional é demonstrada pela observação que cavalos infectados pelo VAIE confirmado em testes de inoculação, tem resultados falso negativos ou duvidosos no IDGA, com ênfase para muare/asíninos que normalmente possuem baixíssimos níveis de viremia (Toma, 1980; Issel e Adams., 1982; Langemeier et al., 1996). A

partir desta constatação começaram as pesquisas para a idealização de um teste que fosse capaz de identificar os animais infectados não detectados pelo IDGA (Dias et al., 2000). O IDGA assim como um grande número de testes sorológicos baseia-se na detecção de anticorpo contra a principal proteína do core viral a p26. Esta proteína tem sido preferencialmente utilizada por ser altamente conservada, o alvo da resposta imune e por praticamente todos os animais infectados produzirem anticorpos específicos anti-p26. Além disso, é a proteína mais abundante da partícula viral constituindo cerca de 30% da massa protéica total (Reis, 1997).

2.6.3. PCR, DOT / WESTERN BLOT

Testes mais sensíveis para a detecção de anticorpos são relatados como o ELISA, Western blot e PCR (Montelaro et al., 1993; Reis et al., 1994; Langemeier et al., 1996; Ferraz, 1998). Em infecção experimental Ferraz (1998) mostrou que os resultados pelo teste PCR foram superiores ao IDGA e ELISA detectando animais positivos três dias após a infecção. A amplificação genética poderia esclarecer os diagnósticos duvidosos, elucidando o “status” de cavalos com reações “indeterminadas” em testes sorológicos e identificar infecções pelo VAIE antes da soroconversão ou neonatal (Issel et al., 1990; Langeimeier et al., 1996; Ferraz, 1998).

Uma porcentagem de animais que reagem aos testes imunoblots (DOT/Western) pode não estar sendo reconhecidos pelos testes tradicionais ou estar tendo uma reação cruzada com outros retrovírus ou uma reação inespecífica não identificada. Para serem considerados positivos no imunoblot os soros devem apresentar uma banda para a p26 e pelo menos uma banda para glicoproteína (gp90 e gp45), similar ao critério recomendado para a leitura positiva em pacientes com AIDS (Bürki et al., 1992), ou segundo Langemeier et al. (1996), reação

a somente uma banda importante do VAIE (p26, gp45 ou gp90). Anticorpos de pôneis infectados experimentalmente e amostras de campo positivas para IDGA reagem vigorosamente para a gp90 no immunoblot, sugerindo a possibilidade da utilização desta glicoproteína para testes diagnósticos. Anticorpos da classe IgG para gp90 e gp45 permanecem detectáveis em cavalos persistentemente infectados durante toda a infecção (Issel et al., 1990).

2.6.4. ELISA

O ELISA permite detectar a maioria dos cavalos infectados com resultados negativos pelo teste IDGA (Shane et al., 1984; Lew et al., 1993). Este teste mostrou ser um método sensível para detectar anticorpos anti-VAIE, podendo ser realizado em larga escala com resultados obtidos dentro de 4 a 5 horas (Sugiura et al., 1986). Nenhum reagente perigoso é usado e um grande número de amostras pode ser testado em curto espaço de tempo (Suzuki et al., 1982).

Embora o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) reconheça o IDGA como teste oficial para o diagnóstico da AIE ele possui uma limitada sensibilidade, lentidão em obter os resultados e pequeno potencial para automação. Por outro lado o ELISA é sensível, rápido e de fácil processamento. Utiliza pequenas quantidades de antígeno podendo ser usado para avaliar um grande número de amostras. O teste poderia servir como uma alternativa ao IDGA para o diagnóstico da AIE já que poderia detectar a maioria dos cavalos infectados não reagentes ao IDGA (Shen et al., 1984). Um ELISA competitivo (CELISA) foi desenvolvido contra a p26 e tem sido aprovado para uso oficial nos Estados Unidos pela sua alta correlação com o IDGA (Montelaro et al., 1993; Langemeier et al., 1996). Habitualmente todo ELISA positivo requer confirmação pelo IDGA antes que medidas sanitárias sejam implantadas, da mesma forma para a

comprovação da existência do vírus da imunodeficiência adquirida em humanos (HIV) onde testes confirmatórios são utilizados (Langemeier et al., 1996).

Peptídeos sintéticos gp90 e gp45 foram usados para a validação de um teste ELISA para AIE. As amostras fracas positivas no IDGA foram positivas verdadeiras no ELISA, o que comprova o aumento de sensibilidade pelo teste ELISA em comparação com o IDGA. O índice de detecção atingiu 98%. Este estudo, segundo Soutullo et al. (2001), representa a primeira abordagem em delinear um kit diagnóstico que poderia permitir uma rápida análise de grande número de soros a ser aplicada em áreas endêmicas com diferentes prevalências de infecção. O uso da glicoproteína do envelope viral como a gp90 em testes ELISA além de aumentar a sensibilidade poderá constituir um importante marcador da fase aguda indicando animais recentemente infectados que são transmissores em potencial e podem ser dados como negativos pelos testes convencionais (Reis, 1997). A porção da gp90 do vírus da AIE é predominantemente imunogênica durante a infecção persistente em cavalos (Montelaro et al., 1984b). A proteína p26 é altamente conservada, em contraste produtos do gene *env* (gp90 e gp45) tem sido descritos como altamente variáveis (Payne et al., 1987; Issel et al., 1988). Entretanto o mapeamento da gp90 e gp45 revelou a presença de vários epitopos conservados e imunodominantes entre diferentes variantes antigênicas do VAIE (Ball et al., 1988), podendo ser um ótimo antígeno para uso em testes diagnósticos (Soutullo et al., 2001).

Cavalos podem apresentar anticorpos somente contra gp90, por uma falha individual ao responder para o antígeno *gag* ou pela potente propriedade da gp90 ao induzir mais anticorpos que a p26 (Langemeier et al., 1996). Anticorpos anti-gp90 são usualmente detectados antes dos

anticorpos anti-p26 e em situações em que são extremamente baixos os níveis de replicação viral. Quando purificados da superfície do VAIE são usados como antígeno no ELISA ou "Western blot" fica claro que a superfície do vírus é altamente imunogênica e importante alvo do reconhecimento imune (Montelaro et al., 1984b; Issel et al., 1988). O uso de uma glicoproteína no teste ELISA poderia aumentar a sensibilidade e a certeza do resultado no teste imunodiagnóstico (Issel et al., 1990; Montelaro et al., 1993).

Vários autores têm enfatizado a maior sensibilidade do ELISA comparado ao teste de IDGA (Suzuki et al., 1982; Shane et al., 1984; Shen et al., 1984; Sugiura et al., 1986). Reis et al. (1994b) relatam um caso de erradicação da AIE em um rebanho de 86 eqüídeos, onde 470 soros foram testados simultaneamente ao ELISA e IDGA, demonstrando que os anticorpos específicos anti VAIE foram detectados pelo ELISA um mês mais cedo do que pelo IDGA. O sucesso da erradicação foi atribuído ao uso de testes de maior sensibilidade como o ELISA. Dias et al. (2000) compararam 1.205 amostras de eqüinos pelas técnicas ELISA e IDGA e encontraram uma sensibilidade e especificidade comparada de 95,38% e 80,3%, enquanto Matsushita et al. (1989) ao comparar 420 amostras de soros de eqüinos aos testes ELISA competitivo (CELISA) e IDGA encontraram 100% de correlação.

2.6.5 Prova biológica

O teste mais sensível para o diagnóstico da AIE é provavelmente a inoculação em eqüinos sadios de sangue total do animal suspeito e o monitoramento da soroconversão, indicando a infecção pelo VAIE (Issel e Coggins, 1979; Coggins, 1984). Trata-se, porém de um teste caro e impossível de ser usado na rotina (Reis R., 1984; Montelaro et al., 1993; Reis, 1997).

2.7. Controle da doença

Com a falta de vacinas eficazes o controle da doença em cavalos se faz com a identificação e segregação ou sacrifício dos cavalos infectados. Somente países como China e Cuba tem processado em larga escala um programa de vacinação baseado em amostras atenuadas do VAIE, que parecem proteger apenas contra amostras homólogas do vírus (Montelaro et al., 1993), e contra o aparecimento de sinais clínicos da doença. O Brasil criou em 1979 a Comissão Nacional de Anemia Infecciosa Eqüina (CNAIE), visando o combate da AIE. A CNAIE estabeleceu que o Programa Nacional de Combate a AIE deveria considerar a ocorrência diferenciada da doença nas diversas regiões, os variados sistemas de produção e utilização dos eqüídeos bem como definir e estabelecer as áreas indenes, paraendêmicas, epiendêmicas e endêmicas (Bevilacqua, 1993). Em 2001 a comissão da AIE no estado (CECAIE-MG) reorganizou-se com o objetivo de elaborar uma legislação específica para o estado. Regulamentou a resolução n.º 1 de 18 de dezembro de 2001 com procedimentos relacionados a conduta veterinária e normas técnicas de controle da AIE, baseada no diagnóstico e defesa. Além das medidas de controle a CECAIE-MG tem procurado sensibilizar as autoridades federais e estaduais para a realização de um inquérito soropidemiológico da AIE em todo o país para a verificação da real prevalência, para que se possa definir com segurança as normas de trânsito eqüídeo para todo o país (Carvalho, 2002). O estado do Mato Grosso tem proposto um trabalho de segregação dos animais soropositivos e não de sacrifício. No pantanal, apesar de não existir um estudo da prevalência acredita-se que a doença se encontre disseminada (Reis et al., 1994; Silva et al., 2001). Em regiões como o pantanal, com alta prevalência, o sacrifício dos animais positivos comprometeria significativamente ou mesmo inviabilizaria a pecuária extensiva, principal atividade econômica da região. Uma estratégia alternativa de controle da doença, baseada

na segregação dos animais positivos, tem sido preconizada em países como os Estados Unidos e proposta como uma estratégia prática de prevenção e controle para a região do Pantanal (Silva et al., 2001).

