UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Eliana Leonor Hurtado Celis

Desenvolvimento e Padronização de ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina

Botucatu – SP
2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Eliana Leonor Hurtado Celis

Desenvolvimento e Padronização de ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

C392d

Celis, Eliana Leonor Hurtado
Desenvolvimento e Padronização de ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina / Eliana Leonor Hurtado Celis. -- Botucatu, 2026
106 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: João Pessoa Araújo Junior

1. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 2. Anemia Infecciosa Equina. 3. VAIE. 4. Peptídeo Quimérico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Contextualização Biotecnológica e Social

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) representa um grave desafio sanitário e socioeconômico para a equideocultura nacional, impactando diretamente o trânsito animal, os eventos agropecuários e a subsistência do trabalho rural. Em regiões de ecossistemas complexos e manejo extensivo, como o Pantanal brasileiro, a alta prevalência do vírus da AIE (EIAV) e a presença constante de vetores tornam o diagnóstico preciso o pilar fundamental para as ações de defesa sanitária e vigilância epidemiológica.

Nesse cenário, o método sorológico oficial, a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), embora reconhecido pelo rigor de especificidade, apresenta limitações operacionais relacionadas ao tempo de execução, à subjetividade na leitura e à dependência de antígenos nativos limitados. Do ponto de vista biotecnológico, a transição para ensaios de imunoabsorção enzimática, como o iELISA, baseados em peptídeos sintéticos quiméricos oferece uma solução direcionada, escalável e automatizável.

Sob a perspectiva social e econômica, o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica nacional e de baixo custo fortalece a autonomia tecnológica do Brasil, racionaliza o fluxo de triagem sanitária e democratiza o acesso ao diagnóstico em áreas de difícil acesso geográfico. A disponibilização de um insumo diagnóstico robusto e padronizado protege a saúde do rebanho equídeo, assegura a renda de pequenos e médios produtores e fornece ao Serviço Veterinário Oficial uma ferramenta estratégica para o controle efetivo da enfermidade no país.

Nome do Autor: Eliana Leonor Hurtado Celis

Título: Desenvolvimento e Padronização de ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior
Membro e presidente
Departamento de Genética, microbiologia e imunologia
IBB – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ - USP – São Paulo

Pesquisadora Dra. Márcia Furlan Nogueira Tavares de Lima
Membro
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Prof. Dr. Mario Celso Sperotto Brum
Membro
Laboratório de Virologia Animal
Universidade Federal do Pampa - Uruguaiana

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Membro
Clínica Veterinária - UNESP
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da defesa: 20 de agosto de 2026.

Dedicatória

A Jesus e Maria.
Ao meu pai Daniel, minha mãe Luz Marina
e minhas irmãs Laura e Daniela.

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, porque a vida só acontece nas mãos d´Ele (Jo 15, 5). É por Ele, n´Ele, com Ele e para Ele que todas as cosas boas ocorrem. E, mesmo nas dificuldades e nos desafios, é a consciência da eternidade e do seu amor infinito que sustenta as fragilidades humanas, pois "tudo posso naquele que me fortalece" (Fp 4, 13).

Aos meus pais, Daniel e Luz Marina, que, unindo seu amor, decidiram construir uma linda família que é meu refúgio, meu consolo e minha motivação para ser melhor a cada dia. Às minhas irmãs, Laura e Daniela, e meu irmãozinho no céu, meus grandes amores e o maior presente que Deus me deu. E a toda minha família, que sempre me apoia e acompanha nesta longa caminhada que é a vida.

Ao professor João, que me abriu as portas da virologia, da biologia molecular e da sorologia, aceitando ser meu orientador. Essa oportunidade tem me feito crescer de maneiras inimagináveis, proporcionando uma experiencia única. Sou profundamente grata pela acolhida, pela confiança e por me fazer sentir parte da família.

À Marcia, cuja proposta do projeto contribuiu para que a minha tese e meus conhecimentos se desenvolvessem em uma nova área, ajudando a lapidar meus saberes e, no caminho, tecendo também uma amizade.

Aos meus amigos – de perto e de longe – meu coração transborda gratidão. Obrigada pelas palavras, orações, companhia, risadas, viagens, loucuras e conselhos. O tempo vivido ao lado de quem se torna amigo faz cada dia valer a pena. Obrigada por me aguentarem e por estarem ali sempre que eu mais precisei (e perdão pelo que houve de difícil).

À Santa Igreja Católica, que em qualquer parte do mundo me conduz pela Verdade. É uma graça saber que, em todo lugar, existe um lar, alguém com uma palavra sincera, um sorriso familiar e uma música que aquece alma. A todos os Sacerdotes que sustentam minha caminhada: não imagino meu mundo sem vocês, sem Jesus.

A todos os professores, mestres e educadores que cruzaram o meu caminho, desde a infância até o doutorado: a minha mais sincera gratidão. Cada um de vocês deixou uma marca profunda na minha trajetória, indo muito além dos ensinamentos teóricos e científicos. Agradeço por cultivarem em mim a busca pelo conhecimento, por fortalecerem meus princípios e valores, e por me ensinarem a disciplina e o compromisso que sustentam esta conquista. O desenvolvimento desta tese traz em sus essência a dedicação e a sabedoria de cada um de vocês.

A toda a equipe do IBTEC, uma pequena família formada no dia a dia de um trabalho árduo e constante. Agradeço o apoio, o conhecimento compartilhado e o companheirismo de

todos, especialmente dos professores que se dedicam, dia após dia, a levar a ciência a todos os cantos, com propósitos tão decisivos.

À UNESP, uma universidade que me surpreendeu e me ofereceu não apenas conhecimento, mas pessoas incríveis, momentos cheios de cultura, oportunidades únicas – tudo isso no estado mais dinâmico e movimentado do Brasil, São Paulo.

Ao Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia, pelo suporte financeiro que tornou este sonho possível.

Meus agradecimentos a todos vocês. Cada conquista tem mais sentido quando é compartilhada e alcançada com a ajuda de muitos corações.

“Cada verdade é um reflexo: por trás do reflexo, e dando-lhe valor, está a Luz.”

Antonin-Dalmace Sertillanges

CELIS, E. L. H. **Desenvolvimento e Padronização de ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina.** Botucatu, 2026. Tese – Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma enfermidade viral crônica, incurável e de notificação obrigatória no Brasil, sendo o diagnóstico sorológico um desafio devido à natureza mutacional do lentivírus. O presente estudo visou o desenvolvimento, a padronização e a validação de um Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (iELISA) utilizando peptídeos sintéticos quiméricos como antígenos para a detecção de anticorpos contra o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) em soros equinos. A estratégia molecular baseou-se na fusão de um fragmento da porção transmembrana (TM) da gp45 com um peptídeo de 42 aa da proteína p26, contendo uma cauda de Histidina (His). Os ensaios de padronização revelaram que o principal desafio metodológico residiu no efeito de fundo da amostra de soro equino, que gerou intensa interação inespecífica. Para neutralizar esse ruído analítico, estabeleceu-se um protocolo de correção baseado na subtração matemática da densidade óptica (DO) do "branco do soro" individualizado (poços sem antígeno), eliminando falsos-positivos por adsorção inespecífica. A partir de curvas ROC e critérios epidemiológicos alinhados às diretrizes de defesa sanitária do MAPA, determinou-se o ponto de corte (*cutoff*) definitivo de > 0,247 (J = 0,9352). Este limiar priorizou a sensibilidade diagnóstica (96,86%) em equilíbrio com a especificidade (96,66%), estabelecendo uma margem de segurança para a captura de soros com baixos títulos de anticorpos. A plataforma demonstrou reprodutibilidade e suporte diagnóstico frente à possível variabilidade genômica viral, sendo capaz de identificar anticorpos nas amostras não reagentes no teste de referência de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA/Coggins). Divergências diagnósticas investigadas por PCR revelaram que os falsos-negativos no iELISA podem corresponder a animais em fase aguda de infecção (janela imunológica). Conclui-se que o iELISA quimérico desenvolvido apresenta-se como uma promissora ferramenta nacional de triagem, demostrando acurácia analítica, potencial de automação e custo-benefício. Os resultados obtidos estabelecem uma sólida base metodológica para futuros estudos de validação em escala populacional, visando subsidiar os fluxos de vigilância epidemiológica e viabilizar a posterior transposição dos antígenos para plataformas imunocromatográficas de fluxo lateral.

Palavras-chave: EIAV, Anemia Infecciosa Equina, ELISA, peptídeo quimérico sintético.

CELIS, E. L. H. **Development and Standardization of and Indirect ELISA Using Synthetic Chimeric Peptides for the Serodiagnosis of Equine Infectious Anemia.** Botucatu, 2026. Tese – Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA) is a chronic, incurable, notifiable viral disease in Brazil, whose serological diagnosis remains challenged by the high mutation rate inherent to lentiviruses. This study aimed to develop, standardize, and conduct the preliminary analytical validation of an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (iELISA) employing synthetic chimeric peptides as antigens to detect antibodies against Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) in equine sera. The molecular design was based on the fusion of a transmembrane (TM) fragment of gp45 with a 42-amino-acid segment of the p26 protein, engineered with an N-terminal polyhistidine (His) tag. Assay optimization demonstrated that the primary analytical bottleneck arose from equine serum matrix interference, resulting in pronounced non-specific background binding. To eliminate this background noise, a correction protocol was established based on the mathematical subtraction of optical density (OD) values obtained from individualized antigen-free control wells, successfully abrogating false-positive signals driven by non-specific adsorption. Based on Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis and epidemiological criteria aligned with MAPA regulatory guidelines, an optimal *cutoff* of > 0.247 (J=0.9352) was defined. This threshold maximized diagnostic sensitivity (96.86%) while maintaining high specificity (96.66%), providing a reliable margin of safety for identifying low-titer antibody samples. The platform demonstrated high analytical reproducibility and diagnostic robustness against potential field viral diversity, successfully identifying reactive antibodies in samples deemed non-reactive by the reference Agar Gel Immunodiffusion (AGID/Coggins) test. PCR investigation of discordant results suggested that iELISA false negatives were likely associated with animals in the early acute phase of infection prior to detectable seroconversion (window period). In conclusion, the chimeric iELISA developed herein stands as a promising, cost-effective screening tool with high potential for automation. These findings establish a robust methodological foundation for future population-scale validation trials, aiming to streamline official epidemiological surveillance workflows and support the subsequent transition of these chimeric antigens into lateral flow point-of-care devices.

Keywords: EIAV, Equine Infectious Anemia, ELISA, chimeric synthetic peptide.

Lista de Figuras

Figura 1 Efeito do incremento de SuperBlock™ no tampão de sensibilização (TCB) sobre o sinal no iELISA utilizando o peptídeo TM-P42+His. 49
Figura 2 Efeito da concentração dos peptídeos quiméricos sintéticos (P42-TM+His e TM-P42+His) na absorbância dos soros controle positivo (C+) e negativo (C-) no iELISA. 50
Figura 3 Avaliação comparativa da reatividade imunoenzimática entre os peptídeos quiméricos isolados (50 ng) e as formulações em *Pool* (50 ng e 100 ng) no iELISA. 51
Figura 4 Titulação seriada do soro equino (1:200, 1:400 e 1:800) e cinética de incubação do conjugado enzimático (15, 30 e 60 min) no iELISA. 53
Figura 5 Titulação comparativa de conjugados anti-IgG equina acoplados à peroxidase (HRP) produzidos em coelho e cabra em diferentes diluições de trabalho no iELISA. 54
Figura 6 Curva ROC a partir dos dados de Índice de Positividade e IDGA. 55
Figura A1 Placa de reação. Distribuição dos reagentes utilizados na sensibilização……79
Figura A2 Distribuição da solução diluente na Placa Deepwell. 81
Figura A3 Preparo de diluição de soros 1:400. Placa Deepwell. 81
Figura A4 Placa de reação. Adição dos soros para reação iELISA. 82

Lista de Tabelas

Tabela 1 Grupo de equinos e número de amostras positivas e negativas segundo o resultado do IDGA. 37
Tabela 2 Exemplificação do efeito da correção por pareamento com Branco Específico na eliminação do ruído de fundo em soros de equídeos. 52
Tabela 3 Parâmetros de desempenho diagnóstico e distribuição de frequências observados no ensaio ELISA em diferentes pontos de corte candidatos. 56

Lista de abreviações

µg= Micrograma
µl= Microlitro
aa= aminoácido
ABCCP= Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Pantaneiro
AIE= Anemia Infecciosa Equina
AUC= do inglês "*Area Under the Curve*". Área Abaixo da Curva
BSA= do inglês "*Bovine Serum Albumin*". Albumina Sérica Bovina
CEUA= Comissão de Ética no Uso de Animais
DMSO= Dimetilsulfóxido
DNA= do inglês "*Deoxyribonucleic Acid*". Ácido desoxirribonucleico
DO= Densidade Óptica
EIAV= do inglês "*Equine Infectious Anemia Vírus*". Vírus da Anemia Infecciosa Equina
ELISA= do inglês "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*". Ensaio de Imunoabsorção enzimático
iELISA= do inglês "*Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*". Ensaio de Imunoabsorção enzimático indireto
EM= Espectrometria de Massas
EMBRAPA= Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Env= envelope
FMVZ= Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
gp45= Glicoproteína do envelope 45
gp90= Glicoproteína de superfície 90
H2O2= Peróxido de Hidrogênio
HCl= Ácido clorídrico
HPLC= do inglês "*High Performance Liquid Chromatography"*. Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
HRP= do inglês "*Horseradish Peroxidase*". Enzima Peroxidase
IP= Índice de Positividade
Ig= Imunoglobulina
IgG= Imunoglobulina G
IgM= Imunoglobulina M
IDGA= Imunodifusão em Gel de Ágar

LPD = Leite em pó desnatado

LTR= do inglês "*Long Terminal Repeat*"

MAPA= Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ml= Mililitro

ng = Nanograma

OVA= Ovalbumina, albumina de ovo.

p26= Proteína do capsídeo viral 26

P42= Peptídeo 42

P42+His= Peptídeo P42 + cauda his

P42-TM+His= Peptídeo quimérico composto pelo peptídeo P42 + porção da TM com cauda His

PBMCs= do inglês "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*". Células mononucleares do sangue periférico

PBST= do inglês "*Phosphate-Buffered Saline with Tween 20*". Solução Salina Tamponada com Fosfato com Tween 20

PCR= do inglês "*Polymerase Chain Reaction*"**.** Reação em cadeia da polimerase

nPCR= do inglês "*Nested Polymerase Chain Reaction*". Reação em cadeia da polimerase aninhada

qPCR= do inglês "*Quantitative Polymerase Chain Reaction*". Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

sn-PCR= do inglês "*Semi-Nested Polymerase Chain Reaction*". Reação em cadeia da polimerase semianinhada

POC= do inglês "*Point of care*"

RNA= do inglês "*Ribonucleic Acid*". Ácido ribonucleico

RT= do inglês "*Reverse Transcription, Reverse Transcriptase*". Transcrição reversa, transcriptase reversa

SB+In = Conjunto de SuperBlock^{TM} e coquetel Inibidor de protease cOmplete^{TM} Mini

v/v= volume/volume

TCA= Tampão Citrato Acetato

TCB= Tampão Carbonato Bicarbonato

TCB+SB= TCB com 1ul de SuperBlock^{TM} por ml.

TNFR= do inglês "*Tumor Necrosis Factor Receptor*". Receptor do Fator de Necrose Tumoral

TM= Proteína Transmembrana

TM-P42+His= Peptídeo quimérico composto por porção da TM + peptídeo P42 com cauda his

TMB= Tetrametilbenzidina

UF= Unidade Federativa

UNESP= Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

WOAH= Organização Mundial da Saúde Animal

Sumário

Introdução 20

1. Capítulo 1: Revisão de literatura 23

1.1. Anemia Infecciosa Equina 23

1.1.1. Instrução Normativa MAPA n° 45 de 15 de junho de 2004: Diretrizes para o Controle Sanitário e Trânsito de equídeos (BRASIL, 2004) 26

1.1.2. Instrução Normativa MAPA n° 52 de 26 de novembro de 2018: Critérios Técnicos para o Diagnóstico Laboratorial e Credenciamento (BRASIL, 2018) 26

1.2. Vírus da Anemia Infecciosa Equina 28

1.3. Fisiopatologia da doença 29

1.4. Diagnostico 31

1.4.1. IDGA 32

1.4.2. ELISA 32

1.4.3. Teste rápido ou teste Point-Of-Care 34

1.5. Peptídeos sintéticos 34

2. Capítulo 2: Desenvolvimento, Validação Diagnóstica e Aplicabilidade do Ensaio iELISA 36

2.1. Objetivos 36

2.2. Materiais e Métodos 37

2.2.1. Amostras de soro equino 37

2.2.2. Peptídeos quiméricos sintéticos 39

2.2.3. Protocolo geral do Ensaio iELISA Indireto Baseado em Peptídeo Sintético Quimérico 39

2.2.4. Padronização e otimização do Ensaio iELISA 41

2.2.4.1. Sensibilização e adsorção do antígeno na fase sólida 42

- Reconstituição dos peptídeos 42
- Tampão de sensibilização 42

- Titulação da Concentração do Antígeno. 43
- Delineamento e arranjo espacial da placa de reação 43

2.2.4.2. Avaliação das Soluções e Condições de Bloqueio 43

2.2.4.3. Processamento e Incubação das Amostras de Soro 44

- Diluentes de Amostra e Titulação dos Soros 44
- Avaliação do tempo de Incubação da Amostra 44

2.2.4.4. Titulação do Conjugado Enzimático 44

2.2.5. Validação do iELISA 45

2.2.6. Processamento dos Dados e Análise Estatística 45

2.2.7. Teste de Aplicabilidade 47

2.3. Resultados 48

2.3.1. Caracterização dos Peptídeos Sintéticos P42-TM+His e TM-P42+His 48

2.3.2. Otimização e Padronização das Condições Reacionais do iELISA 48

- Sensibilização e Adsorção do Antígeno 48
  - Veículo de Solubilização e Estabilidade 48
  - Suplementação do Tampão de sensibilização 48
  - Titulação da Concentração Antigênica e Efeito do Pool Quimérico. 49
  - Correção da Adsorção Inespecífica (Desenho do Branco Específico) 51
- Bloqueio dos Sítios Reativos Remanescentes 52
- Otimização de diluição de soro 52
- Titulação do Conjugado Enzimático 53

2.3.3. Validação do protocolo iELISA com Amostras de Campo 55

2.3.4. Estabelecimento do Ponto de Corte. 55

2.3.4.1. Comparativo de Cutoff 56

2.3.5. Teste de Aplicabilidade 57

2.4. Discussão 59

2.5. Conclusões 71

Referências bibliográficas 72

Apêndices 79

Apêndice A: Procedimentos Operacional Padrão completo do ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina _ 79

Apêndice B: Procedimento Operacional Padrão simplificado do ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina _ 84

Apêndice C: Resultados de iELISA nas amostras de campo (IDGA Negativo=0; Positivo=1)_____85

Apêndice D: Valores de Índice de Positividade (IP) das 80 amostras de campo da Fazenda Nhumirim avaliadas no teste ELISA. Todas as amostras são negativas_____ 98

Apêndice E: Resultados de Índice de Positividade (IP) no ensaio iELISA em amostras de campo persistentemente soronegativas com histórico de detecção molecular por PCR do município de Uruguaiana, RS (n=32) (IDGA/PCR Negativo=0; Positivo=1) _____ 99

Apêndice F: Resultados de Índice de Positividade (IP) no ensaio ELISA em amostras de campo negativas (IDGA) do município de Uruguaiana, RS (n=36) (IDGA Negativo=0) 100

Apêndice G: Resultados de Índice de Positividade (IP) no ensaio ELISA em amostras de campo positivas (IDGA) do município de Uruguaiana, RS (n=16) (IDGA Positivo=1)__ 101

Introdução

Os equinos são animais que desempenham múltiplos papéis na sociedade. O Brasil possui o terceiro maior plantel de equinos no mundo com cerca de 6 milhões de cabeças, o que representa um importante movimento econômico anual (UNDATA, 2024). Devido às características morfológicas do animal ele é utilizado desde tempos remotos na pecuária e na agricultura como ferramenta de trabalho e locomoção na lida com o gado, no manejo nas criações, na mecanização e no transporte em grandes propriedades rurais, especialmente onde o acesso por outro meio é ineficiente. Por outro lado, são utilizados em atividades esportivas e de competição gerando emprego e renda, e no mercado de lazer como animais de companhia e ferramenta terapêutica (Santos *et al.*, 2020).

O cavalo está profundamente associado com a cultura brasileira sendo um símbolo do homem do campo (o peão) e da história rural do país, também usado pelas forças policiais e militares para patrulhamento e controle nos locais de difícil acesso. Graças às atividades de melhoramento genético de equinos, o Brasil destaca-se na criação de raças como o Mangalarga, o Crioulo e o Quarto de Milha (Lima; Cintra, 2015).

O Brasil conta com uma extensão de 8,516 milhões de km^2, dos quais cerca de 2% pertencem ao Pantanal brasileiro, que é a maior planície alagável contínua do planeta (IBGE, 2004). Reconhecida pela UNESCO como patrimônio natural mundial e reserva da Biosfera, está localizado na região centro-oeste (principalmente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), compartilhando território com o Paraguai e a Bolívia (UNESCO, 2000).

A extensão total da Planície do Pantanal é estimada em 230 mil km^2. Esta região possui um ciclo de inundação, onde cerca de 80% da área pode ficar alagada durante a estação chuvosa (cheia), enquanto na estação seca surgem os campos, os lagos e as praias fluviais. A pecuária extensiva, ou seja, a criação de gado solto em grandes fazendas é uma prática tradicional adaptada aos ciclos de cheia e de seca e constitui-se a principal atividade econômica do local (BRASIL, 2014).

No Pantanal brasileiro, a tropa de serviço é constituída tanto por equinos mestiços adaptados à lida pantaneira quanto por exemplares da raça Pantaneira – um grupo genético localmente adaptado e reconhecido oficialmente, resultante de séculos de seleção natural e artificial e condições ambientais extremas - esses animais destacam-se pela notável rusticidade, com cascos resistentes à alta umidade e adaptações fisiológicas que favorecem a tolerância aos desafios sanitários da região. O cavalo é um elemento fundamental no manejo dos rebanhos, permitindo a logística e a comunicação entre as fazendas, especialmente na estação chuvosa,

que é o momento em que há maior limitação de estradas (escassez de infraestrutura) e ocorrência da inundação sazonal. Além disso, o cavalo pantaneiro é símbolo cultural, representando a tradição centenária da pecuária, e fonte de renda pelo valor agregado, em razão da qualidade de sua genética (Santos *et al.*, 2020).

Associada às características do Pantanal e às práticas de manejo tradicionais, esta região caracteriza-se por uma alta ocorrência da Anemia Infecciosa Equina (AIE), conhecida como a febre do pântano, enfermidade transmitida naturalmente por insetos hematófagos, presentes em alta população em ambientes úmidos e quentes, o que potencializa a disseminação (WOAH, 2019). As características da doença geram preocupação sanitária e risco à economia e à tradição do bioma por comprometer a principal atividade econômica, uma vez que a enfermidade debilita a tropa de trabalho, recurso indispensável para o manejo e a condução da bovinocultura, sobretudo durante a época da cheia, quando o cavalo constitui o único meio viável de locomoção e lida no campo (Sampaio *et al.*, 2024).

A AIE é uma enfermidade viral causada por um *Lentivírus* da família *Retroviridae*, que acomete equinos, asininos e muares (equídeos). É uma doença viral crônica e incurável, e de transmissão mecânica. A principal via de infecção no ambiente natural são os insetos hematófagos como o *Tabanus* spp. (mutuca) e as *Stomoxys* spp. (mosca do estábulo), os quais ao picar um animal infectado, transportam nas suas peças bucais o vírus para os animais sadios. Adicionalmente, a via iatrogênica destaca-se como a principal forma de disseminação dentro das propriedades, pelo uso de materiais contaminados (agulhas, seringas, instrumentos odontológicos, entre outros) com sangue infectado. A transmissão vertical é menos comum, mas pode se apresentar a passagem do vírus da fêmea para o potro durante a gestação (WOAH, 2019).

A manifestação da AIE nos equinos pode ser sintomática, nas formas aguda e crônica, e assintomática, está última é a condição mais preocupante, já que o animal continua disseminando o vírus sem ser descoberto, pela falta de apresentação de sinais clínicos embora seja portador do vírus. Nos casos sintomáticos agudos, os animais podem apresentar febre, hemorragias puntiformes, depressão, anemia, edema ventral (membros e abdômen), e em alguns casos pode levar à morte. Na forma crônica apresenta-se febre recorrente, perda de peso (caquexia), fraqueza e imunossupressão, com quadros de recuperação (Firdausy *et al*., 2025).

A infecção viral em equinos reduz sua resistência e capacidade de trabalho, prejudicando a economia local nos casos clínicos avançados dos animais portadores. Como comunicado na nota cientifica de Andrade *et al.* (2018), o desempenho atlético dos cavalos é afetado pela Anemia Infecciosa Equina.