Na erradicação de um foco da AIE é importante a utilização de testes sensíveis, como o ELISA, para que os animais positivos possam ser detectados mais precocemente e isolados. Em um rebanho pesquisado por Reis et al. (1994a,b), a erradicação de um surto foi possível graças a um rigoroso controle dos animais, o uso individual de agulhas e seringas, e o uso do teste ELISA tanto no rebanho como nas propriedades vizinhas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da realização dos exames:

Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

Laboratório de Saúde Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

3.2. Local da coleta do material:

Os locais da coleta de sangue foram escolhidos usando como critério os resultados de exames realizados em Minas Gerais no período de 1995 a 2002. Também foram utilizados os dados levantados por Bevilacqua em 1993 que ao analisar 66.624 resultados de AIE caracterizou as regiões noroeste como endêmica e a nordeste como epiendêmicas. Esta escolha visou somente a diversificação dos resultados para a comparação dos testes. Este levantamento não teve aleatoriedade na coleta já que o objetivo foi somente a comparação dos testes IDGA e ELISA. A adesão foi voluntária, sem qualquer caráter oficial e os resultados foram mantidos em sigilo.

A Tabela 1 descreve o número de propriedades e municípios, animais e a média do número de animais coletados por propriedade neste trabalho.

Tabela 1. Número de propriedades, municípios, animais e média animais/propriedade coletados pelas Delegacias Regionais do IMA em MG, 2002.

Regional	N.º propriedades	N.º municípios	N.º animais	Média animais/ propriedade
ALMENARA	15	4	150	10
BAMBUI	30	1	50	1,7
CURVELO	07	4	102	14,6
GOV. VALADARES	05	1	50	10
MONTES CLAROS	11	3	146	13,3
OLIVEIRA	05	1	50	10
S.G. SAPUCAI	05	3	50	10
T. OTONI	15	7	150	10
UBERLÂNDIA	04	1	50	12,5
UNAI	52	6	150	2,9
VIÇOSA	07	1	59	8,4
TOTAL	156	32	1007	9,4

*O IMA é uma autarquia estadual ligada a Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento com 17 Delegacias Regionais e 198 Escritórios Seccionais em Minas Gerais.

3.3. Responsáveis pela coleta:

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) disponibilizou 21 veterinários nas diversas regiões do estado para a coleta de sangue. Cada veterinário recebeu o manual de coleta (Anexo B) e o formulário onde deveriam ser preenchidos os dados do animal, propriedade e proprietário (Anexo A).

3.4. Técnica da coleta

A coleta foi feita com agulha e tubo vacutainer individual (identificado com o número ou nome do animal) na jugular do equídeo após antissepsia com álcool a 70°C. O sangue após permanecer em repouso a temperatura ambiente, por uma hora, foi acondicionado em caixas de isopor com gelo, para o transporte até o Escritório Seccional do IMA onde foi centrifugado. Cada Delegacia Regional usou uma centrífuga, marca FANEM, adquirida no ano de 2000 para a sorologia do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Febre Aftosa. Após a centrifugação o soro foi transferido para um frasco de 10 ml tipo penicilina (identificado como no tubo vacutainer) e congelado na posição vertical até ser enviado para o Laboratório de Saúde Animal do IMA, em gelo, juntamente com os formulários de identificação (Anexo A).

O kit para a coleta continha: tubos vacutainer, agulhas, adaptador, frascos de penicilina com tampa de borracha estéril, esparadrapo e manual e formulários de coleta (Anexos A, B, C, D).

3.5. Número de coletas

Foram realizadas duas coletas para obtenção de soro, a primeira de 1007 animais para a realização dos testes ELISA rpg90 e IDGA p26, e a segunda de 10 animais para a realização dos testes ELISA/IDGA (reteste), CELISA e DOT blot. O critério utilizado para a realização da 2ª coleta foi baseado na discordância de resultados entre os dois testes. Dez animais foram escolhidos: sete animais IDGA negativos e ELISA positivos

e três animais IDGA negativos e ELISA indeterminados, pertencentes as Delegacias Regionais de Teófilo Otoni, Unaí, Curvelo, Montes Claros e Almenara. Os veterinários responsáveis pela coleta foram novamente acionados para a coleta de sangue.

3.6. Sexo, espécie e idade dos animais coletados

Entre os equídeos coletados houve uma variação entre os sexos, espécie e idade. O número de machos coletados foi 688 e de fêmeas 319 ou 68,3% e 31,7%, respectivamente.

O número de equinos coletados foi 907 e de muare/asininos 100, ou 90,1% e 9,9%, respectivamente.

Os animais foram divididos em três faixas etárias de acordo com a idade: < 1 ano, entre 1 e 4 anos e > 4 anos. Setecentos e quarenta e quatro (73,9%) tinham mais de 4 anos, sete menos de um (0,7%) e 256 (25,4%) entre 1 e 4 anos de idade.

3.7. Período da coleta

1ª coleta: setembro a outubro de 2002.

2ª coleta: maio de 2003.

3.8. Testes de diagnóstico

3.8.1 IDGA.

Segundo Coggins e Norcross (1970), a solução de ágar Noble a 1% foi preparada em microondas e distribuída (4,5 ml) em lâmina de microscopia, depois de atingir a temperatura de 45°C. Após sua solidificação o ágar foi perfurado com furador próprio que contém um orifício central e seis periféricos. Os soros a testar foram colocados (25 µl) intercalados com os controles positivos nos orifícios periféricos, e o antígeno (25 µl) colocado no orifício central. As lâminas foram deixadas em câmara úmida por 48 horas e lidas com o auxílio de uma lupa para

a verificação da presença de uma linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste. Foi utilizada uma fonte de luz indireta ajustável, com foco reduzido, para variar a intensidade e posição sob um fundo escuro (Figura 3). Os testes que apresentaram discordância com o ELISA foram repetidos e confirmados. O Kit utilizado foi o do Laboratório Bruch, partida 003/02.



Figura 3. Teste IDGA

3.8.2.ELISA rgp90

Segundo Reis (1997), a proteína recombinante rgp90 foi diluída em tampão carbonato 50 mM (pH 9,6) na concentração de 0,5 µg/cavidade e incubada (100 µl por poço) em placas ELISA (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas por duas vezes com

PBS-Tween 0,05% (pH 7,6) e incubadas por no mínimo uma hora com solução de bloqueio PBS-Tween 0,05% (200 µl por poço) acrescida de leite em pó desnatado a 5%. Nova lavagem foi realizada (3 vezes) e o soro incubado na diluição de 1:50 (4 µl de soro em 196 µl de PBS Tween 0,05% + 1% leite) por uma hora a temperatura ambiente. Para a diluição do soro foram utilizadas placas próprias para diluição com 96 cavidades e transferidas com pipeta multicanal para a placa ELISA adsorvida previamente com a proteína recombinante rgp90. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-Tween 0,05% por 3 vezes e incubadas com solução de conjugado na diluição de 1:7.500 (coelho anti IgG equina-peroxidase SIGMA) em PBS- Tween 0,05% + 1% leite em pó (100 µl por poço) por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-Tween 0,05% por 3 vezes, 100µl do substrato foi adicionado: solução de ortofenilenodiamino (OPD) (0,5 mg/ml), 20 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 10 ml de tampão fosfato citrato (pH 5,0) por 10 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 40 µl de solução de ácido sulfúrico a 0,5 N e a densidade ótica lida em leitor de ELISA da marca SIGMA a um comprimento de onda de 492 nm (Figuras 4, 5, 6 e 7).



Figura 4. Teste ELISA (diluição do soro)

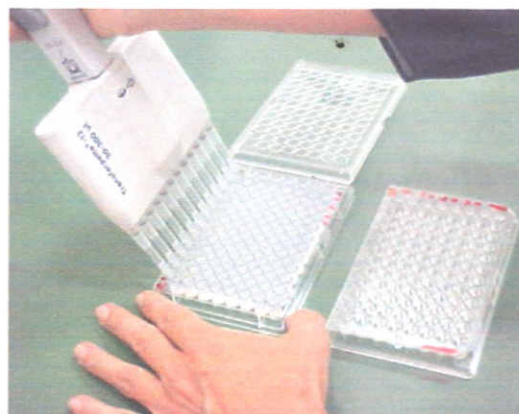


Figura 5. Teste ELISA (distribuição dos soros)



Figura 6. Teste ELISA (lavagem)



Figura 7. Teste ELISA (leitor)

Na primeira coluna da placa ELISA (1) foram colocados o branco (A1), os controles negativos (B1, C1, D1), os controles positivos (E1, F1) e os controles fracos positivos (G1, H1). Os controles foram obtidos de um "pool" de vários soros previamente testados e repetidos em todas as placas. O "pool" dos soros negativos foi proveniente de propriedade e área negativa para AIE.

Um dos mais importantes fatores no desenvolvimento do teste ELISA é o ponto de corte ("cut off") ou a absorbância mínima para se considerar a reação como positiva. Os resultados foram analisados através da avaliação qualitativa de positividade, que

consiste em determinar um valor de DO correspondente a um limiar. Todos os soros acima deste valor foram considerados positivos e abaixo negativos. A este limite definiu-se uma classe intermediária e para melhor situá-la foi introduzido dentro da reação um "pool" de soros negativos, forte positivos e fracos positivos para comparar com os soros testes. Este procedimento permitiu classificar os soros em positivos e negativos, mas não quantificar os anticorpos. O ponto de corte foi achado pelo critério proposto por Sanchez-Viscaino e Albarez (1987) e através do gráfico de correlação entre os resultados de IDGA com a DO do ELISA (Gráfico 3).