A AIE é uma doença de Notificação Obrigatória, segundo a instrução normativa número 45 de 15 de junho de 2004 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004). No Articulo 9º recomenda-se "Para diagnóstico da A.I.E., usar-se-á a prova sorológica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), efetuada com antígeno registrado e aprovado pelo DDA, ou outra prova oficialmente reconhecida." Somado ao anterior, no Artículo 12° esclarece que "A validade do resultado negativo para o exame laboratorial da A.I.E. será de 180 (cento e oitenta) dias para propriedade controlada e de 60 (sessenta) dias para os demais casos, a contar da data da colheita da amostra." Assim, os animais com resultado positivo são impedidos do trânsito, exige a eutanásia (sacrifício sanitário) e requer a interdição do local de foco. Só nas regiões endêmicas é permitido o isolamento vitalício.

As características regionais do Pantanal, junto com a importância insubstituível do cavalo para a pecuária local, levam à exceção da eutanásia dos animais positivos, requirindo a marca de identificação e tendo o benefício do isolamento vitalício (segregados), mas com proibição total de trânsito (Nogueira *et al*., 2017).

No que diz respeito ao diagnostico e em razão da complexidade da problemática da doença, estudos são conduzidos para determinar a sensibilidade do teste de referência, evidenciando a falha quando há baixa quantidade de anticorpos circulantes, seja pela janela imunológica nos animais expostos recentemente, ou pelo fato do animal ser portador crônico ou assintomático, com níveis de anticorpos flutuantes, indetectáveis pelo IDGA. Estes falsos negativos têm sido identificados por meio da PCR para detecção do vírus ou pela detecção de anticorpos pelo ELISA (Thieulent *et al.*, 2025).

Embora, exista testes de ELISA comerciais disponíveis no mercado Brasileiro e protocolos de PCR para detecção do genoma viral, nessa tese foi desenvolvido um teste de iELISA com alta sensibilidade e especificidade para a pronta detecção dos animais positivos e o seu adequado isolamento, contribuindo com a saúde dos animais incorporando o uso de peptídeos quiméricos.

1. Capítulo 1: Revisão de literatura

1.1. Anemia Infecciosa Equina

A Anemia Infecciosa Equina foi descrita clinicamente pela primeira vez na França, pelo Médico Veterinário Lignée em 1843, onde equinos apresentavam sinais clínicos como febre recorrente, debilidade e perda de peso. Devido a maior prevalência de casos em regiões baixas, úmidas e alagadas associadas à presença de vetores, foi originalmente nomeada como "febre dos pântanos" (Vallé; Carré, 1904).

Os primeiros indícios da identificação do vírus como agente etiológico surgiram no início do século XX, período no qual pesquisadores demostraram que o responsável da doença passava pelos filtros que retêm as bactérias, o que evidenciava a natureza de um agente filtrável (vírus). Desta forma, a AIE foi estabelecida em 1904 como uma das primeiras doenças virais descritas em animais, sendo antecedida historicamente apenas pela descoberta do vírus da febre aftosa em 1898 (Vallé; Carré, 1904).

Em recentes estudos de metanálise e revisão sistemática sobre a distribuição mundial da doença, a soroprevalência combinada estimada em escala global foi de 20,9%, com variações marcantes entre as espécies de equídeos: os cavalos apresentam a maior prevalência estimada com 25.4%, seguidos pelos muares com 13.08% e asininos com 3.08%. Em termos de distribuição geográfica mundial, a América do Sul mostra a maior prevalência estimada em 27.21%, refletindo a persistente circulação viral e os desafios de controle sanitário na região quando comparada aos demais continentes (Firdausy *et al*., 2025; Thieulent *et al.*, 2025).

Na América, diagnosticou-se a doença pela primeira vez no Canadá, no final do século XIX, seguido de reportes na Venezuela no ano de 1960 e na Argentina em 1964. Já no Brasil, a suspeita da presença da Anemia Infecciosa Equina remonta a 1952, quando Manete admitiu a provável ocorrência da enfermidade em território brasileiro. Contudo, a primeira comprovação diagnóstica oficial no país foi registrada apenas em 1967 por Dupont, a partir de exame *post mortem* de um equino no Jockey Club do Rio de Janeiro, ano em que a circulação do vírus também foi descrita em outros estados como São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (EMBRAPA, 2001; Martins, 2004; Reis; Leite, 2016).

Uma análise retrospectiva indica que entre os anos de 2000 e 2023 foram reportados casos de AIE no Brasil, com números que variam de 388 casos positivos até mais de 6 mil por estado (Sampaio *et al.*, 2024). Estudos de prevalência em Minas Gerais como o de Almeida *et al.* (2006) apresentam porcentagens entre 3 e 5, considerando à área como endêmica; já Moraes

et al. (2017) mostra porcentagens perto de 2, expondo como variável importante a maior prevalência em muares do que em cavalos.

Outros estudos no Rio Grande do Sul, conduzidos por Machado *et al.* (2024), mostram que durante o período de 2009 a 2019 foram registradas 125 propriedades com pelo menos um animal positivo no oeste do estado. No estudo retrospectivo de Thieulent *et al.* (2025), dados extraídos a partir de 26 estudos de prevalência de AIE no Brasil, apontam uma porcentagem geral estimada de 1.21%, ficando evidente que as diferencias de prevalência entre estados são marcantes. Assim, reportam como os lugares com maiores índices a Ilha do Marajó (Pará) com 46.25% e o Pantanal com 35.75%, seguido de números gerais em alguns estados, 19.52% no Maranhão, 15.57% no Pará, 13.21% no Mato Grosso e 11.76% na Roraima.

No bioma Pantanal, comunicações pessoais de técnicos e produtores locais apontam a introdução e o estabelecimento da infecção a partir de 1974. Sendo um local com características ambientais e climáticas propicias para os dípteros hematófagos (mutucas, moscas, mosquitos), insetos vetores mecânicos do vírus, a introdução da nova enfermidade teve uma rápida disseminação e grande impacto socioeconômico (EMBRAPA, 2001). Krolow *et al.* (2024) oferece uma visão geral das mutucas no Brasil com base nos dados do Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil (CTFB), relatando que dentre as espécies brasileiras de insetos dípteros da família *Tabanidae*, no Pantanal foram registradas 35 espécies, 2 das quais são endêmicas.

Para 2007 estimava-se um plantel de 120 mil cavalos no Pantanal (Molina, 2020). Notícias da região de maio de 2023, asseguram que o plantel de equino para esse ano seria de 100 mil cabeças aproximadamente, sendo destes cerca de 5 mil cavalos Pantaneiros registrados na Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Pantaneiro (ABCCP, 2023). A prevalência da infecção na região, segundo reportado por Sampaio *et al.* (2024), pode chegar a atingir cerca de 50% dos animais, dentre os quais 40% sendo soropositivos e sem sinais clínicos, são utilizados para trabalho nas criações bovinas, permanecendo isolados das áreas com animais soronegativos.

A ocorrência da AIE tornou-se um grande obstáculo para equinocultura no país, gerando prejuízos económicos e dificultando o acesso aos mercados, nacionais e internacionais. Devido à situação, a instrução normativa número 45 de 15 de junho de 2004 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004) abre a exceção da eutanásia, promulgando o isolamento vitalício para animais de zona endêmica. Assim, restringiu-se a mobilização de animais positivos, com possibilidade de uso para trabalho na pecuária extensiva, tendo a consciência de que os rebanhos infectados devem permanecer na propriedade afastados dos sadios para evitar o contágio (EMBRAPA, 2001).

Diversos fatores influenciam na disseminação do vírus entre os animais, além da via natural por meio dos insetos hematófagos. O manejo e manipulação dos animais por parte do homem, origina um risco alto de transmissão iatrogênica, devido à falta de boas práticas sanitárias que tradicionalmente tem sido instaurada na pecuária. O uso de objetos perfurocortantes, elementos que entram em contato com o sangue do animal infectado e seguidamente é utilizado com o próximo animal, transporta o vírus de um equino para outro. A prevalência do vírus na propriedade também é um fator chave, já que, quanto maior o número de animais positivos, maior chance de transmissão. Todo o anterior influenciado pela carga viral e o estado do animal portador (EMBRAPA, 2001).

O programa de Prevenção e Controle da AIE no Pantanal Sul-Mato-Grossense é uma estratégia baseada em medidas sanitárias rigorosas. O objetivo do programa é a redução drástica da prevalência da AIE no plantel de equinos do Pantanal, visando o saneamento e a certificação das fazendas. As propriedades são classificadas como controlada, para planteis com testes semestrais com resultado negativo, e foco, para as propriedades com pelo menos um animal positivo (EMBRAPA, 2004).

As ações de identificação e eutanásia continuam a ser os principais meios de controle e erradicação da doença. Este acompanhamento sanitário é responsabilidade da assistência técnica veterinária privada, fiscalizada pelo serviço veterinário oficial da UF (Unidade Federativa) (EMBRAPA, 2004).

É importante ressaltar que os longos intervalos entre as coletas e a liberação dos resultados sorológicos criam janelas temporais que favorecem a evasão das ações sanitárias nas propriedades. Consequentemente, torna-se desafiador o rastreamento e a localização dos animais positivos, comprometendo a execução do programa de prevenção e controle.

O isolamento dos equinos como medida de emergência transitória é determinado imediatamente quando é identificado um animal reagente aos testes. Recomenda-se guardar uma distância de 200 m entre rebanhos para evitar a circulação de insetos infectados. Estudos como os desenvolvidos por Barros e Foil (2007), suportam a observação de que, o isolamento dos animais positivos evita a transmissão por meio dos vetores naturais em razão do distanciamento.

Devido à natureza do vírus, onde o inseto só atua como vetor, não há replicação e o sangue coagula rapidamente nas peças bucais dos dípteros, evitando transferência do vírus com tempo de deslocamento maior. Entretanto existe a possibilidade de deslocamento passivo do inseto pelo vento ou transporte incidental em veículos ou animais em movimento (Barros; Foil, 2007).

1.1.1. Instrução Normativa MAPA n° 45 de 15 de junho de 2004: Diretrizes para o Controle Sanitário e Trânsito de equídeos (BRASIL, 2004)

Essa normativa é o pilar regulatório do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) para Anemia Infecciosa Equina, a qual foca na defesa sanitária animal, na responsabilidade dos profissionais e nas regras para a movimentação animal.

A normativa determina de forma categórica que a colheita de sangue para exames oficiais de AIE deve ser realizada exclusivamente por Médicos Veterinários devidamente inscritos no Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV) da Unidade da Federação onde os animais se encontram. O profissional atua como autoridade técnica, sendo legalmente responsável por atestar a identidade fiel do animal no formulário oficial de requisição, garantindo que a amostra de soro corresponda exatamente ao equídeo examinado.

De tal modo, para que a amostra de sangue tenha validade legal, o veterinário coletor deve preencher minuciosamente a requisição oficial contendo a resenha detalhada do equídeo (pelagem, marcas, cicatrizes, redemoinhos e microchip). Qualquer divergência na resenha invalida o processo de recepção da amostra no laboratório, interrompendo o processo de diagnóstico.

Em conformidade com o anterior, para o trânsito animal é exigido o laudo laboratorial original com resultado negativo para AIE, que subsidia o serviço oficial na emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA), com uma validade de 60 dias (ou 45 dias em estados com programas específicos de controle).

Em caso de verificação de animal positivo (identificado como foco), são determinadas ações compulsórias imediatas como a interdição da propriedade pelo serviço oficial, o isolamento dos animais reagentes, realização de contraprova e o sacrifício obrigatório dos animais confirmados como portadores crônicos ou assintomáticos da infecção, uma vez que o EIAV não possui tratamento ou vacina permitidos.

1.1.2. Instrução Normativa MAPA n° 52 de 26 de novembro de 2018: Critérios Técnicos para o Diagnóstico Laboratorial e Credenciamento (BRASIL, 2018)

Nesta Instrução Normativa se estabelecem os critérios de engenharia de qualidade, padronização técnica e os requisitos legais para processar amostras oficialmente. O laboratório deve estar formalmente integrado à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), para emitir laudos com validade

federal. Desta forma, é regulado o credenciamento de laboratórios públicos e privados junto ao MAPA.

As técnicas diagnosticas oficiais padronizadas que possuem validade legal para confirmação enfermidade é a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), a qual é definida como a técnica de referência clássica. Para triagem, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) está permitido como técnica rápida de alta sensibilidade. A norma dita que qualquer resultado positivo ou inconclusivo obtido por ELISA deve ser obrigatoriamente submetido ao teste confirmatório por IDGA antes da emissão do laudo final de positividade.

As opções comerciais de kits de diagnóstico registradas e autorizadas para o controle oficial da Anemia Infecciosa Equina revelam um mercado concentrado. Para a técnica confirmatória de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), o único kit com registro ativo e comercializável no país é o desenvolvido pelos Laboratórios Bruch (o antígeno é produzido em cultura celular e purificado a partir de uma amostra não patogênica do EIAV). Já para a metodologia de triagem por ELISA, o portfólio de ensaios aprovados divide-se entre soluções nacionais e importadas. Produzido no país, encontram-se registrados o kit Vetlisa AIE IgG (antígeno recombinante purificado do EIAV; Bioclin/Quibasa, MG) e o Kit Diagnostico - AIE ELISA I (Biovetech). Como alternativas importadas autorizadas pelo serviço oficial, destacam-se o IDEXX cELISA EIA (Idexx Brasil) e o ID Screen Equine Infectious Anemia (IDvet / Advent América Latina) (BRASIL, 2026).

Cabe ressaltar que, embora o site oficial do MAPA liste o teste rápido imunocromatográfico AIE IgG Ver Fast (Bioclin), ensaios de fluxo lateral (teste rápido) não possuem opções comerciais viáveis e não têm sua importação ou comercialização de rotina permitidas no país (BRASIL, 2026).

Em caso de identificação de uma amostra positiva, o laboratório deve realizar a notificação compulsória imediata (em até 24 horas) à Superintendência Federal de Agricultura (SFA) do estado de origem do animal, permitindo o acionamento rápido da equipe do serviço oficial. O sistema de registro e rastreabilidade deve garantir a confiabilidade dos dados, permitindo o fluxo e cumprimento dos prazos para a transmissão de resultados.

Os insumos, antígenos e kits comerciais de ELISA e IDGA utilizados pelos laboratórios credenciados devem ser registrados e fiscalizados pelo MAPA. Isso garante que os antígenos passem por rigoroso controle de qualidade lote a lote, visando mitigar as variações de sensibilidade que possam causar falsos-negativos na rotina de diagnóstico nacional.

1.2. Vírus da Anemia Infecciosa Equina

O Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) pertence ao género *Lentivirus*, família *Retroviridae* e subfamília *Orthoretrovirinae*. Devido a utilização da taxonomia binomial para as espécies virais, foi renomeado em 2023 como *Lentivirus equinfane* (ICTV, 2023). É o agente causal de infecções persistentes e incuráveis, o que implica a exigência do sacrifício sanitário ou a segregação do animal (BRASIL, 2004).

O EIAV é um retrovírus envelopado, RNA fita simples de sentido positivo com duas copias por vírion. O tropismo celular do agente é por monócitos e macrófagos dos equinos, que atuam como reservatórios virais. A alta taxa de mutação que caracteriza a família viral é devida a incapacidade de reparo dos erros processados pela enzima transcriptase reversa (RT), razão pela qual acontece a formação de populações de variantes genéticas relacionadas, mas não idênticas, conhecidas como *quasispecies* (Thieulent *et al.*, 2025). Esta particularidade é fundamental para a persistência e a patogenia da AIE, dado que as mutações nas proteínas do envelope criam escapes imunogênicos, os quais manifestam-se com sinais clínicos como febre recorrente ao se instalar uma nova variante dominante. Além disso, as variações genéticas permitem a adaptação do vírus ao hospedeiro, o que permite a progressão da etapa aguda para a crônica ou assintomática (Craigo; Ronald, 2013).

O vírion do EIAV possui três genes estruturais principais, conhecidos como *gag, pol e env*, os quais codificam para as poliproteínas precursoras, as quais ao serem clivadas formam as proteínas maduras. Dentre esses genes, *gag* codifica para proteínas como a p26, proteína do capsídeo essencial para formação da partícula infectante, alvo do diagnostico em virtude da sua alta conservação antigênica entre as *quasispecies* (Hussain *et al*., 1988).

Por outro lado, o gene *env* codifica para proteínas precursoras, que se configuram na gp90, a proteína de superfície encarregada da interação com o receptor da célula do hospedeiro, é um antígeno altamente imunogênico, mas ao mesmo tempo hipervariável, o que leva aos escapes na detecção do sistema imune (Thieulent *et al.*, 2025).

A glicoproteína da superfície gp90 codificada pelo gene *env*, possui domínios variáveis (nomeados V1, V2, V3, V4, V5), dos quais V3 e V4 são os que mais afetam a eficácia da ação do sistema imunitário. No domínio V3 encontra-se a região de domínio neutralizante principal (PND), mutações nessa região permitem o escape da nova *quasispecies* dos anticorpos criados para a cepa anterior (Xiu-Fang *et al.*, 2011). Por fim, mutações nos sítios de glicosilação na gp90 que alteram a conformação da proteína podem limitar a acessibilidade dos epítopos, levando a resistência à neutralização (Thieulent *et al.*, 2025).

A proteína p26 codificada pelo gene *gag*, é a principal proteína do capsídeo (CA), e forma a camada protetora central que encapsula o material genético. A p26 é uma molécula altamente conservada entre as diferentes *quasispecies* do EIAV, devido a sua estrutura estável e as poucas mutações nessa região do RNA. Em razão disso, é um dos principais antígenos utilizados para detecção de anticorpos contra EIAV (Zhang *et al.*, 2024).

Por outro lado, a glicoproteína gp45, conhecida também como TM (transmembrana), codificada pelo gene *env*, é componente essencial do envelope do vírus, sendo a porção transmembrana do complexo, que ancora o envelope viral à membrana do vírion. O papel da gp45 é mediar o processo de fusão de membranas, sofrendo uma mudança conformacional, após a gp90 se ligar no receptor celular ELR1, permitindo assim a liberação do nucleocapsídeo e do material genético no citoplasma da célula hospedeira (Rosati *et al*., 2004).

A gp45, assim como a gp90 e a p26, são proteínas que induzem uma forte resposta imune humoral. É devido a isso, que, testes de ELISA para detecção de anticorpos contra EIAV usam combinações para aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes (Ostuni *et al*., 2025).

1.3. Fisiopatologia da doença

O Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) apresenta um tropismo celular restrito, comportando-se como um lentivírus mielotrópico com afinidade específica por células da linhagem monócito-macrófago. O processo de infecção inicia-se pela interação direta entre a glicoproteína de superfície do envelope viral gp90, e o receptor da célula hospedeira denominado *Equine Lentivirus Receptor-1* (ELR1). O ELR-1, identificado como o único receptor celular funcional capaz de mediar a infecção pelo EIAV, é uma proteína de membrana pertencente à superfamília de Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR). A ligação específica da gp90 ao ELR1 desencadeia alterações conformacionais no envelope viral que coordenam a entrada do vírus na célula hospedeira; mecanismo este que, conforme evidências recentes, ocorre predominantemente por meio de endocitose mediada por clatrina (Schimmich *et al.*, 2025).

No endossomo, o ambiente desencadeia ativação da proteína transmembrana gp45/TM propiciando a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e a posterior liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O RNA é retrotranscrito pela Transcriptase Reversa (RT) no citoplasma, originando o DNA proviral, o qual é integrado no DNA da célula hospedeira

utilizando a enzima integrase, o que confere a característica persistente do vírus no hospedeiro (Schimmich *et al.*, 2025).

Por tanto, a doença é causada pela ativação e disfunção dos macrófagos infectados, e pela resposta imune desregulada de caráter imunopatológico. No momento da infecção, na resposta imune inata, os macrófagos são ativados, levando a produção excessiva de mediadores inflamatórios, e, é gerada uma ação antiviral por intermédio da produção de interferons do tipo I (IFN-α/β) (Schimmich *et al.*, 2025).

Na imunidade adaptativa, há produção de anticorpos IgM e IgG como resposta humoral, contra as glicoproteínas do envelope como gp90 e do capsídeo, p26. Os anticorpos neutralizantes contra a gp90 reduzem a carga viral levando ao equino para o estado assintomático. Concomitante, devido as mutações da gp90 durante o ciclo replicativo viral, a formação de *quasispecies* virais facilitam a evasão do sistema imune, criando uma onda de viremia, mantendo o ciclo febril recorrente nos animais cronicamente infectados. Já os anticorpos contra a proteína p26 são a base do diagnostico sorológico por IDGA, em função do baixo índice mutacional (Hussain *et al.*, 1988).

A resposta celular mediante ação dos linfócitos T citotóxicos destroem células infectadas, mas frequentemente insuficiente devido a persistência do vírus pela integração do material genético no genoma da célula (Sellon, 1993).

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma enfermidade de apresentação crônica. A suspeita da doença é evidenciada pelos sinais clínicos e as lesões anatomopatológicas, precisando de confirmação por métodos sorológicos e moleculares. Muitos casos são subclínicos. O óbito pode se manifestar nos casos de doença aguda (WOAH, 2019).

Visando o controle da doença e procurando alternativas, historicamente, vacinas já foram usadas na tentativa de controle da infecção na China. Os anticorpos vacinais interferem na determinação dos testes sorológicos, motivo pelo qual entrou em desuso. É por isso que a quarentena é o método utilizado para controle da transmissão da infecção (WOAH, 2019).

Pesquisas desenvolvidas em culturas celulares de macrófagos e monócitos derivados de sangue equino infectados com o EIAV, confirmam a ausência de dano celular no processo de replicação viral, em comparação com outros vírus. A taxa de replicação está diretamente relacionada ao estado de ativação da célula, e a produção de citocinas pró-inflamatórias é o efeito mais notável nas culturas. Assim, embora os monócitos permitam a entrada do vírus e a transcrição reversa, estas células não suportam a replicação viral ativa nem a expressão de proteínas do vírus; a diferença dos macrófagos maduros onde o vírus se expressa e replica (Leroux *et al.*, 2004).

Desta forma, os sinais que o animal apresenta na fase aguda e crônica, são causados pela mediação do sistema imune e não pela destruição direta de populações celulares. As citocinas pro-inflamatórias liberadas pelos macrófagos atuam no centro termorregulador, causando a febre recorrente. A anemia e trombocitopenia são resultado das ligações inespecíficas dos anticorpos anti EIAV às células sanguíneas (eritrócitos e plaquetas) causando o fenômeno de hemólise mediada pelo sistema imune. Os órgãos como o fígado, baço e os rins, em consequência da presença dos macrófagos, apresentam complexos imunes que combinados com a inflamação expõem os danos mais notórios (hepatomegalia, esplenite e glomerulonefrite) (Lima *et al.*, 2022).

1.4. Diagnostico

Devido à ausência de vacina e tratamento para a Anemia Infecciosa Equina, o diagnostico laboratorial é o único instrumento de controle da enfermidade. Como os equídeos infectados permanecem como portadores permanentes do vírus por toda a vida, o diagnostico baseia-se prioritariamente na detecção de anticorpos específicos direcionados às proteínas estruturais do vírus. Embora métodos clássicos como o isolamento viral em cultivo celular e a inoculação em animais susceptíveis sejam descritos na literatura histórica, seu uso na rotina foi descontinuado devido aos custos, complexidade e entraves éticos, dando lugar a métodos sorológicos e moleculares (WOAH, 2019).

A detecção do material genético viral nas amostras de capa de leucócitos confirma a infeção do animal. A WOAH (2019) descreve como o método de Reação em cadeia da polimerase (PCR) identifica a região correspondente ao gene *gag,* tendo como limite inferior a detecção de até 10 copias genômicas do DNA. O Manual ressalta que mutações frequentes no DNA proviral podem causar imprecisões na PCR.

As indicações para o uso deste método diagnostico são para animais com resultados sorológicos contraditórios, animais suspeitos com resultados sorológicos negativos, como método de confirmação dos testes sorológicos ou confirmação precoce antes do desenvolvimento dos anticorpos no animal (WOAH, 2019).

Do mesmo modo, para o diagnostico sorológico a WOAH (2019) recomenda a técnica de ELISA (kit comerciais) para detecção de animais positivos e a confirmação deste mediante a Imunodifusão em Agar Gel (AGID). Os antígenos utilizados nos métodos sorológicos podem ser obtidos a partir de proteínas estruturais recombinantes. O documento do “Manual Terrestre da OIE”, deixa claro que nenhum teste é completamente confiável e sem limitações.

Por meio disto, os animais maiores de 12 meses com resultado sorológico positivo são identificados como portadores do vírus. Animais menores de 12 meses podem ter resultado positivo devido a imunidade materna, precisando de confirmação por diagnostico molecular (WOAH, 2019).

1.4.1. IDGA

O teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), historicamente conhecido como teste de Coggins, consolidou-se desde sua padronização na década de 1970 como a metodologia de referência recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) para o diagnóstico sorológico da Anemia Infecciosa Equina. O ensaio baseia-se no princípio da imunoprecipitação passiva em uma matriz de ágar, na qual o antígeno viral de referência (proteína p26) e o soro do animal são colocados em poços adjacentes e difundem-se radialmente. Caso a amostra contenha anticorpos específicos contra o vírus, o encontro das frentes de difusão resulta na formação de uma linha física e visível de precipitação insolúvel no gel (Coggins, 1972).