Cálculo do ponto de corte: média DO controle negativo +2x desvio padrão dos negativos.

$$\begin{aligned} X \text{ DO } (-) &= 0,1238 \\ S &= 0,0498 \\ 0,1238 + 2(0,0498) &= \mathbf{0,2234} \end{aligned}$$

Foram consideradas três áreas para a interpretação sorológica (Figura 8), área "1" somente com os negativos (< 0,220 DO), área "2" com negativos e positivos (entre 0,220 e 0,263 DO) e área "3" ($\geq$ 0,264 DO) somente com os positivos. A

área dois, imprecisa por natureza, foi considerada indeterminada com alguns soros no limite da área 1 e 3 (Calamel e Lambert., 1988).

Para corrigir as pequenas variações de dia a dia nas condições do ELISA as leituras da DO foram corrigidas pela referência positiva da placa e pela média positiva obtida no final do trabalho (Voller et al., 1979).

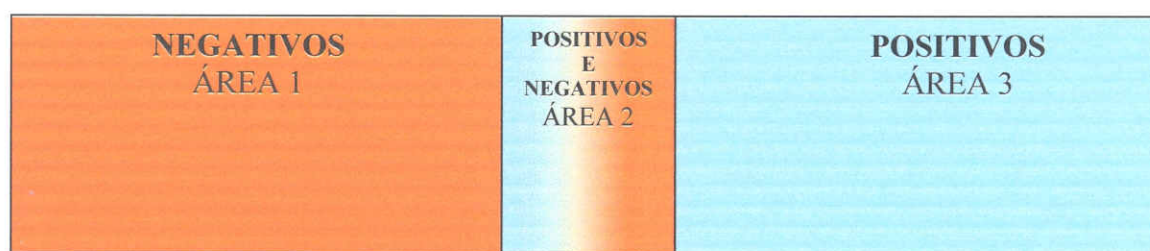


Figura 8. Representação esquemática das áreas de interpretação.

3.8.3. CELISA

Foi utilizado um KIT comercial (CELISA) do laboratório IDEXX, nos 10 soros da 2ª coleta. O KIT continha: placa ELISA adsorvida com anticorpo antiVAIE (tiras destacáveis), frascos com: controle positivo e negativo, conjugado e substrato. O protocolo de execução foi realizado segundo as instruções do fabricante. Foram colocados 100 µl do soro a testar e 100 µl dos controles em cada well; 50 µl do conjugado (antígeno ligado a peroxidase) foi acrescentado e a placa incubada por 30 minutos a 37°C. Os reagentes foram desprezados e a placa foi lavada 6 vezes com água destilada. Foram colocadas 2 gotas de substrato em cada well e após agitação por 10 vezes a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo a leitura foi feita visualmente comparando a cor com os testes positivos e negativos.

3.8.4. DOT BLOT

Segundo Harlow e Lane (1988) a membrana de nitrocelulose foi embebida em tampão TBS por 10 minutos. A seguir foi colocada no sistema DOT BIORAD, e as proteínas aplicadas intercaladas por fileiras (rgp90 e p26) 60 µl por well (3 µg), por 2,5 horas a temperatura ambiente. O vácuo foi ligado para passar o resto da solução e a membrana foi bloqueada com TBS + albumina aviária a 1% por 2 horas e feita a lavagem (3 vezes com TBS tween); 100 µl de soro foi colocado na diluição de 1:100 por 1 hora; lavagem (3 vezes com TBS tween); 100 µl de conjugado coelho anti cavalo da SIGMA 1:3000 por 1 hora; nova lavagem por 3 vezes. Por fim foi colocado o substrato: 50 mlTBS, 70 µl H₂O₂, 30 mg 4CN e 10 ml de metanol por 5 minutos com o aparecimento da cor. Todas as reações foram realizadas no sistema DOT BIORAD com exceção da revelação que foi realizada em uma cuba.

3.9. Análise estatística

Os 1007 soros deste estudo provieram de diversos municípios de Minas Gerais, envolvendo 156 propriedades.

Para estudar a associação dos diagnósticos obtidos pelo teste ELISA com aqueles obtidos pelo teste IDGA, cada soro foi avaliado pelos dois métodos e os resultados confrontados em uma tabela de contingência (2 x 2), posteriormente avaliada pelo teste χ^2 .

Tabelas apenas descritivas foram definidas para se observar a dispersão da AIE segundo algumas variáveis (sexo, idade e espécie).

4. RESULTADOS

4.1. Primeira coleta

4.1.1. IDGA

Das 1007 amostras coletadas 912 foram negativas e 95 positivas ao IDGA (Gráfico 1). Destas, 31 foram fracas positivas (+), 5 medianamente positivas (++) e 59 forte positivas (+++).

A Tabela 2 registra o diagnóstico de AIE por IDGA nas Delegacias Regionais do IMA

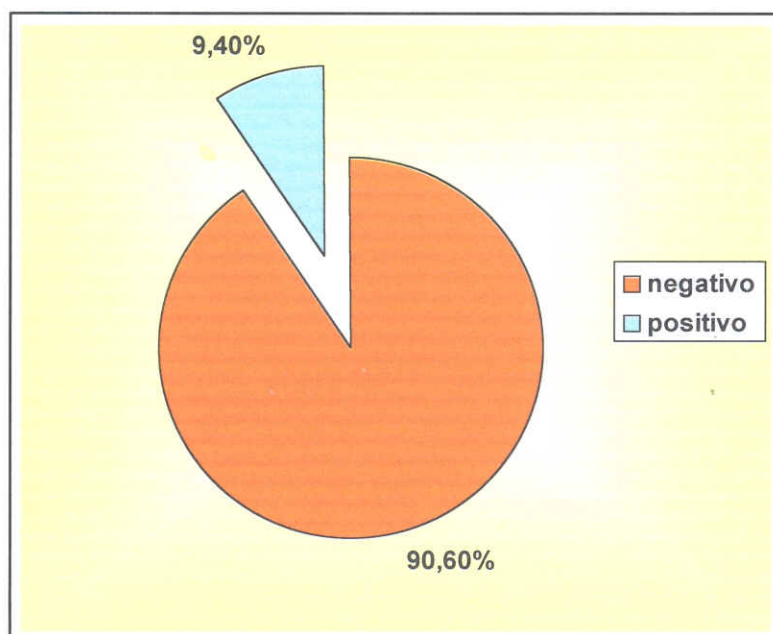


Gráfico 1. Distribuição do diagnóstico da AIE por IDGA em 1007 soros equídeos coletados em MG, 2002.

Tabela 2. Diagnóstico da AIE por IDGA em soros de eqüídeos de acordo com as Delegacias Regionais do IMA em MG, 2002.

REGIONAL	TOTAL	POSITIVOS		NEGATIVOS	
		N.º	%	N.º	%
Almenara	150	17	11,3	133	88,7
Montes Claros	146	46	31,5	100	68,5
Curvelo	102	7	6,9	95	93,1
Teófilo Otoni	150	1	0,7	149	99,3
Governador Valadares	50	0	0,0	50	100,0
Unai	150	20	13,3	130	86,7
Bambui	50	4	8,0	46	92,0
Oliveira	50	0	0,0	50	100,0
Viçosa	59	0	0,0	59	100,0
Uberlândia	50	0	0,0	50	100
São G. do Sapucaí	50	0	0,0	50	100,0
TOTAL	1.007	95	9,4	912	90,6

4.1.2.ELISA

Das 1007 amostras coletadas 87,3% foram negativas (879) e 12,7% foram

indeterminadas (35) ou positivas (93), num total de 128 (Gráfico 2).

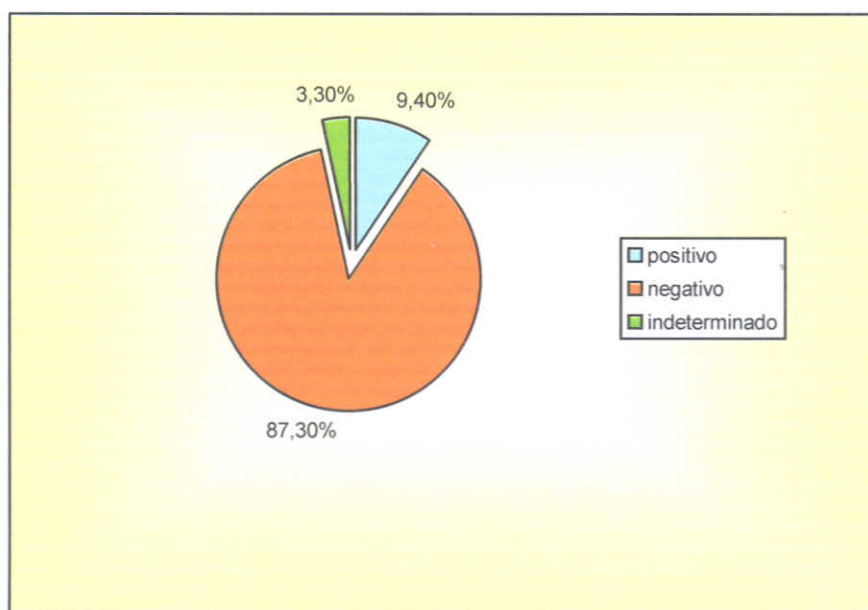


Gráfico 2. Distribuição do diagnóstico da AIE por ELISA em 1007 soros eqüídeos em MG, 2002.

Para a tipificação dos resultados observa-se que dos 912 negativos ao IDGA todos estão abaixo de 0,220 DO com exceção de 35. Dos 95 resultados positivos ao IDGA todos estão acima de 0,220 DO com exceção de

dois (Tabela 3). Este ponto de corte (0,220 DO), definindo os resultados positivos e negativos, revelou ser apropriado para as interpretações.

Tabela 3. Correlação entre os resultados de IDGA com a DO/ELISA em soros de eqüídeos de MG, 2002.

DO	IDGA -	IDGA+
0 - 0,044	24	0
0,044 - 0,088	179	0
0,088 - 0,132	354	0
0,132 - 0,176	250	1
0,176 - 0,220	70	1
0,220 - 0,264	21	12
0,264 - 0,308	8	15
0,308 - 0,352	1	7
0,352 - 0,396	3	9
0,396 - 0,440	1	4
0,440 - 0,484	1	6
0,484 - 0,528	0	3
0,528 - 0,572	0	5
0,572 - 0,616	0	3
0,616 - 0,660	0	8
0,660 - 0,704	0	3
0,704 - 0,748	0	2
0,748 - 0,792	0	4
0,792 - 0,836	0	3
0,836 - 0,880	0	4
0,880 - 0,925	0	3
0,925 - 0,968	0	0
0,968 - 1,012	0	1
1,012 - 1,056	0	0
1,056 - 1,100	0	1
Total	912	95

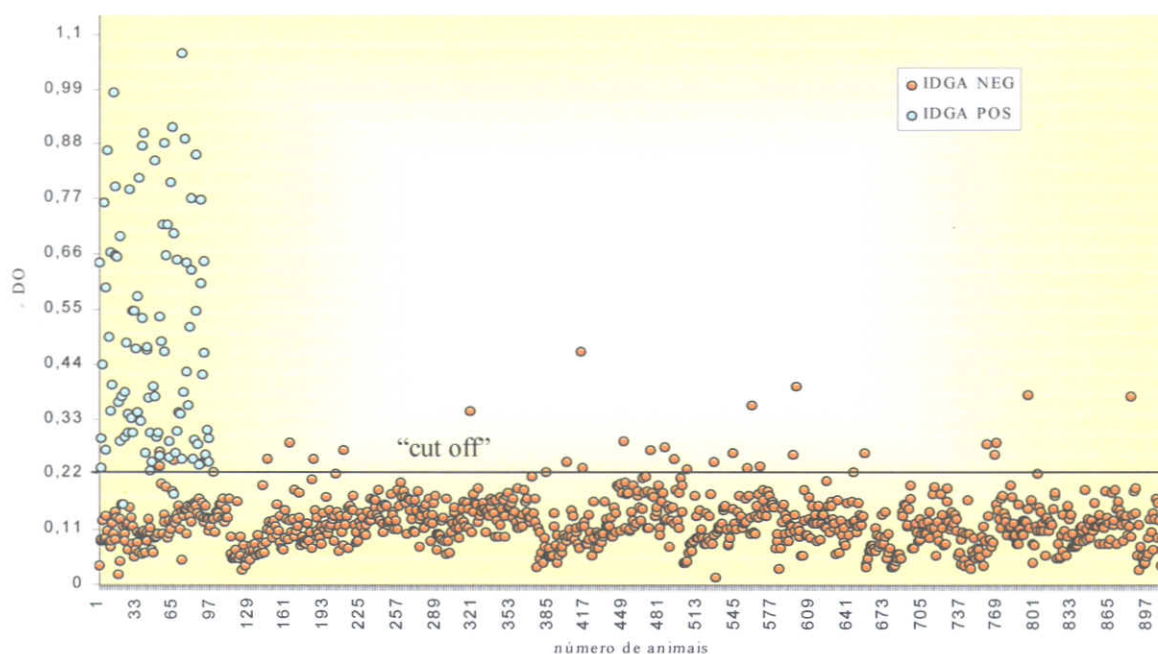


Gráfico 3. Correlação entre os resultados de IDGA com a DO/ELISA em soros de eqüídeos de MG, 2002.

No Gráfico 3 a correlação dos resultados IDGA em função da DO do ELISA pode ser melhor visualizada. Em função desta correlação e associadas ao cálculo do “ponto de corte” foi definido as áreas de interpretação dos resultados.

Na Tabela 4 é possível observar a distribuição dos resultados negativos, indeterminados e positivos no ELISA entre as Delegacias Regionais do IMA.

Tabela 4. Diagnóstico da AIE por ELISA em soros de eqüídeos de acordo com as Delegacias Regionais do IMA em MG, 2002

Regional	Total	Positivos		Indeterminados		Negativos	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
Almenara	150	16	10,7	4	2,7	130	86,6
Montes Claros	146	45	30,8	6	4,1	95	65,1
Curvelo	102	7	6,9	8	7,8	87	85,3
Teófilo Otoni	150	3	2,0	0	0	147	98,0
Governador Valadares	50	2	4,0	1	2,0	47	94,0
Unai	150	16	10,7	5	3,3	129	86,0
Bambui	50	4	8,0	2	4,0	44	88,0
Oliveira	50	1	2	2	4	47	94,0
Viçosa	59	0	0	1	1,7	58	98,3
Uberlândia	50	0	0	0	0	50	100,0
São G. do Sapucaí	50	1	2	4	8	45	90,0
Total	1.007	95	9,4	33	3,3	879	87,3

4.1.3. Resultados em ambos os testes

A maioria dos IDGA negativos (96,2%) está abaixo de 0,220 DO, a maioria dos positivos acima de 0,264 DO (85,3%) e na área indeterminada estão alguns animais positivos (12) e negativos (21) correspondendo a 12,6% dos positivos e 2,3% dos negativos (Gráfico 4).

Nas Tabelas 5, 6 e 7 observa-se os resultados do IDGA e ELISA com relação a variáveis sexo, idade e espécie.

Na Tabela 8 podem ser observadas todas as correlações encontradas entre os resultados pelo teste IDGA e ELISA.

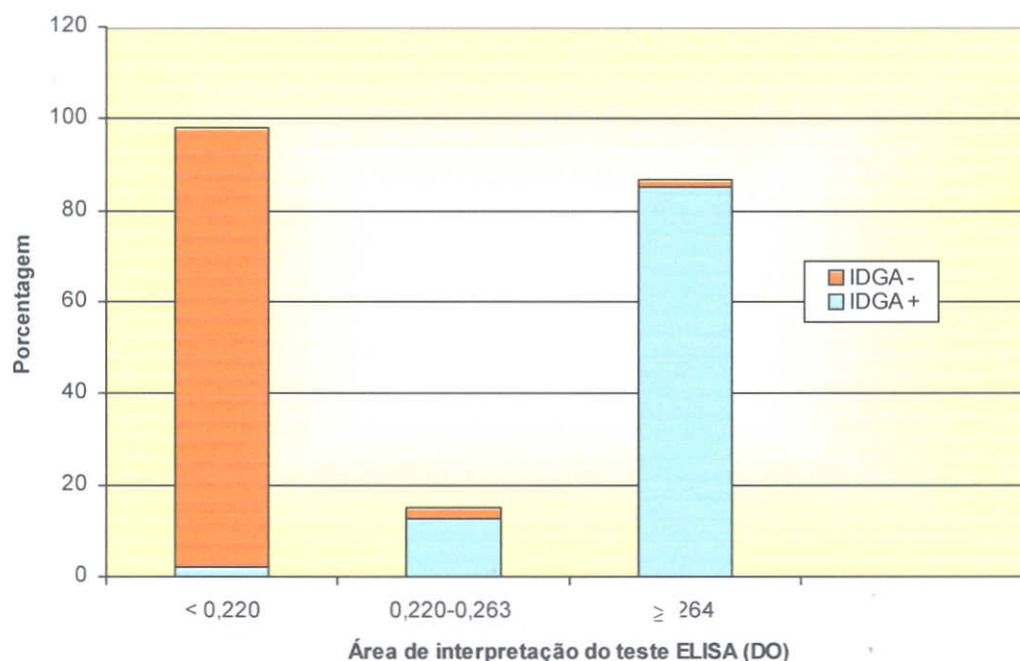


Gráfico 4. Porcentagem de soros eqüídeos positivos e negativos para AIE por IDGA e DO/ELISA em MG, 2002.

Tabela 5. Diagnóstico da AIE por IDGA e ELISA de acordo com o sexo, em soros de eqüídeos de MG, 2002.

SEXO	IDGA		ELISA		
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INDETERM.	POSITIVO
fêmea	284	35	277	12	30
macho	628	60	602	21	65
TOTAL	912	95	879	33	95

Tabela 6. Diagnóstico da AIE por IDGA e ELISA de acordo com a idade, em soros de eqüídeos de MG, 2002.

IDADE (anos)	IDGA		ELISA		
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INDETERM.	POSITIVO
<1	7	0	7	0	0
1-4	232	24	230	6	18
>4	673	71	642	27	77
TOTAL	912	95	879	33	95

Tabela 7. Diagnóstico da AIE por IDGA e ELISA de acordo com a espécie, em soros de eqüídeos de MG, 2002.

ESPÉCIE	IDGA		ELISA		
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INDETERM.	POSITIVO
EQUINA	825	82	798	26	83
MUAR	87	13	81	07	12
TOTAL	912	95	879	33	95

Tabela 8. Correlação entre os resultados de IDGA com a DO/ELISA em soros de eqüídeos de MG, 2002.

total	IDGA		ELISA		IDGA e	IDGA e	IDGA+	IDGA-	ELISA I	ELISA I
	+	-	+	-	ELISA+	ELISA-	ELISA+	ELISA+	IDGA+	IDGA-
1007	95	912	95	879	81	877	2	14	12	21
%	9,4	90,6	9,4	87,3	8,0	87,1	0,2	1,4	1,2	2,1

* +:POSITIVO, -:NEGATIVO, I: INDETERMINADO

4.2. Segunda coleta

4.2.1. IDGA, ELISA rgp90, CELISA e DOT BLOT.

Dez animais foram localizados para uma segunda coleta, todos negativos ao IDGA e positivos/indeterminados ao ELISA. A Tabela 9 mostra os resultados dos testes realizados nas 1ª (09 e 10/2002) e 2ª (05/2003) coletas (reteste mais CELISA e

DOT p26 e DOT rgp90) e algumas observações referentes aos animais. O animal "2" positivo ao teste ELISA nas duas coletas tornou-se positivo ao teste IDGA na 2ª coleta, confirmado no CELISA e DOT p26 e gp90. Os animais "3", "4", "5", "6", "8", "9" e "10" permaneceram negativos ao IDGA (confirmados como negativos pelo CELISA e DOT p26) e positivos ao teste ELISA (DOT gp90 positivo para os animais "3", "5", "6", "8" e "10" e negativo para os

animais “4” e “9”). O animal “7” oscilou de indeterminado para negativo ao teste ELISA (CELISA, DOT p26 e gp90 negativos). Os animais “1”, “5” e “10” (ELISA rgp90 e DOT rgp90 positivos) apresentavam sinais compatíveis com AIE sendo que o animal “1”, positivo somente ao teste ELISA, morreu com sinais clínicos de AIE antes da

realização da 2ª coleta (CELISA e DOT p26 negativos e DOT rgp90 positivo). Os testes IDGA e CELISA tiveram uma concordância de 100%. Pelo teste DOT BLOT os soros dos animais “1”, “2”, “3”, “5”, “6”, “8” e “10” foram positivos para a rgp90 e os “4”, “7” e “9” negativos, e o animal “2” foi positivo para a p26 (Figura 9).