Apesar de sua alta especificidade e de seu papel fundamental nos programas oficiais de controle sanitário, o IDGA apresenta limitações analíticas importantes associadas à sua dinâmica biológica. Por ser uma técnica puramente qualitativa e visual, sua sensibilidade analítica é dependente da presença de elevadas concentrações de anticorpos precipitantes no soro, o que pode induzir a resultados falso-negativos em animais com baixos títulos ou em fases precoces da infecção. Adicionalmente, o teste exige um período mínimo de incubação de 24 a 48 horas para a leitura definitiva, além de sofrer com a subjetividade da interpretação visual do operador diante de linhas de precipitação tênues ou de desvios conformacionais nas variantes do vírus de campo (Coggins, 1972).

1.4.2. ELISA

O ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é frequentemente usado como teste complementar devido à sua maior sensibilidade e capacidade de detectar anticorpos nas fases iniciais da infecção. Comumente com o uso de antígenos recombinantes purificados, são desenvolvidos ELISA indireto e o competitivo. No ELISA indireto (iELISA) emprega-se comumente a proteína p26, a gp45 e a gp90, permitindo a detecção de baixos títulos de

anticorpos (Coutinho *et al*., 2013; Nogueira *et al*., 2009). Os imunoensaios oferecem uma alta especificidade e resultados em menor tempo, como diversos estudos o confirmam.

Rosati (2004) desenvolveu um método diagnostico sorológico para três *Lentivirus*, entre eles o EIAV, expressando o antígeno do capsídeo inteiro junto com um epítopo transmembrana imunodominante em uma proteína de fusão única e recombinante. Os resultados demostraram que o uso da proteína de fusão melhora a sensibilidade e a concordância dos testes de diagnostico, especialmente com o teste de IDGA para AIE.

Um trabalho sobre a produção da proteína recombinante rp26 do EIAV em levedura *Pichia pastoris* foi realizado por Coutinho *et al.* (2013) para uso em testes sorológicos. O produto da expressão da proteína concentrado por dialise foi avaliado contra soros equinos padrão, demostrando uma clara distinção entre amostras positivas e negativas no ELISA. No teste IDGA a proteína permitiu a formação de uma única linha de precipitação, demostrando que tem imunorreatividade semelhante à proteína nativa. A especificidade avaliada neste estudo foi alta, sem reações inespecíficas.

Na Itália, Ostuni *et al.* (2025) avaliou o desempenho de um novo iELISA multicepas para detecção de anticorpos contra EIAV comparado com ELISAs comerciais, com o intuito de aprimorar as ferramentas de triagem e superar as limitações dos diagnósticos que dependem de uma única proteína. Assim, foram utilizadas as proteínas p26 do capsídeo e a gp45 da transmembrana, desta última utilizando dupla cepa (Irlanda e Brasil) para aumento da cobertura antigênica. A confiabilidade do comparativo dos três ELISAs demostrou concordância quase perfeita, com um desempenho diagnostico de alta sensibilidade, superior a 95% e especificidade maior a 98%. O iELISA multicepas desenvolvido foi ligeiramente inferior em sensibilidade.

Cursino *et al.* (2018) caracterizou as primeiras sequências genômicas da região promotora 5’ LTR e do exon 1 do gene acessório *tat* obtidas de equídeos sob infecção natural no Brasil. Ao aplicar a técnica de PCR semi-nested (sn-PCR) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), obtiveram 100% de positividade para DNA proviral (23/23) em amostras de cavalos de trabalho na região do Pantanal brasileiro. Assim, o cruzamento dos dados moleculares com os perfis sorológicos demostrou a superioridade analítica da sn-PCR e do teste ELISA (direcionado à proteína gp90) em relação ao teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA – proteína p26), o qual se mostrou limitante ao produzir resultados falso-negativos ou indeterminados em animais assintomáticos.

1.4.3. Teste rápido ou teste *Point-Of-Care*

Uma aplicação do ensaio de ELISA, é o teste rápido ou teste *Point-Of-Care*, um dispositivo que pode se basear no princípio do fluxo lateral para detectar a ausência ou presença de um analito em uma amostra liquida. Compõe-se de uma tira de membrana porosa e capilar, geralmente de celulose ou nitrocelulose, que permite a migração da amostra (Zhang *et al.*, 2024).

No percurso da tira, o analito interage com anticorpos de detecção marcados com partículas de ouro. O complexo resultante migra até o local da linha teste, onde o segundo anticorpo captura o complexo. Como resultado obtêm-se uma banda colorida visível, e uma segunda linha controle que confirma o funcionamento do teste (Zhang *et al.*, 2024).

Seguindo esta metodologia, um tira de teste imunocromatográfica de ouro coloidal (GICG) foi desenvolvida e avaliada por Zhang *et al.* (2024), com o uso de proteínas recombinantes de p26 e gp45 produzias em *E. coli*. O método demostrou ser significativamente mais sensível do que os métodos convencionais como IDGA e ELISAs comerciais (NECVB e IDEXX). A especificidade do teste foi de 100% e não houve reação cruzada com anticorpos específicos para outros patógenos equinos avaliados. No entanto, devido a baixa taxa de coincidência com IDGA, os autores sugerem o seu uso como triagem, seguida da confirmação por ELISA, IDGA e Western Blotting.

Wang *et al.* (2025), recentemente publicou a manufatura e validação de uma nova tira imunocromatográfica de fluxo lateral tipo sanduiche, aplicando ouro coloidal para o diagnostico rápido de anticorpos contra EIAV. No experimento foi utilizada uma proteína de fusão da proteína p26 e da gp90 expressa em *E. coli*, buscando aumentar a especificidade e sensibilidade do método, e obtendo o resultado em 10 minutos. O dispositivo final apresenta uma sensibilidade relativa de 90.43%, especificidade de 100% e acurácia relativa de 91.41% nos soros de campo testados.

1.5. Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos são polímeros de aminoácidos de cadeia curta, entre 2 e 50 resíduos, obtidos por métodos químicos, construídos de forma direcionada, um por um. Esses reproduzem uma região específica de uma proteína, sendo sequencias lineares ou conformacionais, como por exemplo os epítopos virais. A principal metodologia utilizada para a obtenção dessas moléculas é a Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPPS – *Solid-Phase Peptide*

Synthesis) desenvolvida por Robert Bruce Merrifield em 1963 (Merrifield, 1969), Prêmio Nobel de Química de 1984.

Entre as vantagens do uso de peptídeos sintéticos, encontrasse a redução de custos de produção, a segurança na não manipulação do vírus, a capacidade de controle da pureza e reprodutibilidade, a versatilidade química, as modificações pós-síntese, e a estabilidade e facilidade de armazenamento (Behrendt, 2016).

Assim, obtém-se uma sequência de aminoácidos especifica com alta homogeneidade e ausência de contaminantes biológicos como proteínas de origem celular, ácidos nucléicos ou endotoxinas. Somado ao anterior, é possível incorporar caudas especificas, como a cauda de poli-histidina, em posições estratégicas planejadas para promover a imobilização orientada do peptídeo em superfícies sólidas (Schraml *et al.*, 2026).

Reconhecendo as características das proteínas que conformam o vírus e seu potencial imunogênico, é possível avaliar e identificar epítopos antigênicos, como realizado por Pinheiro (2022), determinando cadeias curtas de aminoácidos funcionais para uso dentro do ensaio de ELISA. Assim, a síntese destes peptídeos oferece uma porção especifica da proteína natural com alta pureza, minimizando as reações cruzadas, com uma reprodutibilidade e padronização controlada, facilitando a manipulação e o transporte dos mesmos (Russi *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a validação de antígenos sintéticos em plataforma ELISA estabelece a base molecular essencial para o futuro desenvolvimento de testes *point-of-care*, ferramenta crucial para a tomada de decisão imediata durante a vigilância ativa em áreas de criação extensiva, como o Pantanal. A relevância dessa abordagem fundamenta-se na indisponibilidade de testes rápidos nacionais validados e nas restrições técnicas associadas à importação de insumos comerciais. Kits estrangeiros fundamentam-se predominantemente em sequências de isolados de referência que não refletem a diversidade genética das linhagens e isolados de campo de EIAV circulantes no Brasil. Essa divergência molecular acarreta mutações pontuais em epítopos críticos, elevando o risco de escape diagnóstico e comprometendo diretamente a sensibilidade e a especificidade dos ensaios no cenário epidemiológico nacional.

2. Capítulo 2: Desenvolvimento, Validação Diagnóstica e Aplicabilidade do Ensaio iELISA

2.1. Objetivos

- Objetivo geral

Desenvolver, padronizar e validar um ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (iELISA) baseado na construção biotecnológica de peptídeos sintéticos quiméricos orientados, visando à otimização do sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina em amostras de soros equinos.

- Objetivos específicos

a. Projetar o desenho biotecnológico de antígenos quiméricos lineares, efetuando a fusão de um fragmento conservado de 28 aminoácidos da porção transmembrana (TM) da gp45 com o peptídeo P42, associada à adição de uma cauda de Histidina (His-*tag*).
b. Padronizar as condições físico-químicas e cinéticas do ensaio iELISA utilizando antígenos quiméricos, otimizando os critérios de sensibilização, bloqueio, diluição de soros e do conjugado utilizando soros padrão positivo e negativo.
c. Avaliar os parâmetros de desempenho analítico e diagnóstico da plataforma desenvolvida, determinando os índices de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.
d. Validar a aplicabilidade do ensaio com amostras de diferentes origens geográficas e perfis epidemiológicos, estabelecendo o ponto de corte (*cutoff*) definitivo alinhado aos critérios de biossegurança e defesa sanitária animal.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Amostras de soro equino

A coleta de sangue equino e seu posterior uso está amparado pelo Protocolo No 195/2012-CEU do projeto "Anemia Infecciosa Equina no Pantanal brasileiro: caracterização do agente, diagnóstico molecular, avaliação de práticas de manejo e modelagem quantitativa" aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus Botucatu.

Assim, o material biológico foi coletado como parte de um projeto desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) na região do Pantanal brasileiro.

A escolha das amostras de soro para a validação da padronização foi determinada pelos resultados de diagnostico obtidos anterior ao projeto, sendo que 68 amostras possuem os resultados tanto dos testes sorológicos (IDGA e ELISA gp90) quanto dos moleculares (PCR seminested e qPCR). O ELISA utilizado detecta a IgG contra a glicoproteína do envelope gp90 pelo kit comercial VETLISA AIE IgG (Bioclin®), já a detecção de DNA proviral foi realizada por *Nested* e qPCR quantitativo, segundo os protocolos validados por Malossi *et al*. (2020). O restante só apresenta resultados sorológicos para comparação, totalizando 458 amostras de soro (Tabela 1).

A caracterização do status sorológico de referência do painel foi realizada pela equipe técnica especializada da EMBRAPA Pantanal, empregando-se a técnica oficial de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) por meio do kit diagnostico comercial autorizado (Laboratórios Bruch®), contendo a proteína estrutural p26 do EIAV e o soro controle positivo de referência.

Tabela 1 Grupo de equinos e número de amostras positivas e negativas segundo o resultado do IDGA.

Grupo de equinos	**Região de origem**	**Positivos**	**Negativos**
Potro	Pantanal	4	24
Grupo CG	Pantanal	23	46
7coletas	Pantanal	132	113
FMVZ2026	Botucatu	0	31
Nhumirim25	Pantanal	0	85
	Total	**159**	**299**
	Total geral	**458**	

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

- Soros padrão

Para padronização foi escolhido um soro sabidamente positivo, identificado com o nome de Malagueta. Este cavalo foi considerado assintomático ao longa da vida, mas definido como positivo nos testes de sorodiagnóstico e biologia molecular. A amostra originaria de Pocone - Mato Grosso, foi proveniente de um projeto de EMBRAPA em parceria com a UFMT.

Adicionalmente foi determinado como soro sabidamente negativo, um pool de soros de animais procedentes do Núcleo de conservação do cavalo pantaneiro da fazenda Nhumirim, os quais são monitorados clínica e sorologicamente em coletas anuais consecutivas. Esta propriedade localiza-se na sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul - MS, e se mantem com o apoio da ABCCP (Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros) e da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Santos *et al*. 2020).

- Soros para teste de aplicabilidade

Os soros utilizados nesta etapa são procedentes de duas regiões, do Pantanal e de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. As 80 amostras do Pantanal foram coletadas a partir do projeto desenvolvido pela EMBRAPA. As 84 amostras procedentes do Sul, foram tratadas *in loco*, e formam parte da tese de doutorado de José Conrado dos Santos Jardim, pertencente ao Laboratório de virologia da UNIPAMPA – Campus Uruguaiana.

Destas últimas, foi utilizado um primer painel de 32 amostras seriadas, correspondentes a 8 animais. Esses animais apresentavam um perfil sabidamente divergente, caracterizado pela negatividade persistente no teste sorológico oficial de referência (IDGA), porém com detecção intermitente do material genético proviral via PCR em diferentes dias de coleta. Para cada animal, foram selecionadas quatro amostras temporais (duas PCR-positivas e duas PCR-negativas).

O segundo grupo avaliado no município de Uruguaiana, RS, foi composto por um painel de 36 amostras de campo provenientes de animais com histórico de negatividade no teste de referência (IDGA). Por fim, avaliou-se um terceiro painel em Uruguaiana, RS, composto por 16 amostras de campo previamente diagnosticadas como reagentes por IDGA. O objetivo desta amostragem foi ratificar a robustez e a especificidade do ELISA padronizado numa população de outra região do país.

2.2.2. Peptídeos quiméricos sintéticos

Estudos conduzidos pela EMBRAPA sobre predição de epítopos de célula B em proteínas estruturais do Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) a cargo de Pinheiro (2022), em dados não publicados, determinou várias sequências de aminoácidos promissoras. Foi avaliado o funcionamento antigénico de 5 das sequencias, utilizando-as como peptídeos sintéticos em ensaios de ELISA, determinando reatividade positiva só num dos peptídeos, nomeado de P42, por causa dos 42 aminoácidos que o compõem.

Na dissertação de mestrado da Alencar (2024), desenvolveu-se um protocolo de iELISA utilizando o peptídeo P42, oferecendo resultados promissores para detecção de anticorpos de equinos contra EIAV. Com o objetivo de ampliar a sensibilidade diagnóstica do imunoensaio, foram desenhados *in sílico* duas construções quiméricas contendo uma sequência imunodominante de 28 aminoácidos derivada da transmembrana (TM) do EIAV (KERQKIEETFNLIGCVERSHTFCHTGLE; GeneBank: QIC50013.1; Rosati et al., 2004), combinada à sequência de 42 aminoácidos do peptídeo P42 (Pinheiro, 2022; Alencar, 2024). Ambos os construtos foram sintetizados contendo a cauda 6x His no extremo C-terminal.

As moléculas quiméricas diferem estritamente no arranjo topológico das suas sequencias de epítopos:

- P42-TM+His: Apresenta o segmento do peptídeo P42 na região N-terminal e a sequência TM na porção intermediaria, antecedendo a cauda 6x His C-terminal.
- TM-P42+His: Apresenta a sequência TM na região N-terminal e o segmento do peptídeo P42 na porção intermediaria, antecedendo a cauda 6x His C-terminal.

O processo de síntese foi contratado pelo grupo GenOne Biotech, certificando a pureza e qualidade para uso como antígeno nos ensaios de ELISA (análise cromatográfica por HPLC e caracterização por Espectrometria de Massas), entregue liofilizado para diluição. Os peptídeos quiméricos foram utilizados em partes iguais como pool, constituindo assim o antígeno do iELISA.

2.2.3. Protocolo geral do Ensaio iELISA Indireto Baseado em Peptídeo Sintético Quimérico

O ensaio imunoenzimático indireto para a pesquisa de anticorpos anti- EIAV foi executado em conformidade com as diretrizes internacionais da Organização Mundial de Saúde

Animal (WOAH, 2019) e as recomendações de padronização de imunoensaios propostas por Crowther (1995).

As soluções de trabalho foram preparadas conforme especificado a seguir:

- Tampão de Sensibilização: Tampão Carbonato-Bicarbonato (0.05M, pH 9.6; TCB);
- Tampão de Lavagem e Diluição: Solução Salina Tamponada com Fosfato acrescida de Tween-20 a 0.05% (0.01M, pH 7.4; PBST 0,05%);
- Substrato Cromógeno: Solução pronta para uso de Tetrametilbenzidina (TMB *Single Solution*, Invitrogen ™);
- Solução de Interrupção (*Stop Solution*): Ácido Clorídrico (HCl, 2M);
- Solução de bloqueio: SuperBlock™ (*Blocking Buffer*, Thermo Fisher Scientific™).

- Condicionamento da Placa de Diluição de Amostras (*Deepwell*)

Para minimizar a adsorção inespecífica de imunoglobulinas às paredes de plástico durante a etapa de diluição de soros, realizou-se o pré-bloqueio de placas *Deepwell* de polipropileno de 96 poços (2,2 ml/poço). Preencheram-se os poços integralmente com solução de leite em pó desnatado a 10% em TCB, seguido de incubação em câmara úmida a 4°C por 18 horas. Posteriormente, as placas foram submetidas ao ciclo de lavagens com água ultrapura, secas a 37°C e mantidas em dessecação até o momento do fracionamento das amostras.

- Sensibilização da Fase Sólida (Adsorção do Antígeno)

A sensibilização foi realizada em placas de microtitulação de poliestireno de alta capacidade de ligação e fundo chato (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific™). Cada poço recebeu 100 µl da solução dos peptídeos quiméricos sintéticos diluídos em TCB nas faixas de concentração e combinações em teste. As placas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 18 horas.

- Bloqueio dos Sítios Reativos Remanescentes

Após o período de adsorção do antígeno, aspirou-se o conteúdo da placa e realizou-se a lavagem automatizada dos poços (3 ciclos de 300 µl/poço de PBST 0,05%). O excesso de umidade foi removido por inversão sobre papel absorvente. Imediatamente após a lavagem, dispensaram-se 200 µl/poço da solução de bloqueio sob avaliação (formulada em PBST 0,05%)

com o intuito de saturar os sítios de ligação remanescentes no poliestireno. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora.

- Processamento e Incubação das Amostras e Controles

As amostras de soro equino, previamente clarificadas por centrifugação a 10.000 x *g* por 10 minutos, foram submetidas às diluições de trabalho na solução diluente, utilizando-se a placa *Deepwell* pré-bloqueada.

Decorrido o tempo de bloqueio da placa de reação e realizada a lavagem (3 ciclos com PBST 0,05%), adicionaram-se 100 µl/poço das amostras e dos controles (positivo e negativo em duplicata, além dos poços de branco específico sem antígeno). A placa foi incubada a 37°C sob os tempos em avaliação.

- Incubação do Conjugado Enzimático

Finalizada a incubação da amostra e repetido o ciclo de lavagem (3 ciclos com PBST 0,05%), adicionaram-se 100 µl/poço do conjugado anti-IgG equina conjugado à peroxidase (HRP), diluído na solução diluente sob teste nas proporções sob avaliação. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora.

- Revelação Cromogênica e Leitura

Após a lavagem final da placa (3 ciclos com PBST 0,05%), a reação imunoenzimática foi revelada pela adição de 100 µl/poço de substrato cromógeno TMB. A placa foi mantida sob agitação suave, protegida da luz, à temperatura ambiente por 15 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 50 µl/poço de solução de parada (HCl 2M). A leitura dos valores de absorbância (Densidade Óptica – DO) foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 450nm.

2.2.4. Padronização e otimização do Ensaio iELISA

Com o intuito de estabelecer as condições ideais de reatividade e maximizar a relação sinal/ruído do ensaio, realizou-se a otimização sistemática dos parâmetros físico-químicos do procedimento. Para o delineamento dos testes e acompanhamento da sensibilidade diagnóstica preliminar, utilizou-se como controle positivo o soro do equídeo “Malagueta” e, como controle

negativo, um *pool* de soros equinos sabidamente não reagentes provenientes da Fazenda Nhumirim (Pantanal, MS), caracterizados previamente pelo teste de referência da Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).

A estratégia experimental envolveu a avaliação de variáveis críticas da reação: solubilização e concentração dos peptídeos quiméricos, composição do tampão de sensibilização, agentes de bloqueio, diluentes de amostra e conjugado, além do tratamento e titulação das amostras de soro e dos anticorpos anti-IgG conjugados a peroxidase (HRP).

2.2.4.1. Sensibilização e adsorção do antígeno na fase sólida

A etapa de sensibilização foi otimizada mediante a avaliação dos métodos de reconstituição dos peptídeos, da interferência do tampão de sensibilização, da concentração de antígeno por poço e do arranjo espacial da placa para mitigação de reações inespecíficas.

- Reconstituição dos peptídeos

Para os peptídeos quiméricos liofilizados (1 mg por frasco), avaliaram-se três estratégias de reconstituição à concentração final de 1 mg/ml, visando prevenir a degradação proteolítica e a agregação molecular:

- Estratégia A: Solubilização em 1 ml de água ultrapura;
- Estratégia B: Solubilização em 1 ml de tampão de bloqueio comercial SuperBlock™ (*Blocking Buffer*, Thermo Fisher Scientific™);
- Estratégia C: Solubilização em 900 µl SuperBlock™ acrescido de 100 µl coquetel Inibidor de protease cOmplete™ Mini EDTA-free (Sigma-Aldrich, 10x) (denomina-se SB+In).

Em todas as abordagens, os tubos foram mantidos sob homogeneização constante por 30 minutos. As soluções de estoque foram alíquotadas e armazenadas a -80°C, e as alíquotas de trabalho mantidas a -20°C até o momento do uso.

- Tampão de sensibilização

Utilizou-se o Tampão Carbonato-Bicarbonato (TCB pH 9,6) como veículo primário para promover a adsorção por interações hidrofóbicas entre os peptídeos e o poliestireno das placas de microtitulação.

A fim de avaliar a redução do ruído de fundo (*background*) decorrente da adsorção inespecífica de imunoglobulinas, testou-se a suplementação do TCB com volumes crescente de SuperBlock™ (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 100 µl/ml de TCB) no momento do revestimento dos poços.

- Titulação da Concentração do Antígeno.

Para identificar a densidade ideal de antígenos imobilizados, testaram-se as massas de 10, 25, 50, 100 e 200 ng de peptídeo quimérico por poço (100 µl/poço), diluídos no tampão de sensibilização selecionado.

- Delineamento e arranjo espacial da placa de reação

Para isolar o sinal de ligação específica antígeno-anticorpo da adsorção inespecífica da matriz sérica à fase sólida, estabeleceu-se um delineamento em duplicata para cada amostra (
Figura A1):

- Poços Teste: Sensibilizados com o peptídeo quimérico diluído em TCB suplementado.
- Poços Branco Específico (Controle da Matriz Sérica): Incubados exclusivamente com o tampão de sensibilização (sem antígeno).

O valor real da absorbância de cada amostra foi obtido pela subtração da Densidade Óptica (DO) do poço teste, da DO do seu respectivo poço branco ($DO_{líquida} = DO_{teste} - DO_{Branco}$). Adicionalmente, reservou-se o poço H11 de cada placa como controle do substrato cromógeno (controle TMB), sensibilizado com soro equino na diluição de $1x10^5$, para validar a atividade enzimática do ensaio.

2.2.4.2. Avaliação das Soluções e Condições de Bloqueio

Com o objetivo de saturar os sítios de ligação remanescentes no poliestireno e mitigar o ruído de fundo, foram testadas diferentes soluções de bloqueio formuladas em Tampão Fostato Salino acrescido de Tween-20 a 0,05% (PBST 0,05%).

- Leite em pó desnatado (LPD) nas concentrações de 1% e 5% (m/v);
- Ovalbumina (OVA) nas concentrações de 1% e 5% (m/v);
- Tampão comercial SuperBlock™ na proporção 1:10 (v/v).

As soluções foram aplicadas no volume de 200 µl/poço com incubação de 1h a 37°C

2.2.4.3. Processamento e Incubação das Amostras de Soro

- Diluentes de Amostra e Titulação dos Soros

As amostras de soro (controle positivo e negativo) foram submetidas a diluições seriadas de razão 2, em leite em pó desnatado a 5% em PBST 0,05%, abrangendo a faixa de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, aplicadas no volume de 100 µl/poço.

- Avaliação do tempo de Incubação da Amostra

Com o objetivo de definir o tempo ideal para a formação estável do imunocomplexo antígeno-anticorpo sem promover a adsorção inespecífica de imunoglobulinas, testaram-se os tempos de incubação de 15, 30 e 60 minutos a 37°C em câmara úmida.

2.2.4.4. Titulação do Conjugado Enzimático

Para a revelação do imunocomplexo, avaliaram-se dois anticorpos anti-IgG equinas conjugados à peroxidase (*Horseradish Peroxidade* – HRP):

- IgG anti-IgG equina produzida em coelho (Rabbit anti-Equine IgG-HRP);
- IgG anti-IgG equina produzida em cabra (Goat anti-Equine IgG-HRP).