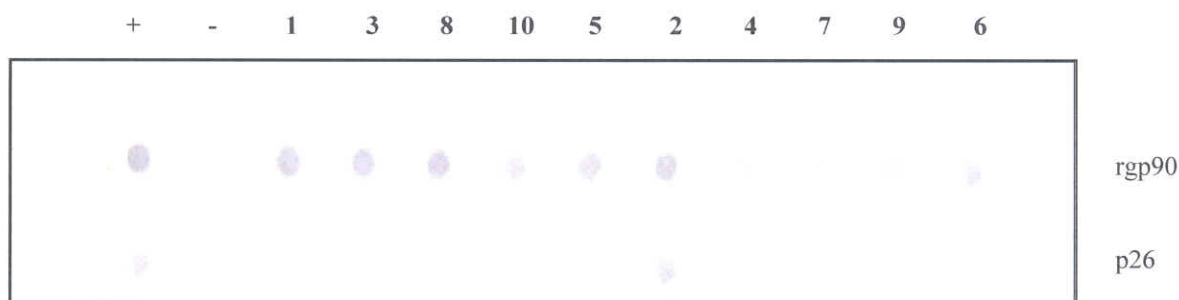


Figura 9. DOT BLOT em 10 soros de eqüídeos da 2ª coleta (+: controle positivo, -: controle negativo, os números correspondem aos animais) 1ª linha rgp90, 2ª linha p26

Tabela 9. Resultados de IDGA e ELISA em soros de eqüídeos na 1ª (09 e 10/02) e 2ª coleta (05/03) em MG, 2003.

Animal/ espécie	1ª coleta 09 e 10/02		2ª coleta 05/03					observações
	IDGA	ELISA	IDGA	ELISA	CELISA	D O T		
						P26	RGP90	
1/M	N	P	-	-	N*	N*	P*	Animal morreu com sinais de AIE.
2/E	N	P	P	P	P	P	P	Sem sinais/Propriedade positiva.
3/E	N	P	N	P	N	N	P	Sem sinais/Propriedade positiva.
4/M	N	P	N	I	N	N	N	Sem sinais.
5/E	N	P	N	P	N	N	P	Com sinais de AIE/Propriedade positiva.
6/E	N	P	N	P	N	N	P	Sem sinais/Propriedade positiva.
7/E	N	I	N	N	N	N	N	Sem sinais/Propriedade positiva.
8/E	N	I	N	P	N	N	P	Sem sinais/Propriedade positiva.
9/E	N	P	N	P	N	N	N	Sem sinais.
10/E	N	I	N	P	N	N	P	Com sinais de AIE/Propriedade positiva.

M: muar/asinino E: eqüino, P: positivo * relativo a 1ª coleta

4.3. Análise Estatística

Os resultados da sensibilidade e especificidade comparada entre ELISA e IDGA foram de 97,81% e 96,16%

respectivamente (Figura 10). Esta diferença apresentou um χ^2 de 682,10 *** ($p < 0,001$).

	IDGA	+	-	TOTAL
ELISA +		93	35	128
-		02	877	879
TOTAL		95	912	1007

Figura 10. Representação dos dados para o cálculo da sensibilidade e especificidade comparada.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a padronização de um ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra a glicoproteína 90 (gp90) do VAIE para uso em diagnóstico de campo. Os resultados obtidos foram comparados com o IDGA que detecta anticorpos contra a proteína 26 (p26) do VAIE e é o teste usado como oficial no Brasil e em outros países. No ELISA foi utilizado um valor discriminatório ("cut off"). Este valor de 0,220 DO foi achado através do critério sugerido por Sanchez-Viscaino e Alvarez (1987) e pelo gráfico de correlação dos resultados IDGA e ELISA de todos os 1007 soros eqüídeos analisados. Acrescentou-se a área dos positivos uma área intermediária, dos indeterminados (0,220 a 0,263 DO), com o intuito de melhor situar a incerteza normal destas áreas limítrofes e aumentar a confiabilidade dos resultados em ELISA. Os resultados iguais ou maiores que 0,264 DO foram considerados positivos verdadeiros. A definição das áreas foi de extrema importância para a interpretação do teste ELISA e para os achados da comparação dos testes.

Dos 1007 soros eqüídeos analisados 95 foram positivos ao IDGA e 128 indeterminados/positivos ao ELISA. As regionais de Unai, Montes Claros e Almenara apresentaram índices maiores de positividade, concordando com os dados obtidos por Bevilacqua (1993) que caracterizou as regiões noroeste e nordeste de Minas Gerais, como regiões endêmicas primárias e epiendêmicas. Das 95 reações positivas ao IDGA 59 foram forte positivas (+++), 5 medianamente positivas (++) e 31 fraca positivas (+). Este é um dado importante, já que o número de resultados fraco positivo é grande, podendo passar como negativo pelo laboratório executor. Das 31 amostras fraca positivas (+) 24 foram positivas verdadeiras ao ELISA, das 59 forte positivas (+++) ao IDGA 52 foram positivas verdadeiras ao ELISA e as 5 reações medianamente positivas (++) ao IDGA foram positivas verdadeiras ao ELISA. Reações fracas ao IDGA e positivas verdadeiras ao ELISA são uma característica importante do teste, concordando com o achado de Soutullo et al. (2001).

Levando em consideração que 35 animais são IDGA negativos e ELISA

indeterminados/positivos, 93 IDGA positivos e ELISA indeterminados/positivos, 877 IDGA e ELISA negativos e dois IDGA positivos e ELISA negativos, foram calculadas a sensibilidade e especificidade comparada. Observa-se que 128 eqüídeos estão na área considerada como indeterminada/positiva ($\geq 0,220$ DO) e que somente 95 animais foram detectados pelo IDGA, o que demonstra uma maior sensibilidade do ELISA. A sensibilidade comparada do ELISA com relação ao IDGA é de 97,81% e a especificidade é de 96,16%, melhor do que os dados obtidos por Dias et al. (2000) que encontraram uma sensibilidade de 95,38% e especificidade de 80,31% ao comparar um ELISA comercial (Bio-Medical Internacional, USA) com o IDGA. Estes índices foram baseados no IDGA apesar deste teste não ser considerado o "teste ouro" ("gold standard"), pois não detecta animais na fase inicial da doença (Soutullo et al., 2001).

A leitura da densidade ótica do teste ELISA variou de 0,015 a 1,063 nos 1007 soros e de 0,160 a 1,063 nos 95 IDGA positivos, sendo que somente duas amostras positivas ao IDGA estavam abaixo de 0,220 DO (área considerada negativa ao ELISA). Com relação aos IDGA negativos houve uma variação de 0,015 a 0,466 DO sendo que trinta e cinco estavam acima de 0,220 DO considerado como indeterminado ou verdadeiro positivo no ELISA. Considerando o ponto de corte o que se nota é que 2,1% dos IDGA positivos (2 amostras) não estão sendo detectados pelo teste ELISA e que 27,3% dos ELISA indeterminados/positivos (35) não estão sendo detectados pelo IDGA, com uma diferença de 25,23% de detecção entre eles. Quase todas as amostras positivas (95) ao teste IDGA foram detectadas pelo teste ELISA (93), com exceção de 2. Em contrapartida 35 das 128 amostras indeterminadas/positivas ao ELISA não foram detectadas pelo teste IDGA, o que argumenta a favor da sensibilidade do teste ELISA.

Pelo gráfico de porcentagem de soros eqüídeos positivos e negativos para AIE por IDGA e DO /ELISA observou-se que 96,2% dos soros negativos (877) pelo IDGA apresentavam leitura abaixo de 0,220 DO no ELISA e que 85,3% dos soros positivos (81) pelo IDGA tinham leitura igual ou acima de 0,264 DO no ELISA. Na faixa dos indeterminados (entre 0,220 e 0,263) se encontravam 33 soros sendo que 12 positivos (12,63%) e 21 negativos ao IDGA (2,3%). Como consideramos o ponto de 0,220 DO como o limite dos soros negativos e positivos, e a área dos indeterminados pertencente a uma área onde o reteste é recomendado, 879 amostras são negativas ao ELISA (contra 912 do IDGA) e 128 (12,71%) amostras são indeterminadas/positivas ao ELISA (contra 95 do IDGA). No caso do ELISA ser usado como triagem estes animais (indeterminados) não serão desconsiderados. Os resultados indeterminados/positivos no ELISA, em caso de levantamento soroepidemiológico para AIE deverão ser submetidas ao teste confirmatório IDGA. E ainda em caso de discordância o reteste após 30 dias deveria ser recomendado, o que aumenta a segurança do diagnóstico.

Duas amostras positivas ao IDGA foram negativas ao ELISA. A possibilidade de reação cruzada com outros retrovírus deve ser considerada, e talvez explique casos em que o IDGA persista positivo sem qualquer reação ao teste ELISA (Langemeier et al., 1996) bem como a possibilidade da existência de uma nova variedade genética resultante de mutações no gene *env* e conseqüentemente na antigenicidade das proteínas do envelope como a observada no HIV-1 (Reis et al., 2003), já que a proteína *rgp90* usada foi baseada na seqüência clonada a partir da amostra "Wyoming" do VAIE. O Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG tem conduzido trabalhos no sentido de caracterizar amostras brasileiras do VAIE

e determinar as possíveis variações no gene *env* em relação às amostras descritas por outros autores e disponíveis no Genbank (NCBI, Bethesda, USA).

Apesar dos índices oficiais apresentarem um perfil da situação eles não informam a taxa da prevalência da doença no rebanho, uma vez que se referem somente aos exames laboratoriais de AIE realizados para fins de trânsito e participação de eventos sob a fiscalização do IMA. A realização de um inquérito soro epidemiológico para a pesquisa da taxa de prevalência da AIE é imprescindível para que se possa definir um programa de controle adequado à realidade de cada estado e de cada região dentro dos estados como em Minas Gerais onde a distribuição da AIE parece ser heterogênea. Para tal, é necessário o uso de testes sensíveis que reünam praticidade e baixos custos. Desde 1974 o Brasil usa o IDGA como teste oficial, que apesar de possuir alta sensibilidade e especificidade não detecta anticorpos na fase inicial da doença, em um período que varia de 14 a 45 dias pós-infecção. Os Estados Unidos utilizam um ELISA competitivo para a detecção de anticorpos anti-p26 como teste de triagem oficial, na tentativa de diagnosticar estes animais "falso negativos" dados pelo IDGA. No Brasil com o mesmo propósito um ELISA foi utilizado para a erradicação de um foco em Minas Gerais em 1994 (Reis et al.) e em 1997 Reis et al. desenvolveram o teste ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti gp90. Anticorpos anti gp90 são os primeiros a aparecer na AIE e em níveis até 1000 vezes maiores, fato relevante para a sua elaboração. Em casos de erradicação de foco, a utilização de testes mais sensíveis como o ELISA torna-se essencial para a detecção precoce e o isolamento dos animais infectados a fim de prevenir a disseminação da doença.

Com o intuito de caracterizar melhor o "status" sorológico dos animais dez cavalos negativos ao IDGA e indeterminados/

positivos ao ELISA com leitura $\geq 0,220$ DO (3 dos 21 classificados como indeterminados, e 7 dos 14 como positivos) foram localizados para novos testes: IDGA, ELISA, CELISA e DOT BLOT. Os dois cavalos positivos ao IDGA e negativos ao ELISA, infelizmente, não foram localizados para reteste. A distância de oito meses entre a 1ª coleta (09 e 10/2002) e a 2ª coleta (05/2003) dificultou a localização destes animais. Os animais IDGA positivos e ELISA indeterminados/positivos não foram escolhidos para reteste já que não havia discordância entre eles. O animal "1" morreu três meses após a 1ª coleta com sinais de AIE, possivelmente estava na fase aguda da doença, ou apresentava baixíssimos níveis de anticorpo antiVAIE ou mesmo uma resposta intermitente a p26, sendo diagnosticado somente pelo teste ELISA rpg90. Segundo Langeimeier et al (1996) poderia ser uma falha individual ao responder para o antígeno *gag* ou pela potente propriedade da gp90 ao induzir mais anticorpos que a p26. O animal "2" tornou-se positivo ao teste IDGA no reteste e já na primeira coleta era detectado apenas pelo teste ELISA. Dos três animais que apresentam sinais sugestivos de AIE, um morreu e os outros dois foram detectados somente aos testes que pesquisavam anticorpos contra a glicoproteína 90 (ELISA e DOT). Estes achados argumentam a favor da sensibilidade do teste ELISA e de sua detecção precoce. Os animais "3", "5" "6", "8" e "10" continuaram negativos ao teste IDGA sem alterar o resultado ELISA da faixa de indeterminado/positivo (CELISA e DOT p26 negativos e DOT rpg90 positivo). O animal "7" oscilou da área de interpretação do ELISA indeterminada para a área negativa, confirmada pelos testes CELISA e DOT p26 e gp90. E os animais "4" e "9" confirmaram os resultados pelo IDGA (CELISA e DOT p26 negativos) e ELISA, mas com o DOT gp90 negativo.

Com relação à dispersão da AIE de algumas variáveis (sexo, idade e espécie) algumas

considerações poderão ser feitas a título de observação já que este não foi o objetivo do trabalho. Sessenta e oito por cento (68%) dos cavalos coletados foram machos contra 32% de fêmeas. Estes números refletem o serviço como o tipo de utilização destes animais na propriedade. A opção dos produtores é por machos já que as fêmeas são menos vigorosas para o trabalho com o inconveniente de terem suas funções limitadas no final da gestação e no período da amamentação. As fêmeas apresentaram maior percentual de positividade (10,72% pelo IDGA e 13,16% indeterminados/positivos no ELISA) que os machos (8,82% pelo IDGA contra 12,5% indeterminados/positivos no ELISA) ao contrário do trabalho de Bevilacqua (1993) e Silva et al. (2001) que encontraram mais machos que fêmeas contaminadas. Fêmeas e machos teriam a mesma possibilidade de contaminarem. Esta pequena diferença na susceptibilidade encontrada nos dois sexos estaria relacionada ao manejo e não determinada pelo sexo. A maioria dos animais coletados, 744 (73,9%), tinha mais de 4 anos. Nesta idade os animais estão mais treinados, dóceis e vigorosos para o trabalho, o que explica uma maior quantidade nesta faixa etária. A quantidade de animais positivos encontrada nos intervalos 1 a 4 e > 4 anos foi de 9,4% e 9,5% para o IDGA; e 9,4% e 14% para o ELISA. Belivacqua (1993) e Silva et al. (2001) observaram uma maior prevalência dos exames positivos entre os animais acima de 78 meses (6,5 anos) e 9 anos, respectivamente. A maior prevalência da AIE em animais mais velhos parece estar relacionada ao tempo de exposição ao VAIE tanto por manejo como por transmissão mecânica por vetores. Segundo Corrêa e Corrêa (1979) a AIE acomete equídeos sem diferença de idade. Com relação à espécie os eqüinos foram a maioria entre os 1007 animais coletados, 907 contra 100 muare e asininos ou 90,1% e 9,9% respectivamente, refletindo a relação de eqüinos (88%) e muare/asininos (12%) no estado, segundo o

senso do IBGE (2001). Treze por cento (13%) dos muare são positivos ao IDGA e 19% indeterminados/positivos ao ELISA, contra 9% dos eqüinos ao IDGA e 12% ao ELISA incluindo os indeterminados. Os muare parecem ser mais resistentes a AIE, tornando na maioria das vezes portadores vigorosos inaparentes raramente padecendo com a doença, podendo justificar o encontro de um maior número de muare portadores vivos. Estudos com um maior número de animais (muare e asininos) estão sendo conduzidos pelo Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG para verificar a importância destes animais como mantenedores da AIE.

A rapidez e automação dos testes ELISA e IDGA devem ser consideradas. Enquanto em uma lâmina para IDGA são processados 9 soros, na placa para ELISA são realizados 88. As vantagens do teste ELISA sobre o IDGA são dentre outras economia, rapidez, sensibilidade, detecção dos anticorpos não precipitantes e identificação dos soros fracamente positivos ou duvidosos no IDGA e o monitoramento dos níveis de anticorpos passivos (colostrais) de potros nascidos de éguas positivas para AIE. Segundo Lew (1993), o preço do ELISA é cerca de dez vezes mais barato que o IDGA devido a pequenas quantidades de antígeno necessário para o teste. Outro ponto a ser considerado é que a leitura do teste IDGA é por vezes subjetiva, haja vista a grande quantidade de reações fraca positivas que passam despercebidas resultando em resultados equivocados. Importante salientar que para o processamento do ELISA existe a necessidade de treinamento e de um aparelho para a leitura dos testes o que faz com que seu uso seja restrito a alguns laboratórios.

A sensibilidade agregada está aumentada neste trabalho em 25% já que os testes usados (IDGA e ELISA) detectam as duas

principais e imunodominantes proteínas do VAIE (p26 e gp90).

O ELISA apresenta, portanto, excelente qualidade para ser usado como teste de triagem em levantamentos e Programas de Controle e Erradicação da AIE.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados pode-se concluir que o ELISA é:

mais sensível que o IDGA detectando maior número de animais positivos;

apropriado para teste de triagem a ser utilizado em grandes levantamentos soroepidemiológicos;

detecta as reações fraca positivas ao teste IDGA com resultados bastante nítidos;

junto com o teste IDGA apresenta sensibilidade agregada aumentada em 25%.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDERSEN, S.; CARPENTER, S. Characterization of variable regions in the envelope and S3 open reading frame of equine infectious anemia virus. *J.Virol.*, v. 65, n.8, p.4255-4262, 1991.
- BALL, J.M.; PAYNE, S.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R. C. EIAV Genomic Organization: Further Characterization by Sequencing of purified Glycoproteins and cDNA. *Virology*, n.165, p. 601-605, 1988.
- BATISTA, J.A. J.; FONSECA, V.O. Anemia Infeciosa dos Equinos. *Arquivos da Escola de Veterinária*, n.23, p.281-290, 1971.
- BEVILACQUA, P. D. *Ecossistemas para Anemia Infeciosa Equina em Minas Gerais de 1973 a 1991*. UFMG, 1993. Dissertação (mestrado) Escola de Veterinária, Universidade Federal, Belo Horizonte.
- BÜRKI, F.; ROSSMANITH, W.; ROSSMANITH, E. Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anemia. *Veterinary Microbiology*, n.33, p.353-360, 1992.
- CALAMEL, M.; LAMBERT, M. *Exprimer les resultats E.L.I.S.A en unites*. France: Laboratoire National de Pathologie des Petits Ruminants, 1988.
- CARVALHO, R. Situação do programa de controle e erradicação da Anemia Infeciosa Equina em Minas Gerais. *V&Z - Veterinária e Zootecnia em Minas Gerais (artigo técnico)*, ano XVII, n.75, p.14-21, 2002.
- CLEMENTS, J. E; PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Vir.Res.* v.32, p.96-109, 1994.
- CLEMENTS, J. E.; ZINC, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infectious. *Clinical microbiology Reviews*, v.9, n.1, p.100-117, 1996.
- COFFIN, J. M.; Retroviridae and their replication. In: FIELDS, D. M., KNIPE, (2.ed) *Virology*. New York: Raven Press, v.2, 1997.
- COGGINS, L.; NORCROSS, I. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet*, v.60, p.330, 1970.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; NUSBAUM, R. Diagnosis of Equine Infectious Anemia by Immunodiffusion Test. *Am. J. Vet. Res.* n.1, v.33, p.11-17, 1972.