Os conjugados foram reconstituídos e preservados em glicerol tamponado (1:1, v/v) a -20°C, conforme as especificações dos fabricantes. Para os testes de otimização, aplicaram-se as diluições de 1:1.000, 1:5.000 e 1:10.000 para o conjugado de coelho, e 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000 para o conjugado de cabra. As diluições do conjugado foram preparadas utilizando as soluções diluentes testadas na etapa de diluição de soros (LPD 1% e 5%, OVA 1% e 5%, e SuperBlock™ 1:10).

2.2.5. Validação do iELISA

Para a validação do ensaio iELISA otimizado e determinação dos parâmetros de acurácia diagnostica, utilizou-se um painel constituído por 458 amostras de soros equinos. Os resultados gerados por esses ensaios consolidados serviram como referência para a avaliação da sensibilidade, especificidade e concordância diagnóstica do iELISA baseado nos peptídeos quiméricos sintéticos desenvolvidos neste trabalho.

2.2.6. Processamento dos Dados e Análise Estatística

- Compilação e Controle de Qualidade Analítica

Após a leitura espectrofotométrica a 45nm, os dados brutos de absorbância (DO) foram estruturados em planilhas do software Microsoft Excel®. Todas as amostras de soro e controles foram testadas em duplicata.

Para a avaliação da precisão intra-ensaio e acurácia da pipetagem, calculou-se o Coeficiente de Variação (CV%) entre as réplicas de cada poço:

$$\mathrm{CV\%} = \left(\frac{\mathrm{S}}{\overline{\mathrm{X}}}\right) \times 100$$

Em que *s* representa o desvio-padrão e $\overline{\mathrm{X}}$ a média das leituras das duplicatas.

Adotou-se o critério de aceitabilidade analítica de CV ≤ 12%. Amostras com variação superior a este valor foram reavaliadas. Para a interpretação de amostras com valores de absorbância próximos ao ponto de corte (zona cinzenta), a variação entre réplicas foi analisada rigorosamente para evitar classificações Falso-Positivas ou Falso-Negativas.

- Absorbância Corrigida

A eliminação da adsorção inespecífica promovida pela matriz sérica em cada amostra foi obtida por meio da subtração pareada do poço teste (sensibilizado com antígeno) pelo seu respectivo poço branco específico (sensibilizado exclusivamente com o tampão de revestimento TCB suplementado):

$$\mathrm{DO_{corrigida}} = \overline{\mathrm{X}}_{\mathrm{DO\ teste}} - \overline{\mathrm{X}}_{\mathrm{DO\ branco}}$$

- Normalização dos dados: Análise Qualitativa e Cálculo do Índice de Positividade (IP)

Para mitigar a variação inter-ensaio e padronizar as flutuações de leitura entre diferentes placas de microtitulação, os valores de $DO_{corrigida}$ de cada amostra foram normalizados em Índice de Positividade (IP), relacionado a reatividade individual à amplitude máxima do ensaio estabelecida pelos controles interno positivo e negativo:

$$IP = \frac{DO_{amostra} - DO_{controle\ negativo}}{DO_{controle\ positivo} - DO_{controle\ negativo}}$$

Nota: Todas as variáveis da equação correspondem aos valores de $DO_{corrigida}$. O numerador expressa a absorbância específica da amostra descontado o ruído de fundo, e o denominador define a amplitude máxima de reatividade do ensaio.

- Validação diagnostica e Análise da Curva ROC

A avaliação da capacidade discriminatória do iELISA baseado em peptídeos quiméricos frente ao teste de referência oficial (IDGA) foi conduzida por meio da Análise da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), utilizando-se os valores de IP obtidos no painel das 458 amostras de equídeos.

O desempenho diagnostico do imunoensaio foi determinada pela estimativa da Área Sob a Curva (AUC). Testou-se a hipótese nula (H_0) de ausência de capacidade discriminatória (AUC = 0,5) contra a hipótese alternativa (H_1) da capacidade discriminatória superior ao acaso (AUC > 0,5), adotando-se um nível de significância de 5% ($p<0,05$) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

- Determinação do Ponto de Corte (*cutoff*)

O ponto de corte (*cutoff*) do ensaio de iELISA foi definido no ponto da curva ROC que apresentou o maior valor do Índice de Youden (J).

$$J = \text{Sensibilidade} + \text{Especificidade} - 1$$

Com os valores de Sensibilidade e Especificidade expressos na forma decimal (0 a 1).

A coordenada da Curva ROC correspondente ao maior valor absoluto do Índice de Youden (J_{max}) definiu o ponto de corte buscando maximizar conjuntamente a sensibilidade e a especificidade diagnósticas em comparação ao IDGA.

As análises estatísticas e a confecção dos gráficos diagnósticos foram executadas no software GraphPad Prism (versão 11.0.0, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA).

2.2.7. Teste de Aplicabilidade

Uma vez estabelecidos os parâmetros diagnósticos ideais e o ponto de corte definitivo do ensaio, buscou-se avaliar a aplicabilidade prática do ELISA desenvolvido em condições reais de campo. Para isso, foram testados dois painéis independentes de amostras provenientes de dois grupos de propriedades rurais, amostras de 2026 da Fazenda Nhumirim da região do Pantanal - MS e amostras de diferentes propriedades da cidade de Uruguaiana – RS, as quais não foram incluídas na amostragem inicial de cálculo da Curva ROC.

O painel de amostras pertencentes ao banco de espécimes do Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Pampa (UNIPAMPA) – Campus Uruguaiana foram processadas pela equipe da referida instituição, o Prof. Dr. Mario Celso Sperotto Brum e estudante Augusto Cesar Wyrepkowski, aplicando o iELISA *in loco*, o qual foi viabilizado por meio do envio de kits diagnósticos previamente montados e providenciados pelo nosso laboratório.

O objetivo desta etapa foi verificar o comportamento do teste frente à variabilidade biológica de rotina e testar a concordância prática com o IDGA em diferentes cenários de prevalência.

2.3. Resultados

2.3.1. Caracterização dos Peptídeos Sintéticos P42-TM+His e TM-P42+His

A análise cromatográfica por HPLC e a caracterização por Espectrometria de Massas atestaram a integridade estrutural correspondentes aos projetos *in sílico*. Os patamares de pureza obtidos foram de 76% para a quimera P42-TM+His e 77% para a quimera TM-P42+His.

2.3.2. Otimização e Padronização das Condições Reacionais do iELISA

Avaliaram-se sistematicamente os parâmetros físico-químicos e cinéticos do ensaio. As condições otimizadas foram consolidadas nos Procedimentos Operacionais Padrão completo e simplificado (Apêndice A e Apêndice B).

- Sensibilização e Adsorção do Antígeno

- Veículo de Solubilização e Estabilidade

Observou-se que a reconstituição dos peptídeos liofilizados em água ultrapura apresentou perda progressiva de reatividade após ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento (-80°C/-20°C). A incorporação do tampão comercial SuperBlock™ acrescido do coquetel inibidor de proteases cOmplete™ Mini EDTA-free (10x) (solução SB+In) conferiu maior estabilidade estrutural aos peptídeos, mantendo a integridade e a reprodutibilidade dos valores de absorbância. Assim, definiu-se a solução SB+In como veículo padrão para o armazenamento e alíquotas de trabalho dos antígenos quiméricos.

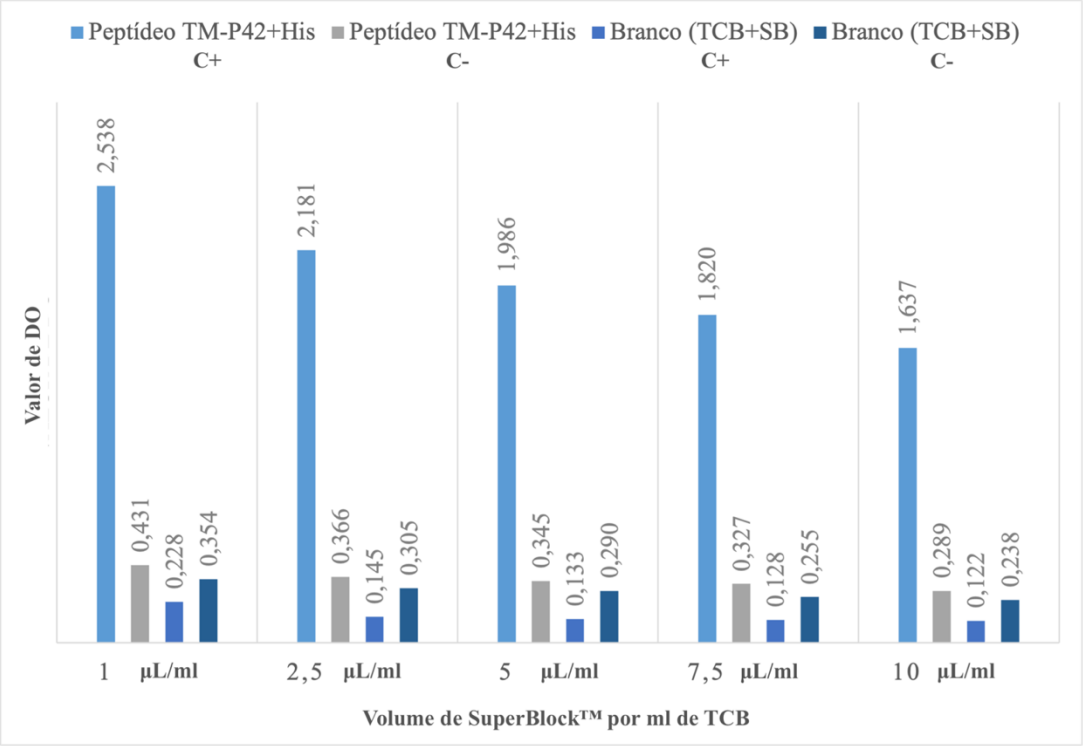
- Suplementação do Tampão de sensibilização

A avaliação da suplementação do Tampão Carbonato-Bicarbonato (TCB) com o agente bloqueador SuperBlock™ indicou interferência na imobilização do peptídeo na fase sólida, resultando em redução do sinal do ensaio (Figura 1).

Nos poços revestidos com a quimera TM-P42+His, o aumento da concentração de SuperBlock™ no tampão de sensibilização de 1,0 µL/ml para 10,0 µL/ml resultou em um

declínio progressivo do sinal de absorbância do controle positivo, reduzindo a leitura de DO = 2,538 para DO = 1,637. Embora o incremento do bloqueador no TCB tenha promovido uma modesta diminuição do ruído de fundo nos poços branco (de DO = 0,228 para 0,122 no C+), a perda de sinal específico reduziu a amplitude analítica do ensaio.

Figura 1 - Efeito do incremento de SuperBlock™ no tampão de sensibilização (TCB) sobre o sinal no iELISA utilizando o peptídeo TM-P42+His.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Valores de absorbância (Densidade Óptica — DO_{450nm}) para o Controle Positivo (C+) e Controle Negativo (C-) em poços sensibilizados com a quimera TM-P42+His e poços sem antígeno (TCB+SB), utilizando o Tampão Carbonato-Bicarbonato (TCB) suplementado com volumes crescentes de SuperBlock™ (1,0 a 10,0µL/ml).

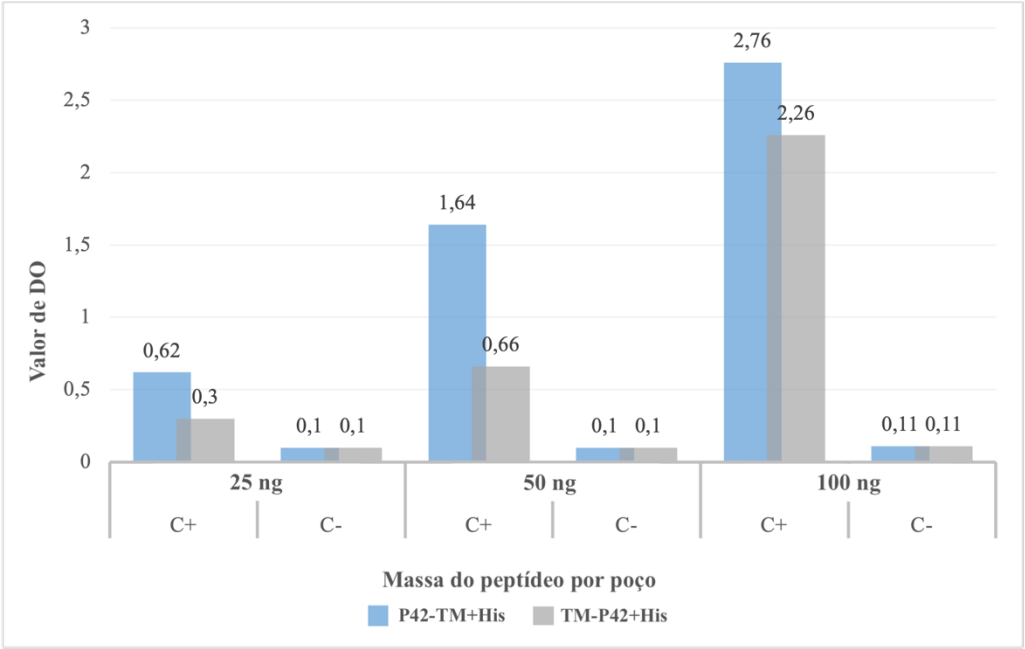
Desta forma, a proporção de 1,0 µL de SuperBlock™ por ml de TCB consolidou-se como a condição ideal de sensibilização, garantindo a maximização do sinal específico e a preservação da capacidade de adsorção da molécula peptídica ao poliestireno.

- Titulação da Concentração Antigênica e Efeito do *Pool* Quimérico.

A avaliação da massa peptídica revelou uma curva de adsorção dose-dependente na faixa de 25 a 100 ng/poço (Figura 2). A partir de 100 ng/poço (1 µg/ml), o sinal de absorbância

do controle positivo atingiu um patamar constante (platô de saturação), sem ganho adicional na relação sinal/ruido (CP/CN) com a dose de 200 ng/poço.

Figura 2 - Efeito da concentração dos peptídeos quiméricos sintéticos (P42-TM+His e TM-P42+His) na absorbância dos soros controle positivo (C+) e negativo (C-) no iELISA.

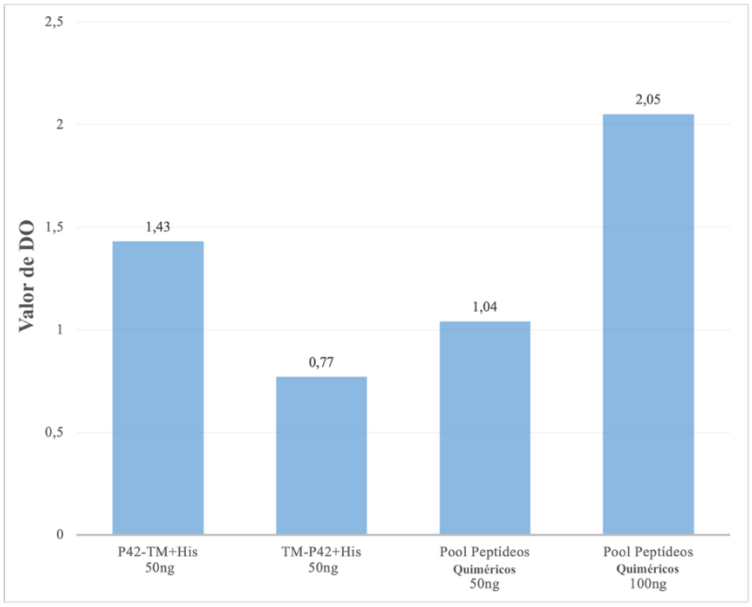


Fonte: Elaborado pela autora (2026)
Valores de absorbância (Densidade Óptica — DO_{450nm}) obtidos para os peptídeos P42-TM+His (barras azuis) e TM-P42+His (barras cinzas) nas massas de 25, 50 e 100 ng/poço.

A análise da relação Sinal/Ruído (CP/CN) demonstrou um incremento progressivo em função do aumento da massa peptídica. Para a quimera P42-TM+His, a razão CP/CN elevou-se de 6,20 (25 ng) para 16,40 (50 ng), atingindo o pico de 25,09 na massa de 100 ng/poço. De forma análoga, a quimera TM-P42+His apresentou sua maior amplitude analítica a 100 ng/poço, alcançando razão CP/CN de 20,54. Esses achados confirmaram a massa de 100 ng/poço como a condição ideal para maximizar a resolução do sinal específico frente ao ruído de fundo basal (DO $\leq$ 0,11).

Individualmente, a quimera P42-TM+His apresentou maior reatividade frente ao soro positivo do que a construção TM-P42+His. Contudo, a combinação equimolar de ambas as quimeras (*Pool* 1:1, totalizando 100 ng/poço) resultou em um efeito aditivo de absorbância (DO = 2,05), elevando a razão CP/CN para 15,76 (Figura 3). Desta forma, definiu-se a utilização do *Pool* dos peptídeos quiméricos na massa total de 100 ng/poço para a sensibilização.

Figura 3 - Avaliação comparativa da reatividade imunoenzimática entre os peptídeos quiméricos isolados (50 ng) e as formulações em *Pool* (50 ng e 100 ng) no iELISA.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)
Valores de absorbância (Densidade Óptica — DO_{450nm}) obtidos para o Controle Positivo frente às quimeras isoladas P42-TM+His (50 ng/poço) e TM-P42+His (50 ng/poço), e às misturas equimolares (*Pool* 1:1) nas massas totais de 50 ng/poço (25+25 ng) e 100 ng/poço (50+50 ng).

- Correção da Adsorção Inespecífica (Desenho do Branco Específico)

Devido à marcante reatividade inespecífica observada nas amostras de soro equino, a estratégia de pareamento individual (poço teste sensibilizado vs. poço branco sem antígeno) mostrou-se indispensável. A subtração matemática ($DO_{corrigida} = DO_{teste} – DO_{branco}$) eliminou as variações de fundo individuais, permitindo mensurar a ligação imunológica real de cada amostra.

A análise preliminar das matrizes séricas provenientes das diferentes regiões e grupos do estudo (como Potros, Fazenda Nhumirim, FMVZ e Grupo CG) revelou uma elevada frequência de ligação inespecífica de imunoglobulinas diretamente à fase sólida. Como demonstrado na

Tabela *2*, amostras não reagentes (como os animais 388 e 481 do Nhumirim) apresentaram leituras de absorbância brutas elevadas nos poços sensibilizados com antígeno (DO = 0,49 e 0,61, respectivamente).

Tabela 2 - Exemplificação do efeito da correção por pareamento com Branco Específico na eliminação do ruído de fundo em soros de equídeos.

Grupo/origem	Animal	DO Poço teste (antígeno)	DO Poço branco (sem antígeno)	DO corrigida
Potro	603	0,71	0,55	0,16
	779	0,66	0,356	0,304
Grupo CG	1513	0,3	0,21	0,09
	8990	4	1,3	2,7
	9214	4,07	1,39	2,68
Nhumirim	388	0,49	0,47	0,02
	41	0,56	0,49	0,07
	481	0,61	0,54	0,07
FMVZ	226.351	0,81	0,71	0,1
	Rosilha	0,38	0,32	0,06

Fonte: Elaborado pela autora (2026)
Valores expressos em absorbância (DO_{450nm}).

- Bloqueio dos Sítios Reativos Remanescentes

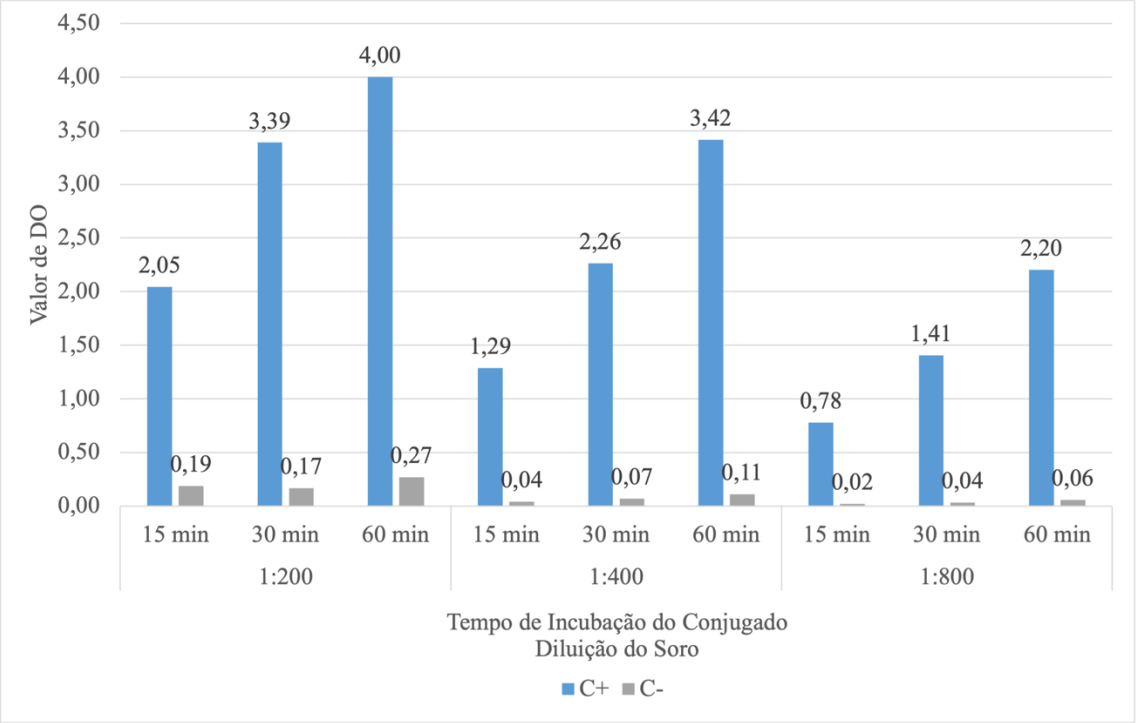
A avaliação dos reagentes de bloqueio revelou que formulações contendo proteínas de origem bovina (como o Leite em pó desnatado e a Albumina de soro bovina) mantiveram reação cruzada inespecífica acentuada com os anticorpos heterofilos do soro equino.

A ovalbumina (OVA) a 5% em PBST 0,05% apresentou o melhor desempenho analítico, promovendo o bloqueio efetivo da fase sólida e reduzindo os valores de absorbância do controle negativo e dos poços brancos para níveis inferiores da DO = 0,2. Estabeleceu-se a Ovalbumina a 5% (200 µl/poço, 1 h a 37°C) como a condição padrão de bloqueio.

- Otimização de diluição de soro

Na titulação seriada dos soros (1:50 a 1:800), em leite em pó desnatado a 5% em PBST 0,05%, observou-se que diluições inferiores a 1:200 geram elevado ruído de fundo. A avaliação conjunta da titulação seriada do soro (1:200, 1:400 e 1:800) e da cinética de incubação do conjugado acoplado à peroxidase (15, 30 e 60 minutos) está representada na Figura 4 a continuação.

Figura 4 - Titulação seriada do soro equino (1:200, 1:400 e 1:800) e cinética de incubação do conjugado enzimático (15, 30 e 60 min) no iELISA.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Valores de absorbância (Densidade Óptica — DO_{450nm}) obtidos para o Controle Positivo (C+, colunas azuis) e Controle Negativo (C-, colunas cinzas) em função da variação do tempo de incubação do conjugado e da diluição da amostra sérica.

A diluição de soro 1:200 exibiu elevada absorbância no controle positivo em todos os tempos, porém acompanhada por maior reação inespecífica de fundo no controle negativo (DO = 0,17 a 0,27). Na diluição 1:800, embora o ruído de fundo tenha permanecido baixo (DO ≤ 0,06), observou-se menor amplitude do sinal do controle positivo nos tempos mais curtos.

A diluição de soro de 1:400 com tempo de incubação da amostra de 15 minutos com agitação de 400RPM estabeleceu a condição ideal, permitindo o rápido acoplamento específico dos anticorpos primários sem favorecer interações inespecíficas da matriz sérica.

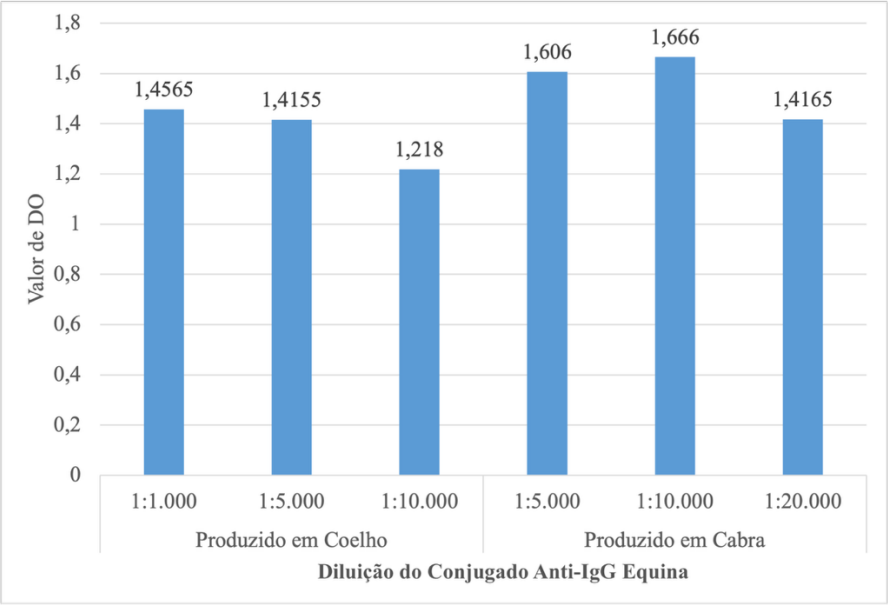
- Titulação do Conjugado Enzimático

A seleção e a padronização do anticorpo anti-IgG equina conjugado à peroxidase (HRP) foram conduzidas avaliando-se duas espécies produtoras (coelho vs. cabra) em suas respectivas faixas de titulação de trabalho (Figura 5).

O conjugado produzido em cabra (*Goat anti-Equine IgG-HRP*) demonstrou desempenho analítico superior em relação ao produzido em coelho (*Rabbit anti-Equine IgG-HRP*), apresentando maiores patamares de absorbância em todas as diluições avaliadas. Para a imunoglobulina produzida em cabra, o incremento da diluição de 1:5.000 (DO=1,606) para 1:10.000 promoveu a máxima amplitude do sinal de absorbância frente ao controle positivo (DO = 1,666). A diluição de 1:20.000 demonstrou declínio no sinal reacional (DO =1 ,4165). De forma análoga, para o conjugado produzido em coelho, a diluição de 1:10.000 resultou em redução expressiva da reatividade (DO = 1,218).

A incubação do conjugado por 60 minutos proporcionou a máxima amplificação do sinal no controle positivo (DO = 3,42) mantendo o ruído de fundo baixo no controle negativo (DO = 0,11; Razão C+/C- = 31,09) (Figura 4). A solução diluente ideal para o conjugado foi o leite em pó desnatado a 1% em PBST 0,05%. A titulação do conjugado identificou a diluição de 1:10.000 como a condição ideal (100 µl/poço, 1 h a 37°C), fornecendo sinal de absorbância elevado para o controle positivo e mantendo o ruído do controle negativo em níveis basais (D < 0,20).

Figura 5 - Titulação comparativa de conjugados anti-IgG equina acoplados à peroxidase (HRP) produzidos em coelho e cabra em diferentes diluições de trabalho no iELISA.



Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Valores de absorbância (Densidade Óptica — DO_{450nm}) obtidos frente ao soro controle positivo para os conjugados anti-IgG equina-HRP de origem cunícula (Coelho; diluições 1:1.000, 1:5.000 e 1:10.000) e caprina (Cabra; diluições 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000).

Durante a fase inicial de padronização do iELISA, o conjugado demostrou excelente desempenho, apresentando uma discriminação nítida entre os controles positivo e negativo,

com uma intensidade de sinal apropriada e ausência de ruido de fundo. Contudo, ao avançar para as etapas finais de validação com os soros de campo, identificou-se um padrão de instabilidade caracterizado pelo decaimento progressivo dos valores de densidade óptica (DO) dos controles ao longo do tempo, além de flutuações de leitura entre alíquotas provenientes de um mesmo lote de diluição do conjugado.

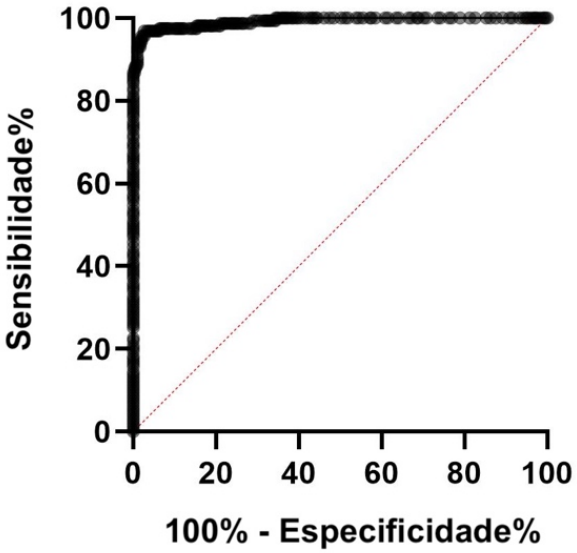
2.3.3. Validação do protocolo iELISA com Amostras de Campo

Para avaliar a padronização e determinar os parâmetros diagnósticos do ensaio, foram testadas amostras de soro de diferentes grupos de animais. Os valores de DO obtidos como resultado no iELISA foram justados (descontando o branco) e normalizados em Índice de Positividade (IP) (Apêndice C). Observou-se uma clara distinção nos valores do IP entre as amostras reagentes e não-reagentes no IDGA, fornecendo a base de dados necessária para o cálculo da sensibilidade e especificidade via curva ROC.

2.3.4. Estabelecimento do Ponto de Corte.

A partir do valor do índice IP e do status real das amostras definido pelo IDGA (Apêndice C), foi construída a Curva ROC (Figura 6) utilizando o software GraphPad Prism (versão 11.0.0, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA), para avaliar a capacidade discriminatória do ensaio desenvolvido.

Figura 6 Curva ROC a partir dos dados de Índice de Positividade e IDGA.



Fonte: Elaborado pela autora (2026), criada por meio do software GraphPad Prism (versão 11.0.0, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA).

A análise da Curva ROC revelou uma capacidade discriminatória alta para o ensaio desenvolvido, apresentando uma Área Abaixo da Curva (AUC) de 0,992 (Erro Padrão = 0,0034; IC 95%: 0,985 a 0,998; p <0,0001). Esse valor de AUC próximo de 1,0 confirma a alta capacidade discriminatória do teste entre amostras reagentes e não-reagentes em comparação ao método de referência no Brasil (IDGA).

O *J* alcançou seu valor máximo de 0,9418 ao estabelecer o valor crítico de IP em >0,258. Este critério confere ao teste desenvolvido uma sensibilidade diagnóstica de 96,86% (IC 95%: 92,85% - 98,65%) e uma especificidade diagnóstica de 97,32% (IC 95%: 94,81% - 98,64%) quando comparado ao teste de referência de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). Adicionalmente, o ensaio apresentou uma Razão de Verossimilhança de 36,2, reiterando a alta confiabilidade do método para a triagem e diagnóstico da infecção.

2.3.4.1. Comparativo de *cutoff*

Para evidenciar como diferentes valores de IP afetariam a rotina de diagnóstico, o impacto de outros pontos de corte candidatos sobre as frequências de classificação (verdadeiros e falsos positivos/negativos) foi avaliado junto as respectivas variações de sensibilidade e especificidade (Tabela 3). Procurando o equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, a análise comparativa confirma que o ponto de corte de >0,247 mostrou-se ideal para este ensaio, pois oferece uma taxa baixa tanto de falso-negativo (FN=5) quanto de falso-positivo (FP=10), o que também se refletiu na Razão de Verossimilhança de 28,96.

Tabela 3 Parâmetros de desempenho diagnóstico e distribuição de frequências observados no ensaio ELISA em diferentes pontos de corte candidatos.

Ponto de corte	VP	FN	FP	VN	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	Índice de Youden (J)
>0.069	159	0	103	196	100 [97,64 - 100]	65,55 [60 – 70,71]	0,6555
>0,234	154	5	11	288	96,86 [92,85 – 98,65]	96,32 [93,53 – 97,93]	0,9318
>0,247	154	5	10	289	96,86 [92,85 – 98,65]	96,66 [93,95 – 98,17]	0,9352
>0,258	152	7	8	291	96,86 [92,85 – 98,65]	97,32 [94,81 – 98,64]	0,9418
>0,547	137	22	0	299	86,79 [80,65 – 91,2]	100 [98,73 – 100]	0,8679

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Destacado em preto o ponto de corte escolhido. VP: Verdadeiro Positivo; FN: Falso Negativo; FP: Falso Positivo; VN: Verdadeiro Negativo: IC: Intervalo de confiança.

O ponto de corte >0,069 corresponde à coordenada com 100% de sensibilidade. O seguinte na tabela >0,234 corresponde a média do IP de todas as amostras negativas

acrescentado duas vezes o desvio padrão das mesmas (Crowther, 2009), abordagem estatística clássica e tradicional na padronização de ensaios ELISA. Por outro lado, o *cutoff* com maior J corresponde a >0,258, o que leva a um equilíbrio com tendencia à maior especificidade com valores de FN=7 e FP=8. E finalmente, o ponto de corte >0,547 permite uma especificidade de 100% com FN=22 e FP=0.

Após identificado o ponto de corte, foram avaliadas e classificadas as amostras, identificando-se cinco como falsos negativos, apresentando um resultado oficial positivo para IDGA, mas refazendo o teste obteve se um resultado indeterminado (fraco positivo). Estas amostras são, 3 do grupo dos potros (714, 731 e 996), 1 do grupo CG (3633) e 1 do grupo 7coletas (5774). Somado a isso, as amostras 3633 e 5774 são positivas para PCR nessa coleta, enquanto a 996 foi positiva para PCR em uma coleta posterior.

2.3.5. Teste de Aplicabilidade

- Fazenda Nhumirim

Na Fazenda Nhumirim da região do Pantanal, foram avaliadas 80 amostras de campo coletadas no mês de maio de 2026, com o intuito de testar o comportamento do ensaio desenvolvido em uma população com perfil epidemiológico de ausência de infecção. Os resultados demostraram uma concordância perfeita (100%) entre o teste de referência e o iELISA. Todas as amostras apresentaram valores de IP consistentemente abaixo do ponto de corte (IP médio 0,01, *cutoff* >0,247), sendo confiavelmente classificadas como negativas em ambos os métodos. Os valores individuais de IP de cada amostra dessa propriedade estão detalhados no Apêndice D.

- Amostras Uruguaiana

Dando continuidade às etapas de aplicabilidade em campo, avaliou-se um painel de amostras pertencentes ao banco de espécimes do Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Pampa (UNIPAMPA) – Campus Uruguaiana.

Ao serem submetidas ao iELISA padronizado as amostras divergentes, correspondentes a testes sorológicos negativos com PCR positivo, o total das 32 amostras mantiveram-se negativas, com valores de IP significativamente abaixo do *cutoff* (>0,247) (Apêndice E).

No grupo de equinos negativos, obteve-se uma total concordância com o diagnostico oficial, todas as 36 amostras testadas apresentaram valores de IP estritamente abaixo do ponto de corte (>0,247), sendo confiavelmente classificadas como negativas (Apêndice F).

No grupo de equinos positivos, ao serem submetidas ao ELISA padronizado, observou-se uma concordância diagnostica em 13 das 16 amostras avaliadas, as quais apresentaram valores IP acima do *cutoff*, confirmando o status de positividade. Contudo, três amostras (1, 9 e 11) apresentaram valores de absorbância abaixo do limite crítico (>0,247), sendo classificadas como não-reagentes no ensaio imunoenzimático (Apêndice G).

2.4. Discussão

A incessante problemática sanitária e socioeconômica gerada pela presença da Anemia Infecciosa Equina na equideocultura leva a constantes esforços para estabelecer ações de controle e prevenção. O principal empecilho encontra-se no diagnóstico precoce e rápido para realizar o correto manejo dos animais conforme o estipulado pelas normativas do país e isso exige que, o diagnostico seja direcionado para detectar as variantes virais presentes na região alvo (EMBRAPA, 2001).

Uma das principais causas de falhas no diagnóstico sorológico da doença é a elevada taxa mutacional do vírus, devido as alterações que acontecem no material genético no momento da transcrição reversa dentro da célula do hospedeiro, já que a enzima transcriptase reversa não possui a capacidade de corrigir os erros. Assim, ainda que os vírions resultantes da replicação correspondem a mesma espécie, a diversidade do material genético contido em cada, cria o conceito denominado *quasispecies* (Craigo; Montelaro, 2013).

A partir dali, as proteínas que constituem os vírions também sofrem mudanças conformacionais as quais permitem evadir o sistema imunológico (Xiu-Fang *et al.*, 2011). Por causa do processo de reconhecimento em chave fechadura que acontece entre a imunoglobulina e o epítopo da proteína viral, as mudanças estruturais destas últimas interferem no reconhecimento. Ademais, as concentrações séricas das imunoglobulinas podem variar dependendo do estado fisiológico e imunológico do animal (Thieulent *et al.*, 2025).

A indução da resposta imune contra as proteínas p26 e gp45, no organismo do equídeo acontece em tempos diferentes da infecção. A p26 sendo a principal proteína do capsídeo e antigenicamente conservada, estimula a produção de anticorpos que persistem durante a vida toda do animal, o que permite a confirmação crônica da doença (Wang *et al.*, 2025). Por outro lado, a gp45 proteína do complexo do envelope que participa da fusão do vírion na célula hospede, gera uma resposta imune inicial forte contra estas glicoproteínas (Ostuni *et al*., 2025).

A aplicação da biotecnologia de síntese química de peptídeos, permitiu o uso de epítopos imunodominantes provenientes destas duas proteínas, gerando dois peptídeos quiméricos que aumentam a sensibilidade do ensaio ao oferecer um reconhecimento duplo. Assim, observou-se a capacidade de detecção de anticorpos tanto para o capsídeo quanto para o envelope, ajudando a cobrir a diversidade genética (Wang *et al.*, 2025).

Pelo anterior, o estabelecimento de epítopos conservados e o uso destes como antígenos para detecção de anticorpos contra EIAV é um desafio, que precisa continuar a ser explorado.

A identificação do epítopo P42 da proteína p26, e seu uso em conjunto com outros epítopos ou proteínas, é um grande avanço para o diagnostico sorológico da AIE (Pinheiro, 2022).

A eficiência diagnostica observada no iELISA desenvolvido está intimamente ligada à arquitetura molecular dos antígenos utilizados e à otimização das condições físico-químicas de sensibilização da fase sólida. Embora o processo de fixação dos peptídeos sintéticos na placa de poliestireno tenha ocorrido por adsorção passiva via tampão Carbonato-Bicarbonato (TCB, pH 9,6), a presença da cauda de poli-Histidina (6 x His) na extremidade C-terminal desempenhou um papel estrutural relevante, que vai além de suas funções clássicas em cromatografia de afinidade e como auxiliar de fixação em outro tipo de ensaios (Puckett, 2015).

Sob os valores de pH elevado estabelecido pelo TCB, a densidade de carga líquida e a hidrofobicidade local das moléculas são alteradas, conforme evidenciado por Butler (2000) ao avaliar tais comportamentos físico-químicos. A concentração de resíduos de Histidina em uma das extremidades gera uma assimetria molecular que pode favorecer uma orientação espacial preferencial durante o acoplamento hidrofóbico ao plástico. No procedimento biotecnológico, a manutenção dessa cauda no C-terminal pode atuar como um braço espaçador, projetando o epítopo funcional da proteína p26 (P42) e da glicoproteína de transmembrana gp45 (TM) para longe da superfície da placa (Puckett, 2015). Essa conformação pode conferir maior flexibilidade conformacional aos epítopos em fase aquosa e facilitar o reconhecimento de alta afinidade pelos anticorpos policlonais presentes nos soros. A dinâmica de acessibilidade dos epítopos torna-se ainda mais evidente ao analisar o comportamento dos peptídeos quiméricos individuais (P42-TM+His e a TM-P42+His). A inversão na ordem linear dos blocos de epítopos resultou em valores distintos de reatividade imunoenzimática quando os peptídeos foram avaliados separadamente.

Na avaliação *in sílico* da acomodação dos peptídeos quiméricos no processo de adsorção, observou-se que a inversão topológica dos domínios P42 e TM pode alterar a disposição no fundo do poço. Assim, no P42-TM+His, a porção terminal entre a TM e a cauda His cria uma região contínua de alta hidrofobicidade (Butler, 2000) a partir da metade terminal (C-terminal) da molécula, a qual pode apresentar uma velocidade de adsorção no poliestireno muito maior. De tal modo, com o C-terminal fortemente fixado, a porção do P42 que é altamente flexível devido as prolinas e carregado negativamente, fica livre, móvel e projetado para a fase liquida. Esta característica permite que os anticorpos do soro se liguem sem nenhuma restrição física induzida pela parede do poço. No entanto, o epítopo da TM pode sofrer um leve mascaramento por estar muito próximo da zona de adsorção.

Já o TM-P42+His, pode ter um comportamento diferente, onde os extremos do peptídeo tornam-se hidrofóbicos e tem a tendencia de adsorver com mais facilidade na placa, do que a parte central do P42 que tende a ser hidrofílica. Esta disposição pode modificar a orientação dos epítopos, dependendo da interação das extremidades no poliestireno. Ademais, a TM conta com a presencia de cisteínas, as quais podem gerar uma estrutura de *Cys-loop* por meio de ligação dissulfeto, que pode ser mais facilmente conformada estando no extremo livre do peptídeo quimérico no momento da adsorção, permitindo uma interação diferente entre o epítopo e o parátopo (Butler, 2000).

Portanto, a combinação dos dois peptídeos quiméricos proporciona geometrias de adsorção complementares que otimizam a cobertura da superfície e aumentam a densidade de imunocomplexos por unidade de área. Como resultado, eleva-se a sensibilidade diagnóstica do teste, refletindo-se em um ganho sinérgico no sinal de densidade óptica decorrente do reconhecimento simultâneo dos dois alvos imunológicos.

Adicionalmente, o uso do reagente comercial SuperBlock™ como estabilizante hidrofílico junto com o coquetel Inibidor de protease cOmplete™ Mini, preservou a integridade e a suspensão dos peptídeos sintéticos, evitando agregações inespecíficas e degradação prévias à sensibilização. A formulação do SuperBlock™ baseada em macromoléculas modificadas e isenta de proteínas animais complexas inteiras (como a caseína ou a albumina sérica bovina – BSA) foi determinante para mitigar o ruído de fundo (*background*), contribuindo a robustez observada nos testes de aplicabilidade em campo

A adição deste reagente, mesmo em concentrações otimizadas reduzidas, ao tampão carbonato bicarbonato para sensibilizar a placa mostrou uma melhora no resultado. Embora a otimização da etapa de sensibilização com o TCB associado ao agente bloqueador (SuperBlock™) tenha reduzido significativamente o ruído de fundo basal na padronização com os controles, a transição para a validação com amostras de campo revelou a necessidade de uma etapa de correção analítica. Os soros de campo podem apresentar uma complexidade biológica inerente (efeito matriz), contendo imunoglobulinas inespecíficas e proteínas aderentes que conseguem se ligar fisicamente aos poços mesmo após processos de bloqueio (Ostuni *et al*., 2025).

Para neutralizar essa interferência individual, o protocolo final do iELISA foi estruturado de forma a exigir o processamento de cada amostra em duplicata frente aos peptídeos quiméricos e, paralelamente, em duplicata para o "branco do soro" (poços sensibilizados apenas com a solução de TCB/SuperBlock™, sem antígeno, mas que recebem o respectivo soro na etapa correspondente). A subtração matemática do valor de DO do branco

do soro da DO obtida nos poços com antígeno ($DO_{corrigida} = DO_{antígeno} - DO_{branco}$) elimina qualquer sinal decorrente de adsorção inespecífica a fase sólida. Essa estratégia de controle interno individualizado resguarda o ensaio contra falsos-positivos provocados por soros com uma matriz biológica complexa, elevando a especificidade e confiabilidade do resultado (Ostuni *et al*., 2025).

Na seguinte etapa do imunoensaio, a definição e escolha do produto de bloqueio que fosse eficiente e estável constituiu um dos maiores desafios na padronização. A fase de bloqueio tem como objetivo saturar os sítios de ligação livres na superfície de poliestireno após a sensibilização antigênica, impedindo a adsorção inespecífica de imunoglobulinas e outros componentes da matriz biológica do soro, o que permite a redução do ruído de fundo (*background*) e o melhora da reprodutibilidade do teste (Crowther, 1995).

Durante as etapas preliminares de otimização do iELISA, observou-se que o uso de agentes bloqueadores convencionais de origem bovina, como o leite em pó desnatado (LPD) e albumina sérica bovina (BSA), resultava em valores elevados de densidade óptica durante os experimentos. Esse fenômeno pode ser atribuído a fatores biológicos. O LPD, em sua maioria caseína, contém traços de imunoglobulinas bovinas residuais, biotina e carboidratos complexos que podem interagir de forma cruzada com o conjugado ou com anticorpos heterofilos presentes no soro. De forma semelhante, a BSA, por apresentar uma alta homologia com proteínas séricas de espécies mamíferos, torna-se um alvo frequente para anticorpos naturais de baixa afinidade, comprometendo a especificidade analítica do ensaio (Jiang *et al.*, 2021).

Para contornar essa limitação, a substituição pelo bloqueio com ovalbumina 5% revelou-se uma decisão metodológica altamente eficaz, proporcionando estabilidade e reprodutibilidade ao ensaio. Por ser uma glicoproteína derivada de aves (*Gallus gallus*), a OVA possui uma reduzida homologia estrutural com as proteínas de mamíferos, o que anula a reatividade inespecífica mediada por anticorpos heterofilos. Adicionalmente, por se tratar de uma molécula monomérica de menor massa molecular (aproximadamente 45 kDa), tem a capacidade de ocupar microespaços vazios na fase sólida com maior eficiência do que as grandes micelas de caseína ou os oligômeros de BSA (Strixner; Kolozik, 2011).

Concomitante ao bloqueio, outro aspecto inovador do protocolo desenvolvido foi a adoção de uma estratégia de múltiplas fontes proteicas (bloqueio heterólogo alternado), distribuídas estrategicamente entre as fases do ensaio. Desta forma, o uso de uma fração reduzida de SuperBlock™ na etapa de sensibilização começa o processo de bloqueio junto ao processo de adsorção do antígeno, seguido da aplicação da OVA como bloqueador

imunologicamente inerte do poliestireno livre, culminado com o uso de LPD como parte da solução diluente da etapa de aplicação de soros e conjugado (Jiang *et al.*, 2021).

A alternância sistemática dessas fontes proteicas em solução atua como sistema de bloqueio competitivo em fase líquida. Ao manter o leite desnatado de forma solúvel no diluente do soro, as proteínas bovinas atuam como "iscas" moleculares. Desta forma, eventuais anticorpos heterofilos ou imunoglobulinas inespecíficas presentes no soro equino contra proteínas de mamíferos, estes se ligam preferencialmente as proteínas do leite e são eliminados na etapa subsequente de lavagem, sem interagir com a superfície placa (Crowther, 1995).

Não obstante a estratégia desse sistema de bloqueio, obteve-se em algumas amostras resultados que revelaram níveis persistentes de fundo alto. Esse comportamento pode ser devido a característica biológica da matriz do soro, onde a presença de anticorpos da classe IgM com a capacidade de ligação inespecífica à porção Fc (fragmento cristalizável) de imunoglobulinas acopladas ao poço, ou por fatores físicos como a hemólise e lipemia moderada da amostra. A hemoglobina livre atua como uma pseudo-peroxidase nativa que mimetiza a atividade do conjugado HRP, enquanto as micelas lipídicas podem aprisionar fisicamente o conjugado por forças hidrofóbicas fracas na parede celular do poço (Crowther, 1995).

Em razão disso, na seguinte etapa do imunoensaio, foi realizada uma otimização dos parâmetros operacionais de processamento e diluição das amostras, para mitigar o efeito da matriz e estabelecer os parâmetros apropriados para uma leitura ótima do ensaio. A avaliação comparativa de diferentes diluições (1:50 a 1:800) demostrou que as frações mais elevadas (1:400 e 1:800) foram determinantes para a eliminação do ruido de fundo provocado pelo excesso de proteínas séricas totais inespecíficas.

A seleção da diluição 1:400 como padrão operacional foi respaldada por critérios de viabilidade técnica e precisão analítica. Embora a diluição 1:800 apresentasse perfis de absorbância mais limpos no branco do soro, o emprego de diluições excessivamente altas impõe a necessidade de pipetar volumes reduzidos, o qual eleva significativamente o erro experimental sistemático e o coeficiente de variação entre as réplicas. Assim, a relação 1:400 consolidou-se como o limite ideal de equilíbrio, assegurando uma diluição robusta e reprodutível por parte do operador, ao mesmo tempo em que preservou a sensibilidade diagnóstica do teste (Crowther, 1995).

Esse aprimoramento analítico foi substancialmente potencializado pela introdução de uma etapa prévia de centrifugação de alta velocidade (10.000 x *g* por 10 minutos) dos soros antes de sua diluição. Este pré-tratamento atuou como uma clarificação física rigorosa da matriz biológica. Sob esta força centrifuga, sedimentam-se com eficiência microcoágulos residuais,

redes de fibrina e agregados proteicos. A remoção destes detritos em suspensão impede que eles atuem como barreiras físicas ou superfícies de adsorção inespecífica para o conjugado enzimático no fundo do poço (Crowther, 1995).

Outrossim, a centrifugação de alta velocidade promove a segregação de micelas lipídicas e lipoproteínas de baixa densidade comumente encontradas em soros de campo moderadamente lipêmicos. Ao viabilizar a aspiração de uma parte do soro completamente límpida e isenta de interferentes coloidais, essa etapa minimizou de forma drástica a variabilidade inter-ensaio e conferiu ao iELISA padronizado maior robustez (Crowther, 2009).