COGGINS L. Carriers of equine infectious anemia virus. *J. Am. Vet. Assoc.*, v.184, n.3, p.279-281, 1984.

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

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo: Varela, 1979.

CRAWFORD, T.B.; WARDROP K.J.; TORNQUIST, E.R.; REILICH, E.; MEYERS, K.M.; Mc GUIRE, T.C. A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. *Journal of Virology*, v.70, n.11, p.7842-7850, 1996.

DIAS, H.L.T.; MOLNÁR, É.; MOLNÁR, L. Diagnóstico sorológico da anemia infecciosa equina: imunodifusão em gel de ágar ou ELISA? *A hora Veterinária- ANO 20*, n.118, p.69 -73, 2000.

FERRAZ, I. B. F. *Vírus da Anemia Infecciosa Equina: amplificação por PCR do DNA pró-viral da gp90, comparação com o teste de ELISA e IDGA e variabilidade genética de amostras*. UFMG, 1998. Tese (doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal, Belo Horizonte.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. *Virology*, volume 2. New York: Raven Press, 1990.

HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies-A Laboratory Manual*. CSH: New York, 1988.

ICTU-THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, acessado em 30/09/2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTU>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa da Pecuária Municipal, 2001.

ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine Infectious Anemia: Current Knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 174, n.7, p.727-733, 1979.

ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V. Detection of Equine Infectious Anemia Virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *JAVMA*, v.180, n.3, p.276-278, 1982.

ISSEL, C. J.; RUSHLOW, K.; FOIL, L. D.; MONTELARO, R. C. A perspective on Equine Infectious Anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Veterinary Microbiology*, v.17, p.251-286, 1988.

ISSEL, C.J.; MACMANUS, J.M.; HAGIUS, S.D.; FOIL, L.D.; ADAMS, W.V.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia: prospects for control. *Develop. Biol. Standard*, v.72, p.49-57, 1990.

KEMENY, L.J., MOTT, L.O. ; PEARSON, J.E. Titration of equine anemia virus: Effects of dosage on incubation time and clinical symptoms. *Cornell Vet*, v.61, p.687, 1971.

KOBAYASHI, K.; KONO, Y. Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. *Nat.Inst.Anim.Health Q*, n.7, p.8-20, 1967.

KONO, Y.; YOKIZO, Y. Attempts to cultivate the equine infectious anemia virus in various types of cells. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, v.8, p.182, 1968.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKANAGA, Y(a). Immunization of horse against Equine Infectious Anemia (EIA) with an attenuated EIA virus, *Natl. Int. Anim. Health. Q.*, v.10, p.113, 1970.

- KONO, Y.; YOKIZO, Y.; FUKANAGA, Y.(b). Growth characteristics of equine infectious anemia virus in horse leukocyte cultures. *Arch.Gesamte Virusforsch*, v.30, p.252-256, 1970.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKANAGA, Y. Serological comparasion among various strains of equine infectious anemia virus. *Arch. Gesamte Virusforsch*, v.34, p.332, 1971.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKANAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses, *Arch.Gesamte Virusforsch*, n.41, p.1, 1973.
- KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKANAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, v.16, p.8., 1976.
- LANGEMEIER, J. L.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.6, p.1481-1487, 1996.
- LEW, A .M.; THOMAS, L.M.; HUNTINGTON, P.J. A . Comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus. *Veterinary Microbiology*, n.34, p.1-5, 1993.
- Mc GUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HENSON, J.B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am.J.Pathol.*, v.61, p.283, 1971.
- Mc GUIRE, T.C. Supression of syntheses of an IgG subclass in a persistent viral infection. *Immunology*, v.30, p.17, 1976.
- Mc GUIRE, T.C.; FRASER, G.D.; MEALEY, R.H. Cytotoxic T Lymphocytes and neutralizing antibody in control of Equine Infectious Anemia Virus. *Viral Immunology*, n.4, p.521-531, 2002.
- MALMQUIST, W. A.; BARNETT, D.; BEVCAR, C. S. Production of equine infectious anemia in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch*, n. 42, p.361-370, 1973.
- MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.K.; PORTES, J.P.; SMITH, B.J.; NEWMAN, K.E. Comparison of diagnostic testes for the detection of equine infectious anemia antibody . *J.Vet. Diagn. Invest.*, n. 1, v.1, p.50-52, 1989.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. *Boletim de Defesa Sanitária Animal*, v.31, Brasília:MA, 2001.
- MONTELARO, .C.; PARECKH, B.; ORREGO, A; ISSEL, C.J. (a) Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J.Biol.Chem.* v.259, p.10539-10540, 1984.
- MONTELARO, R.C.; WEST, M.; ISSEL, C.J. (b) Antigenic Reativity of the Major Glycoprotein of Equine Infectious Anemia Virus, a Retrovirus. *Virology*, n.136, p.368-374, 1984.
- MONTELARO, R. C.; BALL , J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: *Retroviridae*, v.2., New York: Plenum Press, 1993.
- MURAKAMI, K.; SENTSU, H.S; SHIBAHARA, T.; YOKOYAMA, T. Reduction of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes during febrile periods in horses experimentally infected with Equine Infectious Anemia Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.67, p.131-140, 1999.

- NAKAJIMA, H.; USHIMI, C. Immunodiffusion studies of purified Equine Infectious Anemia Virus. *Infection and Immunity*, v.3, p.373-377, 1971.
- PAYNE .S.L. ; FANG F.D.; LIU, C-P.; DHURVA, B.R.; RWAMBO, P.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. *Virology*, v.161, p.321-331, 1987.
- PROIETTI, A.A .B.B. C. *Variabilidade do vírus da imunodeficiência humana tipo I em Minas Gerais: infecção em grupo de pacientes hemofílicos, doadores de sangue e indivíduos com AIDS*. UFMG, 1997. Tese (doutorado) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal, Belo Horizonte.
- REIS, R. *Anemia Infeciosa Equina-Diagnóstico sorológico e padronização de teste de imunodifusão*. UFMG, 1984. Dissertação (professor titular) Escola de Veterinária, Universidade Federal, Belo Horizonte.
- REIS, J.K.P.; LEITE,R.C. (a) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. *Prevent. Vet. Med.*, v.20, p.261-267, 1994.
- REIS, J.K.P.; MELO, L. M.; RESENDE, M.R.; LEITE, R.C .(b) Use of na ELISA test in the eradication of equine infectious anaemia focus. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 26, p. 65-68, 1994.
- REIS, J. K. P. *Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da Anemia Infeciosa Equina para uso em imunodiagnóstico*. UFMG, 1997. Tese (doutorado) Escola de Veterinária. Universidade Federal, Belo Horizonte.
- REIS, J.K.P.; CRAIGO, J.K.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Characterization of EIAV LTR variability and compartmentalization in various reservoir tissues of long-term inapparent carrier ponies. *Virology*, n.311, p.169-180, 2003.
- SANCHEZ-VISCAINO, J.M.; CAMBRA ALBAREZ, M. *Técnicas imunenzimáticas ELISA en patologia animal y vegetal (serie técnica n.7)* Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 1987.
- SELLON, D.C.; PERRY, S.T.; COGGINS, L.; FULLER, F.J. Wild-type Equine Infectious Anemia Virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *Journal of Virology*, v.66, n.10, p.5906-5913, 1992.
- SHANE, B.S.; ISSEL. C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, n.3, p.351-355, 1984.
- SHEN, D.T.; GOHHAM.J.R.; Mc GUIRE, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia antibody to purified p26 viral protein. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.1542-1543, 1984.
- SILVA, R.A . M.S.; ABREU,U.G.P.; BARROS, A .T.M. *Anemia Infeciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal*. Embrapa: Corumbá, circular técnica n.29, 2001.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*, v. 95, p.49-59, 2003.

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

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

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

TIZARD,I.R. *Imunologia veterinária uma introdução*.6 ed. São Paulo: Roca, 2002.

TOMA, B. Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée par le virus de l'anémie infectieuse des équidés. *Rec. Méd. Vét.*,v.1, n.156, p.55-63, 1980.

TOMA, B.; ELIOT, M.; SAVEY, M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis / encefalitis caprina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.9, n.4, p. 1077- 1119, 1990.

VOLLER,A.;BIDWELL,D.E.; BARTLETT, A. *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) a guide with abstracts of microplate applications*. Londres: Nuffield Laboratories of comparative medicina, 1979.

WILLIAMS,D.L.;ISSEL,C.J.; STEELMAN, C.D; ADAMS, W.V.; BENTON, C.V. Studies with Equine Infectious Anemia Virus : transmission attempts by mosquitoes; and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* v.42, p.1469-1473, 1981.

ANEXO A- Formulário de coleta

FORMULÁRIO PARA COLETA DE SANGUE DE EQÜÍDEOS  PROJETO DE PESQUISA IMA/EV-UFG	<i>USO DO LABORATÓRIO</i> Data chegada : Nº:
---	--

Proprietário e veterinário

Proprietário : Propriedade: Município: Responsável pela coleta:	CRMV-MG:
--	----------

ordem	A N I M A L						Laboratório uso do Laboratório
Nº	Nome/ número	espécie	raça	sexo	Idade	Origem	Resultado IDGA ELISA
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							

veterinário

observação: Preencher o campo correspondente ao animal com o nome ou número do animal, espécie (colocar a letra **E** para eqüino, **M** para muar e **A** para asinino), raça, sexo (colocar **F** para fêmea e **M** para macho), idade e a origem caso este animal tenha vindo de outra região.