Avançando na análise do imunoensaio, a estabilidade e a homogeneidade do conjugado (anticorpo associado à Peroxidase – HRP) constitui um dos pilares determinantes para a reprodutibilidade. A investigação das causas da instabilidade revelou que o ambiente eletrostático e a dinâmica de estocagem desempenharam um papel central no decaimento da atividade do reagente. A utilização de glicerol tamponado com PBS, formulado na tentativa de garantir a crioproteção à solução estoque, representou um fator de interferência. A Peroxidase (HRP) é sensível à presença de forças iônicas elevadas; a concentração de íons de Cloreto de Sódio (NaCl) presentes no PBS pode afetar transitoriamente a conformação tridimensional do sítio ativo da enzima ou induzir a dissociação parcial das ligações que mantêm o anticorpo unido à molécula de HRP (Azevedo *et al.*, 2003).

Assim, a perda de sinal nas alíquotas de uso mais tardio não reflete necessariamente uma degradação por quebra da proteína do anticorpo, mas sim pode ser devido a processos de inativação química e conformacional da enzima HRP induzidos pelo armazenamento prolongado em PBS a -20 °C. Sabe-se que o tampão fosfato (PBS) sofre uma precipitação diferencial de seus componentes sob baixas temperaturas. Esse fenômeno provoca um desvio ácido temporário (queda de pH no microambiente da solução), o que estressa a peroxidase, que é bastante sensível a pHs baixos (Murase; Franks, 1989).

Somando a isso, o congelamento parcial leva a concentrar excessivamente os sais e o conjugado na fração líquida. Esse estresse de força iônica local pode forçar uma microagregação do complexo anticorpo-HRP, ocultando seus sítios ativos (Bhatnagar *et al*., 2007). Há também o risco de oxidação lenta do átomo de ferro do grupo heme da peroxidade pelo oxigênio que fica dissolvido na água de reconstituição. Juntos, esses fatores explicam por que alíquotas guardadas por mais tempo podem perder força reativa de maneira acentuada, mesmo que as primeiras tenham funcionado no início da padronização e validação (Azevedo *et al.*, 2003).

Da mesma forma, a viscosidade intrínseca do glicerol impõe limitações físicas à homogeneização em microvolumes. Se a homogeneização inicial não atingiu o equilíbrio termodinâmico completo antes do fracionamento das alíquotas, formam-se microgradientes de concentração ao longo do tubo. Consequentemente, as alíquotas dispensadas passam a carregar concentrações distintas de conjugado ativo, podendo refletir nas oscilações de densidade óptica (Arakawa; Timasheff, 1982).

Adicionalmente, a etapa de preparo da diluição de trabalho (1:10.000) para o processamento de placas – realizada pela transferência de microvolumes entre 11 e 22 µl para diluição em PBST 0,05% – impõe limites físicos de capilaridade. Devido à sua alta viscosidade, o glicerol adere-se fortemente às superfícies interna e externa da ponteira de polipropileno da micropipeta. Durante a dispensação desses volumes, o fluxo lento de saída e a retenção de um filme residual na parede interna da ponteira, ou mesmo a transferência indesejada por arraste hidrofóbico do conjugado aderido à parece externa, podem introduzir desvios volumétricos. Essas pequenas variações volumétricas de conjugado viscoso retido ou transferido em excesso propagam erros que alteram a densidade de peroxidase ligada aos poços, podendo resultar em variações de sinal interplacas mesmo sob condições experimentais controladas (Arakawa; Timasheff, 1982).

Com a consolidação das etapas de otimização físico-químicas na padronização, o imunoensaio foi submetido a prova, passando para a aplicação em larga escala com amostras de campo. A validação diagnostica de uma ferramenta biotecnológica exige que ela demostre não apenas precisão analítica sob condições ideais, mas também robustez diante do efeito da matriz biológica das amostras de campo.

A determinação do ponto de corte definitivo para o iELISA exigiu uma análise que transcendesse os critérios puramente matemáticos de otimização de curvas ROC. Embora o maior Índice de Youden (J = 0,9418) tenha apontado matematicamente para o ponto de corte de >0,258, optou-se pela adoção do limite de >0,247 (J = 0,9352). Essa decisão fundamenta-se na avaliação do princípio do Índice de Youden, o qual assume um peso equivalente tanto para os falsos-positivos quanto para os falsos-negativos (Youden, 1950).

Contudo, em programas de controle e erradicação de enfermidades de notificação obrigatória e alto impacto socioeconômico, como a Anemia Infecciosa Equina, o custo biológico de um falso-negativo é superior ao de um falso-positivo. Um animal falsamente diagnosticado como negativo retorna ao rebanho ou transita livremente, atuando como fonte silenciosa de disseminação viral por vetores hematófagos. Por outro lado, um falso-positivo é

rapidamente desmascarado e corrigido na etapa subsequente de confirmação oficial pelo IDGA, sem gerar prejuízos ao status sanitário regional (EMBRAPA, 2004).

Sob essa premissa, o ponto de corte >0,247 foi selecionado por oferecer um equilíbrio operacional superior. Ele posiciona o limiar de leitura ligeiramente abaixo do maior Índice de Youden, estabelecendo uma margem de segurança analítica física para detecção de soros limiares. Ao mesmo tempo, essa escolha preserva um nível de especificidade de 96,66%.

Por outro lado, os soros obtidos na rotina de campo frequentemente sofrem mudanças por conta do transporte, congelamentos e descongelamentos sucessivos, além de apresentarem graus variáveis de hemólise ou lipemia. O fato do iELISA ter apresentado resultados altamente reprodutíveis e consistentes ao processar os painéis de diferentes procedências confirma a eficácia operacional do protocolo desenvolvido (Pawlik-Sobecka *et al.*, 2020; Tate; Ward, 2004).

A aplicação do ensaio direcionado para a região do Pantanal trata diretamente uma questão histórica de forte impacto socioeconômico e sanitário. Caracterizado por um manejo extensivo de equinos de lida e por uma densidade de vetores hematófagos (tabanídeos) favorável à transmissão ativa do vírus da Anemia Infecciosa Equina, o Pantanal é uma área endêmica que impõe sérios desafios ao controle da doença. Nesse contexto, o diagnostico oficial baseado na Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA ou teste de Coggins) apresenta limitações logísticas. Por exigir 48 horas para a leitura e depender de uma interpretação visual subjetiva, o IDGA atrasa a tomada de decisões de manejo sanitário nas fazendas, onde o trânsito de animais é dinâmico (EMBRAPA, 2004).

O iELISA proposto surge como uma alternativa para melhorar os tempos de diagnostico ao oferecer um resultado rápido e quantitativo, viabilizando uma triagem ágil de rebanhos inteiros em poucas horas, permitindo o isolamento imediato de animais reagentes e mitigando a disseminação viral ativa.

Diante desse panorama, o iELISA desenvolvido consolida-se como uma ferramenta de triagem alinhada com as diretrizes de defesa sanitária do MAPA para o controle de Anemia Infecciosa Equina. Pela sua fácil aplicabilidade, leitura numérica objetiva e baixo custo, o ensaio apresenta-se como opção para o monitoramento populacional em larga escala. No fluxo regulatório oficial, o iELISA cumpre o papel de triagem rápida: as amostras negativas são prontamente liberadas, enquanto qualquer reação positiva ou inconclusiva é obrigatoriamente direcionada para a confirmação pelo teste de referência de IDGA (BRASIL, 2004).

Contudo, a ocorrência de cinco amostras falso-negativas (Pantanal, MS) da etapa de validação e três na etapa de aplicabilidade (Uruguaiana, RS) no iELISA – que se revelaram

positivas ou limiares no IDGA, e das quais duas foram confirmadas por PCR – exige uma análise crítica sobre os limites de sensibilidade dos testes de triagem na rotina de campo. Esse cenário não invalida a aplicabilidade do ensaio, mas expõe o desafio biológico da fisiologia da resposta imune em infeções ativas por lentivírus.

Animais na fase aguda da infecção podem apresentar uma alta carga viral (detectável por PCR), mas ainda estão em processo de soroconversão inicial, ou como no caso de alguns potros, com presencia residual das imunoglobulinas maternas sem estar infectado. Nesse estágio, o título de anticorpos específicos contra os epítopos lineares dos peptídeos sintéticos da p26 e TM do iELISA pode estar abaixo do limite de detecção analítica do ensaio, gerando o resultado falso-negativo. Por outro lado, o IDGA oficial, por utilizar antígenos totais que contêm uma diversidade maior de epítopos conformacionais, pode eventualmente capturar anticorpos precoces de baixa afinidade, gerando linhas de precipitação extremamente tênues (fraco-positivas) (BRASIL, 2018).

A detecção de amostras com baixos títulos de anticorpos ou baixa afinidade analítica representa um dos principais desafios no desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos de triagem. Para contornar essa limitação e expandir a janela de detecção do ensaio sem comprometer a especificidade, diferentes estratégias de otimização química e de amplificação de sinal podem ser implementadas diretamente na arquitetura do teste.

Uma primeira abordagem poderia ser a reotimização da fase de sensibilização. Entre as estratégias, pode ser realizada a modificação química da fase solida. A transição das placas de poliestireno convencionais de alta afinidade para superfícies funcionalizadas (como placas ativadas com maleimida ou quelatos de níquel) (Pierce™ Maleimide Activated Plates, Pierce™ Nickel Coated Plates - Thermo Fisher Scientific™) permite uma imobilização covalente orientada da cauda de Histidina (His) dos peptídeos quiméricos. Essa orientação poderia maximizar a área de contato disponível para as imunoglobulinas e aumentar a eficiência de captura do ensaio sem alterar a concentração do soro.

Adicionalmente, a amplificação química do sinal catalítico apresenta outra opção para contornar limites biológicos de detecção. Em vez do sistema clássico de conjugado de leitura direta, a incorporação de sistemas de amplificação mediada por biotina-estreptavidina ou complexos poliméricos de peroxidade (Poly-HRP) (Poly-HRP Streptavidin - Thermo Fisher Scientific™) promove um efeito multiplicador estável. A ligação de uma única molécula de IgG alvo desencadeia a ancoragem de uma rede contendo dezenas de moléculas ativas de HRP, amplificando o sinal gerado por densidade óptica mesmo diante de frações limitantes de anticorpos.

Por outro lado, a detecção de dez amostras falsas-positivas pelo iELISA – reagentes no ensaio imunoenzimático e negativas no IDGA de referência – é um comportamento previsto e metodologicamente aceitável para testes destinados à triagem populacional, devido a que a prioridade é maximizar a sensibilidade diagnóstica para mitigar ao máximo o escape de animais infectados, delegando ao teste confirmatório (IDGA) a função de refinar a especificidade e corrigir esses desvios (OMSA, 2023).

Sob a ótica molecular, esses dez resultados divergentes podem ser explicados por três fatores principais. O primeiro refere-se à acentuada disparidade de sensibilidade analítica entre as duas técnicas. O IDGA é uma técnica de imunoprecipitação passiva em gel que exige concentrações massivas de anticorpos circulantes para formar uma linha física e visual de precipitação. Os animais portadores crônicos assintomáticos, que frequentemente apresentam títulos flutuantes e limiares de anticorpos, podem facilmente resultar em leituras falso-negativas no teste de Coggins. Em contrapartida, o iELISA, devido à sua detecção em fase sólida com amplificação imunoenzimática, exibe um limite de detecção significativamente mais baixo, sendo capaz de capturar esses animais de baixo título que passariam despercebidos pelo método clássico (OMSA, 2023).

O segundo fator envolve a limitação do teste oficial frente à diversidade genômica e à dinâmica evolutiva do vírus. Sendo um lentivírus, o agente da Anemia Infecciosa Equina apresenta uma elevada taxa de mutação, o que resulta no surgimento constante de variantes antigênicas no campo. O teste de IDGA oficial depende estritamente do reconhecimento de antígenos conformacionais de referência (geralmente derivados de cepas de laboratório historicamente padronizadas). Caso o animal de campo esteja infectado por uma variante viral que carrega mutações pontuais em epítopos conformacionais da proteína p26, os anticorpos gerados pelo hospedeiro podem apresentar perda da afinidade pelo antígeno do kit comercial, resultando em linhas de precipitação tênues ou ausentes no gel de ágar (Schimmich *et al.*, 2025).

Por outro lado, o iELISA desenvolvido baseia-se em peptídeos sintéticos lineares estrategicamente selecionados a partir de regiões genômicas conservadas do vírus. Nessa perspectiva, parte dos chamados falsos-positivos frente ao IDGA podem representar, na verdade, verdadeiros-positivos que evidenciam as falhas de detecção do teste oficial (Ostuni *et al.*, 2025).

Por fim, o terceiro fator envolve os interferentes biológicos intrínsecos a soros (efeito da matriz biológica). A presença de fatores reumatoides, imunocomplexos ou anticorpos heterofilos pode induzir interações eletrostáticas inespecíficas com a fase sólida ou com o

antígeno, elevando o valor de densidade óptica ligeiramente acima do ponto de corte (Tate; Ward, 2004).

Para mitigar os riscos de biossegurança inerente a qualquer triagem sorológica, a legislação sanitária prevê a exigência de testes repetidos e periódicos de IDGA para o trânsito de animais além de investigações epidemiológicas ativas em propriedades com suspeita clínica. Portanto, o iELISA cumpre com o papel otimizador de recursos ao filtrar e liberar rapidamente a vasta maioria dos animais verdadeiramente negativos no campo, permitindo que a atenção do serviço oficial de defesa se concentre na investigação minuciosa e na confirmação dos casos reagentes e limiares (BRASIL, 2004, 2018).

Por outro lado, a validação realizada em colaboração com o Laboratório de Virologia da UNIPAMPA – Campus Uruguaiana agregou um valor metodológico indispensável ao projeto: a comprovação da transferibilidade da tecnologia. Avaliar o ensaio na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul – uma zona de trânsito internacional de animais de esporte e reprodução com características ecológicas completamente diferente do ecossistema pantaneiro, demostra a aplicabilidade do teste em outras regiões geográficas. Ademais, o envio e uso de kits pré-montados para que a equipe executasse a aplicação prática *in loco* provou que o protocolo é robusto o suficiente para ser operado de forma descentralizada. Essa característica valida iELISA como um produto reprodutível, o qual permite que o teste diagnóstico avance da área acadêmica para o uso de rotina laboratorial.

Esse promissor desempenho diagnóstico em condições de amostras de campo é sustentada pela própria natureza molecular da quimera antigênica utilizada. Os animais de produção estão em constante exposição a patógenos e estímulos vacinais, o que frequentemente gera reações cruzadas e resultados falsos-positivos quando se utilizam testes baseados em vírus inteiro lisado ou proteínas recombinantes totais purificadas. O uso de peptídeos sintéticos permitiu diminuir o sinal de fundo a causa do anterior. A ausência de reações cruzadas nas fazendas de controle do Pantanal e no painel negativo de Uruguaiana evidencia que a seleção dos peptídeos foi apropriada, garantindo uma alta especificidade.

A padronização deste ensaio imunoenzimático baseado em peptídeos quiméricos sintéticos – constituídos pelo epítopo da TM e pelo fragmento P42 – impôs desafios metodológicos complexos que exigiram tempo, dedicação e sucessivos refinamentos em bancada para a obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis. Contudo, o êxito na consolidação desta plataforma transcende o entorno laboratorial. O domínio sobre as condições reacionais e a estabilidade desses peptídeos sintéticos estabelece uma base biotecnológica promissora para o avanço futuro em direção ao desenvolvimento de teste rápidos. Esa evolução

permitirá transpor a precisão molecular validada neste trabalho para dispositivos portáteis passíveis de utilização direta no campo (*point-of-care*), fornecendo diagnósticos em tempos curtos e consolidando uma ferramenta estratégica para a modernização da vigilância epidemiológica e da defesa sanitária equina no país.

2.5. Conclusões

A estratégia biotecnológica de fusão do fragmento conservado da proteína transmembrana (TM – gp45) com o peptídeo P42, associada à inserção da cauda de Histidina (His-*tag*), permitiu a produção bem-sucedida dos antígenos quiméricos funcionais P42-TM+His e TM-P42+His, assegurando a ancoragem orientada na fase sólida e a preservação do reconhecimento imunológico dos epítopos. A otimização do imunoensaio estabeleceu as condições reacionais ideais com a sensibilização em Tampão Carbonato-Bicarbonato suplementado com 1,0 µl/ml de SuperBlock™, diluição de soro a 1:400 por 15 minutos e incubação do conjugado 1:10.000 por 60 minutos. Adicionalmente, a estratégia de correção com o poço "branco do soro" individualizado demonstrou ser um parâmetro indispensável e eficaz para neutralizar o efeito matriz e a adsorção inespecífica de imunoglobulinas em amostras de campo.

O iELISA padronizado apresentou excelente desempenho diagnóstico, alcançando índices de 96,86% de sensibilidade e 96,66% de especificidade. A seleção de epítopos lineares altamente conservados demostrou potencial para ampliar a sensibilidade de detecção de anticorpos em comparação ao teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). Esse achado sugere uma maior capacidade do ensaio em identificar amostras não reagentes no IDGA, o qual pode estar associado à variabilidade genômica e mutações conformacionais nas amostras de campo. O estabelecimento do ponto de corte definitivo em *cutoff* > 0,247 (J = 0,935) priorizou a sensibilidade analítica para a detecção de soros de baixo título, adequando o ensaio aos requisitos de biossegurança de testes de triagem oficial.

A validação do ensaio em amostras de diferentes regiões epidemiológicas, como o Pantanal e a Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, comprovou a estabilidade, a reprodutibilidade e a transferibilidade interlaboratorial da metodologia.

Referências bibliográficas

ABCCP. Conheça o cavalo pantaneiro, rústico e versátil. Notícia. 2023. Disponível em https://www.comprerural.com/conheca-o-cavalo-pantaneiro-rustico-e-versatil/. Consultado em 30 de novembro de 2025.

ALENCAR, G. **Padronização de um teste de ELISA indireto com peptídeo sintético para diagnóstico sorológico da Anemia Infecciosa Equina**. 2024. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2025. Disponível em https://repositorio.unesp.br/entities/publication/7e8b0151-dde5-4d4a-8df6-8e491c190a03. Consultado em 05 de novembro de 2025.

ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F.; HADDAD, J. P. A.; DIAS, R. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Anemia Infecciosa Eqüina: prevalência em eqüídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 141-148, 2006. Disponível em https://www.doi.org/10.1590/S0102-09352006000200001. Consultado em 03 de dezembro de 2025.

ANDRADE, D. R. F., *et al*. Equine Infectious Anemia affects the athletic performance of equines from the Brazilian Pantanal region. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 53, n. 10, p. 1184-1188. Disponível em https://www.doi.org/10.1590/S0100-204X2018001000012. Consultado em 25 de Agosto de 2026.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Stabilization of protein structure by sugar. **Biochemistry**, v. 7, n. 21, 1982. Disponível em https://www.doi.org/10.1021/bi00268a033. Consultado em 15 de julho de 2026

AZEVEDO, A. M. *et al*. Horseradish peroxidade: a valuable tool in biotechnology. **Biotecnol Annu Rev.**, v. 9, p. 199-247, 2003. Disponível em https://www.doi.org/10.1016/s1387-2656(03)09003-3. Consultado em 16 de julho de 2026.

BARROS, A. T. M.; FOIL, L. D. The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 380-384, 2007. Disponível em https://www.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.041. Consultado em 28 de novembro de 2025.

BEHRENDT, R.; WHITE, P.; OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **J Pept Sci**, v. 22, n. 1, 2016. Disponível em https://www.doi.org/10.1002/psc.2836. Consultado em 24 de junho de 2026.

BHATNAGAR, B. S. *et al*. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. **Pharm Dev Technol**, v. 12, n. 5, 2007. Disponível em https://www.doi.org/10.1080/10837450701481157. Consultado em 16 de julho de 2026.

BRASIL. **Acesse os novos painéis de BI (Business Intelligence) do MAPA**. gov.br, 2026. Disponível em https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/paineis-de-bi-do-mapa. Consultado em 03 de julho de 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 52**, de 26 de novembro de 2018. Disponível em https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/IN_52_2018_PNSE.pdf. Consultado em 16 de julho de 2026.

BRASIL. **Pantanal Mato-Grossense**. gov.br, 2014. Disponível em https://www.sgb.gov.br/pantanal-mato-grossense. Consultado em 10 de novembro de 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 45**, de 15 de junho de 2004. Disponível em https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201701/05142347-pese-in-45-2004.pdf. Consultado em 26 de junho de 2026.

BUTLER, J. E. Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays. **Methods,** v. 22, n. 1, p. 4–23, 2000. Disponível em https://doi.org/10.1006/meth.2000.1031. Consultado em 09 de setembro de 2026.

COGGINS L.; NORCROSS N. L.; NUSBAUM S. R. Diagnosis of Equine Infectious Anemia by immunodiffusion test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 1, 1972. Disponível em https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4333633/. Consultado em 06 de novembro de 2025.

COUTINHO, L. C. A. *et al*. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in Pichia pastoris. **Journal of Virological Methods**, v. 191, n. 2, p. 95-100, 2013. Disponível em https://www.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.006. Consultado em 01 de dezembro de 2025.

CURSINO, A. E. *et al*. Equine Infectious Anemia Virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. **Archives of Virology**, v. 163, p. 2385-2394, 2018. Disponível em https://doi.org/10.1007/s00705-018-3877-8. Consultado em 02 de dezembro de 2025.

CRAIGO J. K.; MONTELARO R. C. Lessons in AIDS Vaccine Development Learned from Studies of Equine Infectious, Anemia Virus Infection and Immunity. **Viruses**, v.5, n. 12, p. 2963-2976, 2013. Disponível em https://www.doi.org/10.3390/v5122963. Consultado em 18 de novembro de 2025.

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. 2. ed., *Human Press*, 2009.

CROWTHER, J. R. **ELISA Theory and Practice**. 1. ed. New York, 1995.

EMBRAPA. **Programa de prevenção e controle da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal Sul-Mato-Grossense**. Corumbá, MS, ISSN 1517-1973, 2004. Disponível em https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/812061/1/DOC68.pdf. Consultado em 30 de novembro de 2025.

EMBRAPA. **Anemia Infecciosa Eqüina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal.** 2001. Circular Técnica 29, Corumbá, MS, 2001. Disponível em https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/807376/1/CT29.pdf. Consultado em 10 de novembro 2025.

FIRDAUSY, L. W. *et al*. Global prevalence and risk factors of Equine Infectious Anemia: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary World**, v. 18, n. 6, p. 1440-1451, 2025. Disponível em https://www.doi.org/10.14202/vetworld.2025.1440-1451. Consultado em 13 de novembro de 2025.

HUSSAIN K. A. *et al*. Identification of *gag* Precursor of Equine Infectious Anaemia Virus with Monoclonal Antibodies to the Major Viral Core Protein, p26. **Journal of general Virology**, v. 69, p. 1719-1724, 1988. Disponível em https://www.doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1719. Consultado em 16 de novembro de 2025.

IBGE. **Mapa de Biomas do Brasil – Primeira aproximação**. 2004. Referenciado em https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html. Consultado em 10 de novembro de 2025.

ICTV. ***Lentivirus equinfane***. ICTV, 2023. Disponível em https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202505028&taxon_name=Lentivirus%20equinfane. Consultado em 30 de junho de 2026.

JIANG, X. *et al*. Non-Specific Binding and Cross-Reaction of ELISA: A Case Study of Porcine Hemoglobin Detection. **Foods**, v. 10, 2021. Disponível em https://doi.org/10.3390/foods10081708. Consultado em 15 de julho de 2026

KROLOW, T. K.; CARMO, D. D. D.; OLIVEIRA, L. P.; HENRIQUES, A. L. The Tabanidae (Diptera) in Brazil: Historical aspects, diversity and distribution. **Zoologia**, v. 41, 2024. Disponível em https://www.doi.org/10.1590/S1984-4689.v41.e23074. Consultado em 23 de novembro.

LEROUX, C.; CADORÉ, J. L.; MONTELARO, R C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary Research**, v. 35, p. 485-512, 2004. Disponível em https://www.doi.org/10.1051/vetres:2004020. Consultado em 27 de novembro de 2025.

LIMA, T. S. *et al*. Aspectos gerais da Anemia Infecciosa Equina (AIE). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022. Disponível em http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28508. Consultado em 24 de novembro de 2025.

LIMA, R. A. S.; CINTRA A. G. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Assessoria de Comunicação e Eventos do MAPA, 2015. Disponível em https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/equinocultura/livros/REVISAO%20DO%20ESTUDO%20DO%20COMPLEXO%20DO%20AGRONEGOCIO%20DO%20CAVALO.pdf. Consultado em 27 de julho de 2026.

MACHADO, R. C. *et al*. Características epidemiológicas e fatores de risco em propriedades foco de Anemia Infecciosa Equina no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. ***Ciência Animal Brasileira*****,** v. 25, e-ISSN 1809-689, 2024. Disponível em https://www.doi.org/10.1590/1809-6891v25e-78756P. Consultado em 29 de novembro de 2025.