ANEXO B- Manual de coleta



MANUAL DE COLETA- PROJETO DE PESQUISA IMA/EV-UFMG

1. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:

Colocar o nome ou número do animal na etiqueta do tubo vacutainer, com caneta esferográfica.

2. COLETA DE SANGUE:

A coleta do sangue deverá ser feita utilizando uma agulha para tubo vacutainer individual que ajustada ao aplicador será introduzida na jugular do equídeo, após antissepsia com álcool a 70 °. O tubo vacutainer será pressionado, perfurando a outra extremidade da agulha o tapume de borracha. A quantidade de sangue deverá representar aproximadamente 60 % do volume total do tubo.

3. PREPARO DO SORO

- A - Repousar o sangue (temperatura ambiente, inclinação aproximada 45°) até dessorar.
- B - Descolar o coágulo com estilete individual, caso não haja dessoramento.
- C - Centrifugar o soro (se possível) visando melhor qualidade da amostra, a 3.000 R.P.M durante 10 minutos.
- D - Transferir o soro para o frasco de penicilina com igual identificação ao do tubo vacutainer.
- E - Colocar volume mínimo de 2 ml de soro.
- F - Fixar a tampa com esparadrapo.
- G - Congelar na posição vertical.
- H - Estocar em saco plástico.

4. PREENCHIMENTO DO FORMULÁRIO:

Preencher o campo destinado a identificação do proprietário e veterinário.

Preencher o campo correspondente ao animal com o nome ou número do animal, espécie (colocar a letra **E** para equino, **M** para muar e **A** para asinino), raça, sexo (colocar **F** para fêmea e **M** para macho), idade e a origem caso este animal tenha vindo de outra região. Não preencher os campos destinados ao laboratório.

5. ACONDICIONAMENTO E ENVIO DAS AMOSTRAS:

- A .Colocar as amostras em caixa de isopor com gelo, no momento do envio.
- B. Preencher os espaços com jornal.
- C. Enviar para o Laboratório de Saúde Animal do IMA- Av. do Contorno 1707 A- CEP: 30 110 070-Bairro Floresta –Belo Horizonte-MG- fone: (31)3 2138209

ANEXO C- Formulário da 2ª coleta



FORMULÁRIO PARA COLETA DE SANGUE DE EQÜÍDEOS

USO DO LABORATÓRIO

Data
chegada :

Nº:

Proprietário e veterinário

Proprietário:

Propriedade:

Município:

Responsável pela coleta:

ordem	A N I M A L						Laboratório uso do Laboratório
Nº	Nome/ número	espécie	raça	sexo	Idade	Histórico do animal	

veterinário

observação : Preencher o campo destinado ao histórico do animal.



MANUAL DE COLETA- PROJETO DE PESQUISA IMA/EV-UFG

1. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:

Colocar o nome ou número do animal na etiqueta do tubo vacutainer, com caneta esferográfica.

2. COLETA DE SANGUE:

Para soro : A coleta do sangue deverá ser feita utilizando uma agulha para tubo vacutainer individual (frasco de tampa vermelha) que ajustada ao adaptador será introduzida na jugular do equídeo, após antissepsia com álcool a 70 °. O tubo vacutainer será pressionado, perfurando a outra extremidade da agulha tapume de borracha. A quantidade de sangue deverá representar aproximadamente 60 % do volume total do tubo.

3. PREPARO DO SORO

- A - Repousar o sangue (temperatura ambiente, inclinação aproximada 45°) até dessorar.
- B - Descolar o coágulo com estilete individual, caso não haja dessoramento.
- C - Centrifugar o soro (se possível) visando melhor qualidade da amostra, a 3.000 R.P.M durante 10 minutos.
- D - Transferir o soro para o frasco de penicilina com igual identificação ao do tubo.
- E - Colocar volume mínimo de 2 ml de soro.
- F - Fixar a tampa com esparadrapo.
- G - Congelar na posição vertical.
- H - Estocar em saco plástico.

4. PREPARO DO SANGUE

Depois de coletado no frasco próprio ele já estará pronto para ser enviado.

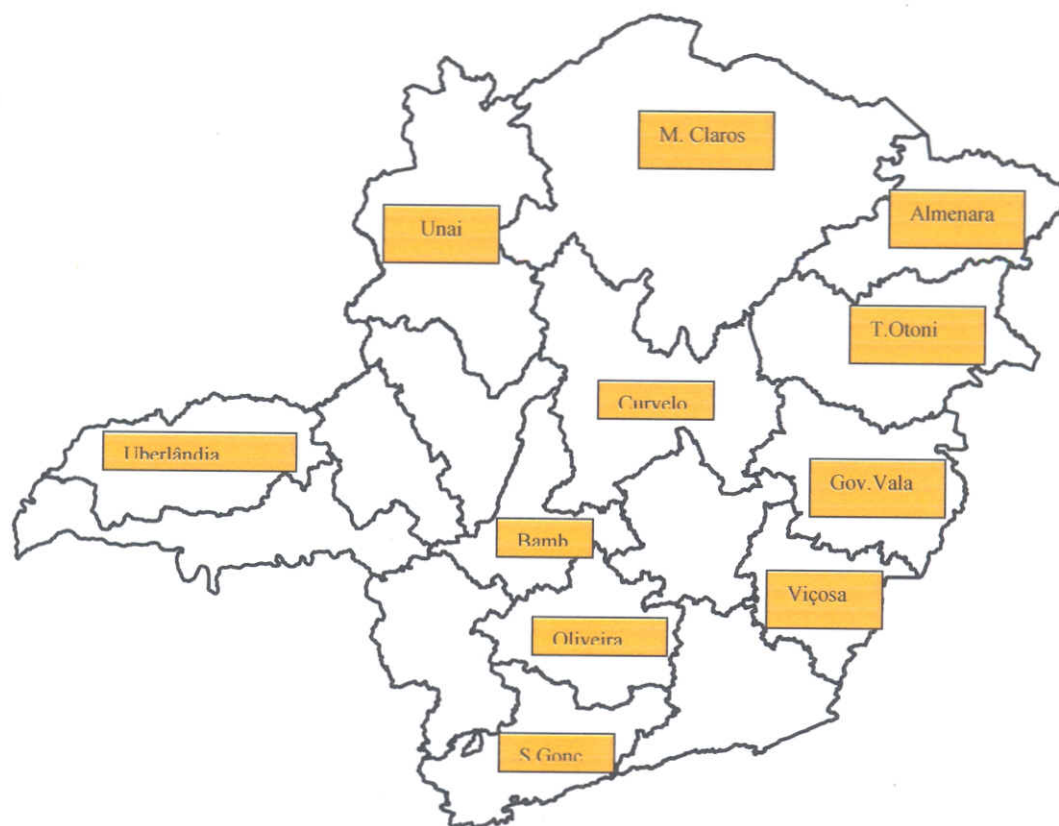
5. PREENCHIMENTO DO FORMULÁRIO:

Preencher o campo destinado ao histórico. Os campos referentes ao animal e proprietário já estão preenchidos .

6. ACONDICIONAMENTO E ENVIO DAS AMOSTRAS:

- a) Colocar as amostras em caixa de isopor com gelo. Preencher os espaços com jornal.
- b) Enviar imediatamente para o Laboratório de Saúde Animal do IMA- Av. do Contorno 1707 A- CEP: 30 110 070-Bairro Floresta –Belo Horizonte-MG- fone: (31)3 2138209

ANEXO E - Mapa de Minas Gerais com as Delegacias Regionais do IMA onde foram coletados os soros.



ANEXO F- Histórico dos animais negativos ao IDGA na 1ª coleta e positivos ao ELISA submetidos a 2ª coleta.

animal	espécie	raça	sexo	idade	Histórico
1	muar	mestiça	macho	15	Emagrecimento progressivo. Alimentando pouco. Locomovendo pouco e com dificuldade. Procurando lugar mais úmido (aguada). Não foi medicado. O animal morreu em fevereiro de 2003. Não existe animal doente na propriedade.
2	eqüino	SRD	macho	9	O animal encontra-se em bom estado, gordo e sem nenhum sintoma clínico aparente.
3	eqüino	SRD	macho	10	Animal clinicamente sadio. O proprietário desconhece a presença de animais doentes na propriedade. O animal foi vacinado contra raiva em janeiro. O animal continua trabalhando normalmente.
4	muar	SRD	macho	16	O animal não apresentou nenhuma alteração entre a última coleta e esta. O animal continua trabalhando normalmente apesar da idade. Clinicamente não apresenta nenhuma alteração significativa. O tratador não sabe da existência de animais doentes na propriedade. Neste período o animal não foi vacinado (raivá) e não tomou nenhum tipo de medicamento.
5	eqüino	mestiça	macho	7	Animal não está e nem esteve doente. Animal sente cansaço quando é movimentado e sobe ladeira. Não existe animal doente na propriedade. O animal está na propriedade há 3 anos, foi comprado no próprio município de Araçuaí.
6	eqüino	mestiça	macho	10	Animal não apresenta sintomas
7	eqüino	SRD	macho	07	Animal trabalhando normalmente. Não apresenta nenhuma alteração clínica visível. Animal não foi medicado nos últimos seis meses (nem vacina, nem vermífugo e antibióticos). Animal em boas condições nutricionais. O animal é mineralizado normalmente.
8	eqüina	SRD	macho	06	Animal trabalhando normalmente, sem nenhuma alteração clínica visível. Animal mineralizado constantemente.
9	eqüino	SRD	macho	09	Animal trabalhando normalmente, sem nenhuma alteração clínica visível. Animal mineralizado constantemente. Recebeu complexo vitamínico (Potenay) há aproximadamente 60 dias.
10	eqüina	Mestiço	macho	1,5	Potro está começando a emagrecer.