MALOSSI, C. D. *et al*. High Genomic Variability in Equine Infectious Anemia Virus Obtained from Naturally Infected Horses in Pantanal, Brazil: An Endemic Region Case. **Viruses,** v. 12, n. 2, p. 1-15, 2020. Disponível em https://www.doi.org/10.3390/v12020207. Consultado em 22 de novembro de 2025.

MARTINS, M. F. **Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp90) no diagnóstico da Anemia Infecciosa Eqüina**. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2004. Disponível em https://vet.ufmg.br/tese-e-dissertacao/comparacao-entre-os-testes-idga-p26-e-elisa-indireto-rgp90-no-diagnostico-da-anemia-infecciosa-equina/. Consultado em 10 de novembro de 2025.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, 1969. Disponível em https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch6. Consultado em 24 de junho de 2026.

MOLINA, L. Q. **A indicação geográfica no Brasil e a potencialidade para o cavalo da raça pantaneira no Pantanal**. 2020. Dissertação (Mestrado em Geografia). UFMS, campus Três Lagoas, 2020. Disponível em https://ppggeografiacptl.ufms.br/files/2021/03/Dissertacao_Luciano_Molina_corrigida.pdf#:~:text=De%20uma%20população%20estimada%20de%20cerca%20de,existentes%20no%20Pantanal%20é%20remanescente%20de%20cavalos. Consultado em 10 de novembro de 2025.

MORAES, D. D. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MOTA, A. L. A.; BORGES, J. R. J. Situação epidemiológica da Anemia Infecciosa Equina em equídeos de tração do Distrito Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1074-1078, 2017. Disponível em https://www.doi.org/10.1590/S0100-736X2017001000006. Consultado em 17 de novembro de 2025.

MURASE, N.; FRANKS, F. Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solutions. **Biophys Chem**, v. 34, n. 3, p. 293-300, 1989. Disponível em https://www.doi.org/10.1016/0301-4622(89)80066-3. Consultado em 15 de julho de 2026.

NOGUEIRA, M. F. *et al*. Equine infectious anaemia in equids of Southern Pantanal, Brazil: seroprevalence and evaluation of the adoption of a control programme. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 227-233, 2017. Disponível em https://www.doi.org/10.1590/S0100-736X2017000300005. Consultado em 14 de novembro de 2025.

NOGUEIRA, M. F. *et al*. **Elisa rgp90 – Metodologia alternativa para o diagnostico de Anemia Infecciosa Equina no Pantanal.** EMBRAPA. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 93. 2009. Disponível em https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/812820/1/BP93.pdf. Consultado em 01 de dezembro de 2025.

OMSA**. Capítulo 1.1.6. Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas de animales terrestres**. In: Manual Terrestre de la OMSA. 2023. Disponível em https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06_Validación.pdf. Consultado em 16 de julho de 2026.

OSTUNI, A. *et al*. Comparative evaluation of a multistrain indirect ELISA targeting anti- p26 and gp45 antibodies for EIAV detection. **Pathogens**, v. 14, n. 6, 2025. Disponível em https://www.doi.org/10.3390/pathogens14060575. Consultado em 22 de novembro de 2025.

PAWLIK-SOBECKA, L. *et al*. The influence of Serum Sample Storage Conditions on Selected Laboratory Parameters Related to Oxidative Stress: A Preliminary Study. **Diagnostics**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em https://www.doi.org/10.3390/diagnostics10010051. Consultado em 16 de julho de 2026.

PINHEIRO, A. Embrapa. Relatório de Atividades 23/10/2022. Projeto: Predição de epítopos de célula B em proteínas estruturais do Vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE). 2022. Comunicação pessoal.

PUCKETT, M. C. Hexahistidine (6xHis) Fusion-Based Assays for Protein-Protein Interactions. In: Meyerkord, C. L. and Fu, H. Protein-Protein Interections. **Springer Nature**, Book, p. 365-370, 2015. Disponível em https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2425-7_23. Consultado em 14 de julho de 2026.

REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. **Anemia Infecciosa Equina**. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2016; p. 545-553.

ROSATI, S. *et al*. Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. **Journal of Virological Methods**, v. 121, p. 73-78, 2004. Disponível em https://www.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.001. Consultado em 13 de novembro de 2025.

RUSSI, R. C. *et al*. Validation of an indirect in-house ELISA using synthetic peptides to detect antibodies anti-gp90 and gp45 of the equine infectious anaemia virus. **Equine Veterinary Journal,** v. 55, n. 1, p. 111-121, 2023. Disponível em https://www.doi.org/10.1111/evj.13555. Consultado em 24 de novembro de 2025.

SAMPAIO, M. H. S. *et al*. **Situação epidemiológica da Anemia Infecciosa Equina no Brasil entre 2000 e 2023**. In: Carvalho, A. D.; Oelke, C. A. Ciência Animal e Veterinária: o avanço da ciência no Brasil. ISBN 978-65-5360-665-4, cap 12, 181-195, 2024. Disponível em https://www.doi.org/10.37885/240315952. Consultado em 30 de novembro de 2025.

SANTOS, S. A. *et al*. Histórico, vivências e desafios do núcleo de conservação do cavalo Pantaneiro. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 22, n. 2, p. 67-72, 2020. Disponível em http://dx.doi.org/10.5935/2176-4158/rcpa.v22n2p67-72. Consultado em 23 de junho de 2026.

SCHIMMICH, C. *et al*. Equine Infectious Anemia Virus Cellular Partners Along the Viral Cycle. **Viruses***,* v. 17, n. 5, 2025. Disponível em https://www.doi.org/10.3390/v17010005. Consultado em 16 de novembro de 2025.

SCHRAML P. *et al*. His-Tag-Aptamer-Liposome-Conjugates as a Multipurpose Tool for Recombinant Protein Screening and Protein-Based Bioassays. **Analytical Chemistry**, v. 98, p. 13609-13619, 2026. Disponível em https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6c00320. Consultado em 25 de junho de 2026.

SELLON D. C. **Equine Infectious Anemia. Update on Infectious Diseases**. v. 9, n. 2, 1993. Disponível em https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7126748/pdf/main.pdf. Consultado em 07 de novembro de 2025.

STRIXNER, T.; KOLOZIK, U. Egg proteins. In: Phillips, G. O. and Williams, P. A. **Handbook of Food Proteins**. Book, Woodhead Publishing, p. 150 – 209, 2011. Disponível em https://www.sciencedirect.com/science/chapter/edited-volume/abs/pii/B9781845697587500071. Consultado em 15 de julho de 2026.

TATE, J.; WARD, G. Interferences in immunoassay. **Clin Biochem Rev**, v. 25, n. 2, 2004. Disponível em https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1904417/. Consultado em 16 de julho de 2026.

THIEULENT, C. J. *et al*. Equine Infectious Anemia Virus worldwide prevalence: A 24-year retrospective review of a global equine health concern with far-reaching implications. **Veterinary Microbiology**, v. 306, 2025. Disponível em https://www.doi.org/10.1016/j.vetmic.2025.110548. Consultado em 15 de novembro de 2025.

UNDATA. **Horses: Year 2021**. 2024. Disponível em https://data.un.org/Data.aspx?d=FAO&f=itemCode%3A1096. Consultado em 24 de agosto de 2026.

UNESCO. **Pantanal Conservation Area**. 2000. Disponível em https://whc.unesco.org/en/list/999/. Consultado em 27 de julho de 2026.

VALLÉ, J.; CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anemie du cheval. *Conseil Régional Académie des Sciences*, v. 139, p. 331-33, 1904. In: Sauvage, Léon. **Lanémie Infectieuse du Cheval. These**, 1928. Disponível em https://www2.vetagro-sup.fr/bib/fondoc/th_sout/th_pdf/1928lyon139.pdf. Consultado em 06 de novembro de 2025.

WANG, J. *et al*. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip to detect Equine Infectious Anemia Virus. **Virology Journal**, v. 22, n. 205, 2025. Disponível em https://www.doi.org/10.1186/s12985-025-02815-6. Consultado em 07 de novembro de 2025.

WOAH. **Chapter 3. 6. 5. Equine Infectious Anaemia.** 2019. Disponível em https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.06.05_EIA.pdf. Consultado em 06 de novembro de 2025.

XIU-FANG, Y. *et al*. Evolutionary Patterns of the Proviral gp90 V3 to V5 Regions of Equine Infectious Anemia Virus Associated with Immune Selection in Progressors and Nonprogressors. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 1, p. 126-135, 2011. Disponível em https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60315-5. Consultado em 04 de novembro de 2025.

YOUDEN, W. J. Index for rating diagnostic test. **Cancer**, v. 3, n. 1, 1950. Disponível em https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3. Consultado em 16 de julho de 2026

ZHANG, Z. *et al*. Development and evaluation of a test strip for the rapid detection of antibody against Equine Infectious Anemia Virus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108,

n. 85, 2024. Disponível em https://www.doi.org/10.1007/s00253-023-12980-9. Consultado em 22 de novembro de 2025.

Apêndices

Apêndice A: Procedimentos Operacional Padrão completo do ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes do uso.

Dia 1

Sensibilização – Placa de reação

Procedimento:

- Solução diluente: 1:1000 de SuperBlock^{TM} em TCB.
- Preparar 13 ml de solução diluente e homogeneizar em vórtex por 1 minuto.
- Diluir o antígeno (1 mg/ml) na solução diluente levando a 1 ng/µl. Homogeneíze em vórtex por 1 minuto.
- Usar pipeta multicanal para dispensar por colunas.
- Adicionar 100 µl/poço do antígeno nas colunas ímpar (siga a
- Figura A1).
- Adicionar 100 µl/poço do diluente (branco) nas colunas par e no poço G11 (siga a
- Figura A1).
- Adicionar 100 µl de soro equino 10^5 diluído em TCB no poço H11.
- Deixar vazios os poços G12 e H12.

Figura A1 Placa de reação. Distribuição dos reagentes utilizados na sensibilização

	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
B	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
C	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
D	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
E	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
F	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
G	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Branco	
H	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Controle TMB	

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Incubação:

Incubar a placa sem tampa dentro de uma câmara úmida a 4 °C durante 18 horas.

Lavagem:

Após a incubação, lavar cada poço 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem (PBST 0,05%). Secar bem a placa com papel absorvente (bater a placa no papel).

Preparo placa para diluição de soros (*Deepwell*)

Procedimento:

- Preparar 215 ml de solução de bloqueio de LPD 10% em TCB.
- Adicionar até a borda do poço a solução de bloqueio. Repetir em todos os poços.

Incubação:

Incubar a placa sem tampa dentro de uma câmara úmida a 4 °C *overnight*. Seguida de uma incubação de 37 °C por 1 hora.

Lavagem:

Após a incubação, lavar cada poço 10 vezes com água comum, seguida de 3 vezes com água ultrapura. Deixar secar dentro de uma estufa.

Observações

- Se sugere o preparo da placa para diluição de soros em dias prévios ao experimento.
- A placa *Deepwell* pode ser reutilizada, precisando só repetir a lavagem e secagem conforme recomenda o mesmo preparo, assim que termina o experimento.

Dia 2

Bloqueio da placa de reação

Procedimento:

- Solução de bloqueio: 5% de OVA em PBST 0,05%.
- Preparar 20 ml de solução de bloqueio e homogeneizar em vórtex por 1 minuto.
- Adicionar 200 µl/poço.
- Deixar vazios os poços G12 e H12.

Incubação:

Incubar a placa aberta dentro da incubadora de placas a 37 °C por 1 hora.

Lavagem:

Após a incubação, lavar cada poço 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem (PBST 0,05%). Secar bem a placa com papel absorvente (bater a placa no papel).

Preparo das amostras

Procedimento:

1. Descongelar os soros no gelo e levar à temperatura ambiente.
2. Homogeneizar cada soro com vórtex.
3. Centrifugar a 10.000g por 10 minutos para separar o precipitado.
4. Preparar 78 ml de solução diluente dos soros LPD 5% em PBST.
5. Proceder à diluição conforme descrito abaixo.

Diluição de Amostras na Placa *Deepwell*

Objetivo: preparar diluições de 1:200 e 1:400 para cada amostra em duplicata na placa *Deepwell*.

Etapa 1 – Diluição 1:200 (primeira diluição): Na placa *Deepwell*, distribuir os volumes de solução diluente dos soros conforme a
Figura A2. Usar a mesma distribuição para até 21 amostras, adicionando 1990ul de solução diluente nos poços da primeira coluna (duplicata na linha alternada) e 500 µl nos poços da segunda coluna (para fazer a diluição de 1:400).

Figura A2 Distribuição da solução diluente na Placa *Deepwell.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl
B		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl
C	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl
D		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl
E	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl
F		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl
G	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl	1990 µl	500 µl		
H		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Adição de soros: Adicionar 10 µl de soro (após centrifugação) aos poços contendo 1990 µl de solução diluente. Para os controles, adicionar o soro nos poços reservados (C11 para controle negativo e E11 para o controle positivo).

Homogeneizar bem pipetando 20 vezes com ponteira única por poço. Resultado: diluição 1:200.

Etapa 2 – Diluição 1:400 (segunda diluição): Transferir 500 µl da diluição 1:200 para os poços contendo 500 µl de solução diluente (colunas pares, conforme a Figura A3). Homogeneizar bem pipetando 20 vezes com ponteira única por poço. Resultado: diluição 1:400.

Figura A3 Preparo de diluição de soros 1:400. Placa *Deepwell*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl
B		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl
C	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl
D		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl
E	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl
F		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl
G	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl	2000 µl	500 µl		
H		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		500 µl		

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Adição de Soros Diluídos (1:400) na placa de reação.

Procedimento:

- Adicionar 100 µl/poço da diluição 1:400 (da placa *Deepwell*) na placa de reação.
- Usar pipeta multicanal para dispensar por colunas.
- Adicionar cada soro em duplicata (2 colunas por amostra, uma no antígeno e outra no branco, (
- Figura A4).
- Adicionar 100 µl de solução diluente nos poços G11 e H11.
- Deixar vazios os poços G12 e H12.

Figura A4 Placa de reação. Adição dos soros para reação iELISA.

	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco	Antígeno	Branco
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	Soro1	Soro1	Soro5	Soro5	Soro9	Soro9	Soro13	Soro13	Soro17	Soro17	Soro21	Soro21
B	Soro1	Soro1	Soro5	Soro5	Soro9	Soro9	Soro13	Soro13	Soro17	Soro17	Soro21	Soro21
C	Soro2	Soro2	Soro6	Soro6	Soro10	Soro10	Soro14	Soro14	Soro18	Soro18	SoroC-	SoroC-
D	Soro2	Soro2	Soro6	Soro6	Soro10	Soro10	Soro14	Soro14	Soro18	Soro18	SoroC-	SoroC-
E	Soro3	Soro3	Soro7	Soro7	Soro11	Soro11	Soro15	Soro15	Soro19	Soro19	SoroC+	SoroC+
F	Soro3	Soro3	Soro7	Soro7	Soro11	Soro11	Soro15	Soro15	Soro19	Soro19	SoroC+	SoroC+
G	Soro4	Soro4	Soro8	Soro8	Soro12	Soro12	Soro16	Soro16	Soro20	Soro20	Solução diluente	
H	Soro4	Soro4	Soro8	Soro8	Soro12	Soro12	Soro16	Soro16	Soro20	Soro20	Solução diluente	

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Incubação:

Incubar a placa fechada (com tampa) a 37 °C com agitação de 400 RPM durante 15 minutos. NÃO exceder o tempo.

Lavagem:

Após a incubação, lavar cada poço 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem. Secar bem a placa com papel absorvente (bater a placa no papel).

Adição do Conjugado na Placa de reação

Procedimento:

- Solução diluente do conjugado: 1% de LPD em PBST 0,05%.
- Preparar 11 ml de solução diluente.
- Diluir o conjugado a 1:10.000 na solução diluente. Homogeneizar em vórtex por 1 minuto.
- Distribuir 100 µl do conjugado em cada poço.
- A mesma ponteira pode ser usada para todos os poços.
- Deixar vazio o poço H12.

Incubação:
Incubar a placa fechada (com tampa) a 37 °C por 60 minutos. NÃO exceder o tempo.
Lavagem:
Lavar cada poço 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem. Secar bem a placa com papel absorvente (bater a placa no papel).

Adição do Substrato na Placa de reação

Procedimento:

- Substrato: TMB (Tetrametilbenzidina) *Single Solution* (Invitrogen ™).
- Distribuir 100 µl do substrato em cada poço.

Incubação:
Incubar a placa fechada (com tampa) à temperatura ambiente com agitação de 600 RPM por 15 minutos. Proteger da luz. NÃO exceder o tempo.

Adição da Solução de Parada

Procedimento:

- Solução de parada: HCl 2M.
- Adicionar 50 µl da solução de parada em cada poço. Aguardar 1 minuto.

Leitura no Espectrofotômetro

Proceder à leitura da placa no comprimento de onda de 450nm.

Critérios de Aceitação e Interpretação de Resultados

Validação dos Controles (obrigatória):

- Controle Positivo (poços C11 e D11): Indice de positividade (IP) =1
- Controle Negativo (poços E11 e F11): Indice de positividade (IP) =0
- Se os controles estiverem fora dos limites, deve-se conferir as fórmulas do documento Excel.

Interpretação das amostras:

- Positivo: IP ≥ 0,247
- Negativo: IP < 0,247
- Borderline/Duvidoso: Valores próximos ao ponto de corte requerem confirmação com novo teste. Adicional ao uso confirmatório de teste de IDGA e PCR.

Apêndice B: Procedimento Operacional Padrão simplificado do ELISA Indireto Utilizando Peptídeos Quiméricos Sintéticos para o Sorodiagnóstico da Anemia Infecciosa Equina

Sensibilização da placa de reação:

- **Solução diluente:** 1 µl de SuperBlock™ em TCB.
- Diluir o antígeno: 1 ng/µl
- **100ul/poço** do antígeno e da solução diluente na Placa de reação conforme
- Figura A1.
- **Adicionar** 100 µl de soro equino 10^5 diluído em TCB no poço H11.
- **Incubação:** 4°C/ câmara úmida/18 h
- **Lavagem:** 3 vezes de 300 µl com a solução de lavagem; secar bem.
- Poços **G12 e H12 vazios**.

Bloqueio da placa de reação:

- **Solução de bloqueio:** 5% de OVA em PBST 0,05%.
- **Adicionar** 200 µl de solução de bloqueio.
- **Incubação:** 37°C/ câmara úmida/1 h
- **Lavagem:** 3 vezes de 300 µl com a solução de lavagem; secar bem.
- Poços **G12 e H12 vazios**.

Diluição dos soros:

Siga as indicações do protocolo completo a partir do passo – Preparo de Placa para diluição de soros (*Deepwell*) - para realizar a diluição de 1:400 dos soros na placa *Deepwell* conforme a Figura A2 e Figura A3.

Aplicação de Soros:

- **100ul/poço** da diluição 1:400 na Placa de reação.
- **Incubação:** 37°C/ Shake 400/15min
- **Lavagem:** 3 vezes de 300 µl com a solução de lavagem; secar bem.
- Poços G11 e H11 só diluente. **G12 e H12 vazios**.

Aplicação do Conjugado:

- **100ul/poço**
- **Incubação:** 37°C/60min
- **Lavagem:** 3 vezes de 300 µl com a solução de lavagem; secar bem.
- Poço **H12 vazio**.

Aplicação do Substrato:

- **100ul/poço**
- **Incubação:** Temperatura ambiente com agitação por 15 minutos, proteger da luz

Aplicação da solução de parada:

- **50ul/poço**. Aguardar 1 minuto

Leitura no Espectofotômetro

- Fazer a leitura da placa no comprimento de onda de **450 nm**

Analise os resultados conforme sugerido Critérios de Aceitação e Interpretação de Resultados do protocolo completo.

Apêndice C: Resultados de iELISA nas amostras de campo (IDGA Negativo=0; Positivo=1)

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
1	**Potro**	519	0,22	0,06	0,00	0,042	0
2	**Potro**	562	0,17	0,05	0,00	0,034	0
3	**Potro**	603	0,71	0,15	0,07	0,115	0
4	**Potro**	633	0,25	0,07	0,00	0,054	0
5	**Potro**	636	0,24	0,04	0,01	0,027	0
6	**Potro**	638	0,13	0,03	0,01	0,013	0
7	**Potro**	639	0,11	0,02	0,01	0,012	0
8	**Potro**	640	0,25	0,03	0,03	0,019	0
9	**Potro**	642	0,22	0,05	0,01	0,031	0
10	**Potro**	644	0,21	0,03	0,00	0,019	0
11	**Potro**	701	0,24	0,06	0,00	0,041	0
12	**Potro**	704	0,15	0,03	0,00	0,017	0
13	**Potro**	714	0,28	0,10	0,02	0,0724	1
14	**Potro**	722	0,12	0,04	0,00	0,029	0
15	**Potro**	729	0,32	0,09	0,00	0,086	0
16	**Potro**	731	0,28	0,13	0,02	0,1180	1
17	**Potro**	766	0,22	0,06	0,01	0,050	0
18	**Potro**	779	0,66	0,31	0,03	0,2751	1
19	**Potro**	921	0,20	0,04	0,01	0,043	0
20	**Potro**	923	0,25	0,05	0,00	0,047	0
21	**Potro**	955	0,25	0,05	0,02	0,045	0
22	**Potro**	962	0,27	0,04	0,02	0,041	0
23	**Potro**	996	0,36	0,23	0,00	0,2071	1
24	**Potro**	1030	0,15	0,02	0,00	0,019	0
25	**Potro**	1083	0,30	0,05	0,03	0,050	0
26	**Potro**	1270	0,25	0,08	0,03	0,071	0
27	**Potro**	1274	0,20	0,03	0,01	0,031	0
28	**Potro**	1513	0,31	0,09	0,00	0,086	0
29	**Grupo CG**	3574	0,19	0,02	0,02	0,019	0
30	**Grupo CG**	3575	0,16	-0,01	0,01	-0,003	0
31	**Grupo CG**	3576	0,12	0,00	0,00	0,001	0
32	**Grupo CG**	3577	0,18	0,01	0,01	0,014	0
33	**Grupo CG**	3578	0,19	0,01	0,01	0,006	0
34	**Grupo CG**	3580	0,11	0,00	0,00	0,002	0
35	**Grupo CG**	3582	0,09	0,00	0,01	0,005	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
36	**Grupo CG**	3583	0,16	0,04	0,00	0,033	0
37	**Grupo CG**	3585	0,14	0,04	0,00	0,030	0
38	**Grupo CG**	3586	0,34	0,08	0,02	0,037	0
39	**Grupo CG**	3588	0,48	0,09	0,02	0,040	0
40	**Grupo CG**	3593	0,10	0,00	0,01	0,000	0
41	**Grupo CG**	3594	0,11	0,01	0,00	0,008	0
42	**Grupo CG**	3595	0,10	0,01	0,00	0,002	0
43	**Grupo CG**	3596	0,61	0,17	0,05	0,073	0
44	**Grupo CG**	3597	0,26	0,04	0,01	0,029	0
45	**Grupo CG**	3598	0,13	0,02	0,01	0,011	0
46	**Grupo CG**	3599	0,08	0,00	0,00	-0,002	0
47	**Grupo CG**	3600	0,13	0,00	0,00	0,006	0
48	**Grupo CG**	3603	0,10	-0,01	0,00	-0,009	0
49	**Grupo CG**	3604	0,17	0,01	0,00	0,009	0
50	**Grupo CG**	3605	0,18	0,06	0,01	0,049	0
51	**Grupo CG**	3606	0,30	0,03	0,01	0,014	0
52	**Grupo CG**	3607	0,07	0,00	0,00	-0,005	0
53	**Grupo CG**	3608	0,09	0,00	0,00	-0,005	0
54	**Grupo CG**	3609	0,10	-0,01	0,00	-0,011	0
55	**Grupo CG**	3610	0,26	0,02	0,00	0,012	0
56	**Grupo CG**	3611	0,20	0,02	0,02	0,010	0
57	**Grupo CG**	3616	0,21	0,05	0,01	0,043	0
58	**Grupo CG**	3617	0,24	0,08	0,00	0,061	0
59	**Grupo CG**	3619	0,10	0,00	0,00	0,007	0
60	**Grupo CG**	3620	0,13	0,00	0,00	0,003	0
61	**Grupo CG**	3629	0,26	0,02	0,01	0,020	0
62	**Grupo CG**	3636	0,13	0,01	0,01	0,016	0
63	**Grupo CG**	3638	0,15	0,02	0,00	0,012	0
64	**Grupo CG**	3639	0,13	0,01	0,01	0,008	0
65	**Grupo CG**	3640	0,14	0,01	0,00	0,017	0
66	**Grupo CG**	4405	0,17	0,02	0,00	0,019	0
67	**Grupo CG**	7549	0,18	0,05	0,01	0,042	0
68	**Grupo CG**	7601	0,31	0,11	0,03	0,086	0
69	**Grupo CG**	8105	0,89	0,75	0,03	0,544	0
70	**Grupo CG**	8147	0,44	0,23	0,00	0,171	0
71	**Grupo CG**	8162	0,38	0,28	0,00	0,204	0
72	**Grupo CG**	9012	0,23	0,03	0,00	0,031	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
73	**Grupo CG**	9104	0,16	0,01	0,00	0,012	0
74	**Grupo CG**	9210	0,12	0,01	0,00	0,014	0
75	**Grupo CG**	Baião	3,29	3,13	0,06	2,2369	1
76	**Grupo CG**	3579	0,69	0,56	0,06	0,4079	1
77	**Grupo CG**	3612	4,03	3,83	0,06	3,1827	1
78	**Grupo CG**	3618	0,90	0,80	0,01	0,6740	1
79	**Grupo CG**	3624	1,69	1,47	0,03	1,2299	1
80	**Grupo CG**	3625	1,24	1,10	0,04	0,9229	1
81	**Grupo CG**	3626	3,90	3,76	0,08	3,1263	1
82	**Grupo CG**	3630	1,45	1,30	0,02	1,0915	1
83	**Grupo CG**	3633	0,20	0,09	0,01	0,0886	1
84	**Grupo CG**	6270	0,79	0,64	0,00	0,5423	1
85	**Grupo CG**	8101	1,16	0,95	0,07	0,7991	1
86	**Grupo CG**	8988	1,67	1,51	0,02	1,2684	1
87	**Grupo CG**	8990	>4	-	-	2,1200	1
88	**Grupo CG**	8995	2,39	2,25	0,05	1,8753	1
89	**Grupo CG**	8998	3,86	3,65	0,07	3,0398	1
90	**Grupo CG**	9000	2,97	2,79	0,08	2,3277	1
91	**Grupo CG**	9103	2,95	2,64	0,06	2,1997	1
92	**Grupo CG**	9203	1,21	1,07	0,00	0,8993	1
93	**Grupo CG**	9206	2,81	2,56	0,06	2,1355	1
94	**Grupo CG**	9207	3,33	3,21	0,07	2,6715	1
95	**Grupo CG**	9213	2,53	2,40	0,07	2,0037	1
96	**Grupo CG**	9214	4,08	2,68	0,04	2,2341	1
97	**Grupo CG**	Luna	2,12	1,88	0,08	1,5746	1
98	**Nhumirim25**	41	0,57	0,07	0,03	0,095	0
99	**Nhumirim25**	302	0,43	0,11	0,01	0,145	0
100	**Nhumirim25**	305	0,21	0,07	0,00	0,096	0
101	**Nhumirim25**	312	0,18	0,02	0,00	0,012	0
102	**Nhumirim25**	313	0,32	0,01	0,00	0,021	0
103	**Nhumirim25**	3326	0,24	0,02	0,01	0,039	0
104	**Nhumirim25**	331	0,16	0,02	0,01	0,039	0
105	**Nhumirim25**	336	0,22	0,02	0,01	0,036	0
106	**Nhumirim25**	347	0,14	0,02	0,01	0,038	0
107	**Nhumirim25**	352	0,16	0,01	0,00	0,031	0
108	**Nhumirim25**	355	0,16	0,01	0,01	0,029	0
109	**Nhumirim25**	356	0,29	0,03	0,02	0,051	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
110	**Nhumirim25**	368	0,17	0,01	0,01	0,029	0
111	**Nhumirim25**	380	0,18	0,00	0,01	0,009	0
112	**Nhumirim25**	386	0,20	0,02	0,00	0,034	0
113	**Nhumirim25**	388	0,50	0,02	0,02	0,043	0
114	**Nhumirim25**	389	0,22	0,01	0,01	0,026	0
115	**Nhumirim25**	392	0,17	0,02	0,01	0,037	0
116	**Nhumirim25**	395	0,13	0,00	0,00	0,012	0
117	**Nhumirim25**	403	0,26	0,00	0,03	0,014	0
118	**Nhumirim25**	411	0,20	0,01	0,00	0,008	0
119	**Nhumirim25**	417	0,23	0,03	0,01	0,015	0
120	**Nhumirim25**	421	0,21	0,06	0,00	0,084	0
121	**Nhumirim25**	428	0,37	0,06	0,00	0,088	0
122	**Nhumirim25**	432	0,30	0,08	0,03	0,122	0
123	**Nhumirim25**	446	0,15	0,01	0,01	0,011	0
124	**Nhumirim25**	447	0,16	0,02	0,00	0,025	0
125	**Nhumirim25**	458	0,25	0,02	0,00	0,025	0
126	**Nhumirim25**	459	0,19	0,02	0,00	0,026	0
127	**Nhumirim25**	464	0,13	0,01	0,00	0,008	0
128	**Nhumirim25**	472	0,16	-0,01	0,00	-0,007	0
129	**Nhumirim25**	475	0,13	0,01	0,01	0,010	0
130	**Nhumirim25**	477	0,13	0,00	0,01	0,006	0
131	**Nhumirim25**	480	0,22	0,02	0,00	0,009	0
132	**Nhumirim25**	481	0,60	0,06	0,01	0,088	0
133	**Nhumirim25**	484	0,14	0,00	0,00	0,005	0
134	**Nhumirim25**	486	0,15	0,01	0,00	0,008	0
135	**Nhumirim25**	487	0,22	0,00	0,01	0,006	0
136	**Nhumirim25**	489	0,14	0,01	0,00	0,015	0
137	**Nhumirim25**	493	0,10	0,01	0,00	0,009	0
138	**Nhumirim25**	494	0,20	0,00	0,01	0,004	0
139	**Nhumirim25**	495	0,18	0,01	0,01	0,010	0
140	**Nhumirim25**	497	0,30	0,05	0,03	0,027	0
141	**Nhumirim25**	498	0,36	0,10	0,01	0,104	0
142	**Nhumirim25**	502	0,47	0,11	0,01	0,109	0
143	**Nhumirim25**	505	0,27	0,05	0,00	0,026	0
144	**Nhumirim25**	509	0,25	0,04	0,01	0,023	0
145	**Nhumirim25**	510	0,30	0,03	0,00	0,042	0
146	**Nhumirim25**	511	0,22	0,03	0,01	0,039	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
147	**Nhumirim25**	513	0,22	0,02	0,01	0,037	0
148	**Nhumirim25**	515	0,27	0,04	0,03	0,053	0
149	**Nhumirim25**	517	0,36	0,07	0,01	0,078	0
150	**Nhumirim25**	520	0,20	0,01	0,01	0,029	0
151	**Nhumirim25**	541	0,23	0,02	0,01	0,031	0
152	**Nhumirim25**	542	0,38	0,02	0,04	0,015	0
153	**Nhumirim25**	543	0,67	0,05	0,01	0,056	0
154	**Nhumirim25**	544	0,25	0,01	0,00	0,021	0
155	**Nhumirim25**	546	0,24	0,01	0,02	0,021	0
156	**Nhumirim25**	548	0,19	0,00	0,01	0,005	0
157	**Nhumirim25**	550	0,36	0,02	0,00	0,036	0
158	**Nhumirim25**	556	0,23	0,01	0,01	0,023	0
159	**Nhumirim25**	557	0,29	0,03	0,03	0,040	0
160	**Nhumirim25**	560	0,29	0,03	0,01	0,017	0
161	**Nhumirim25**	561	0,18	0,02	0,00	0,014	0
162	**Nhumirim25**	562	0,29	0,09	0,00	0,082	0
163	**Nhumirim25**	563	0,31	0,09	0,03	0,090	0
164	**Nhumirim25**	567	0,50	0,13	0,05	0,124	0
165	**Nhumirim25**	572	0,21	0,04	0,00	0,040	0
166	**Nhumirim25**	575	0,18	0,03	0,00	0,032	0
167	**Nhumirim25**	580	0,22	0,03	0,02	0,034	0
168	**Nhumirim25**	583	0,39	0,03	0,04	0,035	0
169	**Nhumirim25**	584	0,27	0,03	0,02	0,032	0
170	**Nhumirim25**	585	0,30	0,03	0,00	0,030	0
171	**Nhumirim25**	586	0,19	0,03	0,00	0,029	0
172	**Nhumirim25**	587	0,22	0,02	0,02	0,013	0
173	**Nhumirim25**	588	0,32	0,02	0,02	0,019	0
174	**Nhumirim25**	589	0,28	0,02	0,01	0,026	0
175	**Nhumirim25**	590	0,36	0,01	0,01	0,016	0
176	**Nhumirim25**	591	0,15	0,02	0,00	0,011	0
177	**Nhumirim25**	592	0,24	0,03	0,02	0,035	0
178	**Nhumirim25**	593	0,27	0,00	0,02	0,001	0
179	**Nhumirim25**	594	0,22	0,02	0,00	0,026	0
180	**Nhumirim25**	595	0,22	0,03	0,00	0,017	0
181	**Nhumirim25**	596	0,26	-0,01	0,03	-0,007	0
182	**Nhumirim25**	597	0,36	0,10	0,03	0,124	0
183	**7coletas**	5098	0,60	0,21	0,05	0,256	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
184	**7coletas**	5101	0,57	0,11	0,00	0,134	0
185	**7coletas**	5104	0,75	0,21	0,03	0,256	0
186	**7coletas**	5105	0,33	0,12	0,03	0,151	0
187	**7coletas**	5108	0,24	0,07	0,01	0,095	0
188	**7coletas**	5114	0,22	0,08	0,01	0,108	0
189	**7coletas**	5120	0,48	0,17	0,03	0,213	0
190	**7coletas**	5123	0,35	0,19	0,02	0,230	0
191	**7coletas**	5125	0,16	0,05	0,00	0,064	0
192	**7coletas**	5132	0,28	0,15	0,01	0,184	0
193	**7coletas**	5136	0,21	0,02	0,01	0,031	0
194	**7coletas**	5141	0,28	0,05	0,01	0,067	0
195	**7coletas**	5142	0,23	0,10	0,00	0,128	0
196	**7coletas**	5147	0,18	0,08	0,00	0,098	0
197	**7coletas**	5152	0,17	0,05	0,01	0,066	0
198	**7coletas**	5172	0,36	0,12	0,03	0,148	0
199	**7coletas**	5178	0,17	0,02	0,00	0,034	0
200	**7coletas**	5179	0,19	0,05	0,00	0,072	0
201	**7coletas**	5180	0,33	0,09	0,02	0,113	0
202	**7coletas**	5189	0,42	0,12	0,01	0,155	0
203	**7coletas**	5193	0,29	0,09	0,00	0,075	0
204	**7coletas**	5194	0,42	0,19	0,01	0,238	0
205	**7coletas**	5196	0,29	0,08	0,00	0,111	0
206	**7coletas**	5197	0,59	0,18	0,05	0,218	0
207	**7coletas**	5199	0,61	0,26	0,01	0,217	0
208	**7coletas**	5201	0,26	0,10	0,01	0,132	0
209	**7coletas**	5204	0,21	0,03	0,00	0,054	0
210	**7coletas**	5211	0,30	0,13	0,02	0,167	0
211	**7coletas**	5213	0,19	0,03	0,02	0,049	0
212	**7coletas**	5218	0,28	0,11	0,00	0,139	0
213	**7coletas**	5220	0,18	0,05	0,00	0,067	0
214	**7coletas**	5225	0,24	0,07	0,03	0,097	0
215	**7coletas**	5226	0,25	0,12	0,01	0,152	0
216	**7coletas**	5230	0,30	0,16	0,01	0,195	0
217	**7coletas**	5244	0,29	0,12	0,00	0,153	0
218	**7coletas**	5249	0,42	0,15	0,03	0,193	0
219	**7coletas**	5254	0,26	0,15	0,00	0,188	0
220	**7coletas**	5261	0,31	0,16	0,00	0,205	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
221	**7coletas**	5263	0,19	0,06	0,01	0,089	0
222	**7coletas**	5264	0,21	0,08	0,00	0,040	0
223	**7coletas**	5266	0,26	0,09	0,02	0,122	0
224	**7coletas**	5267	0,36	0,21	0,03	0,184	0
225	**7coletas**	5269	0,43	0,24	0,00	0,206	0
226	**7coletas**	5273	0,24	0,10	0,01	0,089	0
227	**7coletas**	5288	0,29	0,11	0,00	0,051	0
228	**7coletas**	5296	0,22	0,04	0,02	0,038	0
229	**7coletas**	5310	0,38	0,19	0,01	0,164	0
230	**7coletas**	5316	0,19	0,05	0,01	0,043	0
231	**7coletas**	5355	0,26	0,13	0,02	0,116	0
232	**7coletas**	5359	0,18	0,05	0,02	0,048	0
233	**7coletas**	5360	0,30	0,13	0,01	0,118	0
234	**7coletas**	5362	0,27	0,16	0,00	0,137	0
235	**7coletas**	5368	0,22	0,08	0,02	0,069	0
236	**7coletas**	5383	0,43	0,13	0,03	0,117	0
237	**7coletas**	5387	0,42	0,16	0,00	0,142	0
238	**7coletas**	5391	0,24	0,10	0,00	0,090	0
239	**7coletas**	5396	0,23	0,04	0,02	0,041	0
240	**7coletas**	5410	0,19	0,08	0,01	0,072	0
241	**7coletas**	5412	0,16	0,02	0,00	0,022	0
242	**7coletas**	5420	0,18	0,02	0,00	0,023	0
243	**7coletas**	5421	0,21	0,05	0,02	0,043	0
244	**7coletas**	5424	0,36	0,11	0,02	0,098	0
245	**7coletas**	5428	0,50	0,06	0,03	0,058	0
246	**7coletas**	5435	0,33	0,13	0,01	0,121	0
247	**7coletas**	5439	0,34	0,17	0,00	0,155	0
248	**7coletas**	5447	0,34	0,18	0,03	0,085	0
249	**7coletas**	5448	0,36	0,17	0,02	0,157	0
250	**7coletas**	5462	0,27	0,05	0,00	0,051	0
251	**7coletas**	5463	0,46	0,18	0,00	0,168	0
252	**7coletas**	5464	0,31	0,05	0,03	0,052	0
253	**7coletas**	5473	0,19	0,05	0,00	0,026	0
254	**7coletas**	5780	0,21	0,06	0,00	0,062	0
255	**7coletas**	5781	0,32	0,14	0,01	0,135	0
256	**7coletas**	5786	0,43	0,17	0,03	0,156	0
257	**7coletas**	5788	0,38	0,05	0,03	0,047	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
258	**7coletas**	5795	0,14	0,02	0,00	0,018	0
259	**7coletas**	5805	0,27	0,15	0,01	0,141	0
260	**7coletas**	5808	0,35	0,14	0,02	0,127	0
261	**7coletas**	5809	0,27	0,06	0,02	0,058	0
262	**7coletas**	5816	0,29	0,10	0,00	0,095	0
263	**7coletas**	5828	0,30	0,12	0,01	0,112	0
264	**7coletas**	5829	0,50	0,16	0,02	0,152	0
265	**7coletas**	5833	0,15	-0,02	0,00	-0,010	0
266	**7coletas**	5834	0,68	0,42	0,01	0,472	0
267	**7coletas**	5836	0,30	0,11	0,02	0,118	0
268	**7coletas**	5838	0,62	0,29	0,01	0,330	0
269	**7coletas**	5866	0,23	0,08	0,01	0,037	0
270	**7coletas**	5876	0,40	0,16	0,01	0,178	0
271	**7coletas**	5880	0,96	0,14	0,10	0,156	0
272	**7coletas**	5887	0,31	0,17	0,00	0,191	0
273	**7coletas**	5888	0,26	0,04	0,00	0,037	0
274	**7coletas**	5891	0,35	0,21	0,02	0,231	0
275	**7coletas**	5898	0,20	0,12	0,01	0,134	0
276	**7coletas**	5900	0,36	0,19	0,01	0,211	0
277	**7coletas**	5903	0,25	0,02	0,02	0,012	0
278	**7coletas**	5904	0,41	0,23	0,01	0,261	0
279	**7coletas**	5907	0,33	0,16	0,00	0,174	0
280	**7coletas**	5911	0,41	0,23	0,00	0,264	0
281	**7coletas**	5912	0,39	0,17	0,02	0,194	0
282	**7coletas**	5917	0,29	0,17	0,00	0,188	0
283	**7coletas**	5919	0,28	0,14	0,01	0,156	0
284	**7coletas**	5920	0,26	0,05	0,00	0,050	0
285	**7coletas**	5923	0,32	0,04	0,03	0,040	0
286	**7coletas**	5925	0,26	0,06	0,01	0,065	0
287	**7coletas**	5927	0,71	0,38	0,00	0,524	0
288	**7coletas**	5928	0,40	0,20	0,00	0,278	0
289	**7coletas**	5931	0,33	0,08	0,00	0,113	0
290	**7coletas**	5932	0,28	0,11	0,02	0,092	0
291	**7coletas**	5934	0,56	0,25	0,02	0,341	0
292	**7coletas**	5936	0,15	0,04	0,00	0,055	0
293	**7coletas**	5937	0,23	0,07	0,01	0,103	0
294	**7coletas**	5963	0,35	0,16	0,02	0,222	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
295	**7coletas**	5969	0,31	0,17	0,01	0,233	0
296	**7coletas**	5083	0,86	0,72	0,01	0,9736	1
297	**7coletas**	5084	3,63	3,18	0,15	4,3047	1
298	**7coletas**	5087	1,41	1,11	0,12	1,5108	1
299	**7coletas**	5088	1,56	1,41	0,01	1,9149	1
300	**7coletas**	5089	1,40	1,23	0,01	1,6696	1
301	**7coletas**	5095	2,97	2,84	0,06	3,8480	1
302	**7coletas**	5099	1,61	1,44	0,04	1,9500	1
303	**7coletas**	5116	1,92	1,76	0,00	2,3804	1
304	**7coletas**	5118	0,33	0,18	0,00	0,2554	1
305	**7coletas**	5130	1,71	1,58	0,02	2,1426	1
306	**7coletas**	5140	2,91	2,64	0,01	3,5716	1
307	**7coletas**	5149	1,20	0,99	0,01	1,3392	1
308	**7coletas**	5150	2,76	2,18	0,03	1,4176	1
309	**7coletas**	5184	1,42	1,21	0,01	0,7904	1
310	**7coletas**	5188	3,61	3,33	0,03	2,1645	1
311	**7coletas**	5210	3,44	3,12	0,14	2,0308	1
312	**7coletas**	5224	1,34	1,12	0,04	0,7326	1
313	**7coletas**	5227	3,72	3,27	0,08	2,1278	1
314	**7coletas**	5237	1,19	1,04	0,01	0,6804	1
315	**7coletas**	5242	4,04	3,76	0,09	2,4442	1
316	**7coletas**	5246	1,69	1,50	0,10	0,9763	1
317	**7coletas**	5247	2,02	1,74	0,08	1,1343	1
318	**7coletas**	5250	2,01	1,74	0,03	1,1340	1
319	**7coletas**	5258	2,71	2,58	0,01	1,6801	1
320	**7coletas**	5271	2,24	2,09	0,13	1,3585	1
321	**7coletas**	5274	2,31	2,05	0,10	1,3329	1
322	**7coletas**	5281	4,08	3,60	0,03	2,3413	1
323	**7coletas**	5282	2,81	2,58	0,09	1,6765	1
324	**7coletas**	5285	1,92	1,78	0,04	1,1606	1
325	**7coletas**	5286	3,73	3,55	0,06	2,3086	1
326	**7coletas**	5287	1,04	0,55	0,02	0,3618	1
327	**7coletas**	5291	0,72	0,43	0,05	0,2846	1
328	**7coletas**	5292	1,24	1,01	0,05	0,6596	1
329	**7coletas**	5294	1,22	1,04	0,03	0,7841	1
330	**7coletas**	5298	0,73	0,57	0,03	0,4268	1
331	**7coletas**	5299	3,25	3,09	0,05	2,3350	1

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
332	**7coletas**	5302	2,37	2,14	0,04	1,6129	1
333	**7coletas**	5304	2,66	2,45	0,09	1,8469	1
334	**7coletas**	5307	2,88	2,68	0,04	2,0227	1
335	**7coletas**	5312	1,38	0,93	0,01	0,6994	1
336	**7coletas**	5314	1,71	1,56	0,03	1,1796	1
337	**7coletas**	5315	1,67	1,41	0,04	1,0643	1
338	**7coletas**	5318	2,70	2,41	0,06	1,8174	1
339	**7coletas**	5320	4,06	3,91	0,02	2,9516	1
340	**7coletas**	5322	2,35	2,15	0,05	1,6257	1
341	**7coletas**	5326	0,86	0,71	0,03	0,5323	1
342	**7coletas**	5331	1,65	1,53	0,04	1,1527	1
343	**7coletas**	5332	2,69	2,46	0,08	1,8552	1
344	**7coletas**	5334	1,94	1,75	0,08	1,3210	1
345	**7coletas**	5335	2,91	2,73	0,08	2,0635	1
346	**7coletas**	5337	1,00	0,86	0,05	0,6510	1
347	**7coletas**	5338	2,56	2,40	0,00	1,8091	1
348	**7coletas**	5341	2,88	2,67	0,17	2,0132	1
349	**7coletas**	5343	1,59	1,41	0,05	1,0650	1
350	**7coletas**	5344	2,39	1,94	0,04	1,3896	1
351	**7coletas**	5345	1,83	1,63	0,00	1,1688	1
352	**7coletas**	5347	3,53	3,35	0,00	2,3935	1
353	**7coletas**	5356	3,17	2,91	0,20	2,0812	1
354	**7coletas**	5357	0,69	0,54	0,01	0,3953	1
355	**7coletas**	5365	3,92	3,59	0,03	2,5623	1
356	**7coletas**	5366	1,86	1,66	0,10	1,1923	1
357	**7coletas**	5371	2,16	0,68	0,06	0,4915	1
358	**7coletas**	5373	1,42	1,22	0,04	0,8793	1
359	**7coletas**	5375	1,75	1,59	0,01	1,1435	1
360	**7coletas**	5379	1,04	0,82	0,01	0,5954	1
361	**7coletas**	5380	>4	-	-	2,1200	1
362	**7coletas**	5385	0,71	0,55	0,01	0,4031	1
363	**7coletas**	5390	1,84	1,68	0,00	1,2076	1
364	**7coletas**	5392	2,09	1,84	0,01	1,3180	1
365	**7coletas**	5393	2,00	1,75	0,05	1,2582	1
366	**7coletas**	5398	2,17	1,90	0,02	1,3583	1
367	**7coletas**	5403	3,59	3,43	0,04	2,4487	1
368	**7coletas**	5405	1,53	1,41	0,01	1,0146	1

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
369	**7coletas**	5407	1,12	0,92	0,06	0,6606	1
370	**7coletas**	5408	2,04	0,62	0,17	0,4728	1
371	**7coletas**	5409	3,12	2,91	0,04	2,1143	1
372	**7coletas**	5411	3,38	3,19	0,04	2,3189	1
373	**7coletas**	5415	4,00	3,83	0,01	2,7790	1
374	**7coletas**	5436	2,88	2,71	0,09	1,9692	1
375	**7coletas**	5443	0,58	0,36	0,04	0,2678	1
376	**7coletas**	5446	1,36	1,22	0,03	0,8861	1
377	**7coletas**	5449	0,69	0,51	0,01	0,3705	1
378	**7coletas**	5465	1,20	0,75	0,04	0,5508	1
379	**7coletas**	5468	2,77	2,46	0,04	1,7917	1
380	**7coletas**	5476	2,38	2,16	0,00	1,5700	1
381	**7coletas**	5486	3,54	3,41	0,01	2,4800	1
382	**7coletas**	5771	1,94	1,77	0,09	1,2870	1
383	**7coletas**	5774	0,30	0,21	0,02	0,1524	1
384	**7coletas**	5779	2,84	2,60	0,06	1,8890	1
385	**7coletas**	5789	3,80	3,57	0,01	2,5958	1
386	**7coletas**	5797	2,24	1,99	0,06	1,4507	1
387	**7coletas**	5798	2,98	2,85	0,03	2,0708	1
388	**7coletas**	5799	1,59	1,41	0,04	1,0261	1
389	**7coletas**	5810	0,58	0,42	0,02	0,3081	1
390	**7coletas**	5811	1,56	1,35	0,06	0,9826	1
391	**7coletas**	5817	1,47	1,13	0,03	0,8208	1
392	**7coletas**	5818	1,10	0,82	0,03	0,6417	1
393	**7coletas**	5823	3,27	2,48	0,00	1,9463	1
394	**7coletas**	5825	1,73	1,60	0,09	1,2505	1
395	**7coletas**	5843	2,32	1,98	0,07	1,5551	1
396	**7coletas**	5844	2,43	2,08	0,06	1,6292	1
397	**7coletas**	5854	3,33	3,08	0,08	2,4147	1
398	**7coletas**	5855	3,68	3,37	0,09	2,6445	1
399	**7coletas**	5878	0,96	0,82	0,00	0,6433	1
400	**7coletas**	5881	2,24	2,12	0,02	1,6633	1
401	**7coletas**	5883	0,45	0,33	0,00	0,2560	1
402	**7coletas**	5889	4,07	2,71	0,00	2,1219	1
403	**7coletas**	5895	1,46	1,33	0,03	1,0455	1
404	**7coletas**	5896	1,88	1,60	0,02	1,2513	1
405	**7coletas**	5905	1,94	1,77	0,12	1,3834	1

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
406	**7coletas**	5913	1,00	0,81	0,03	0,6323	1
407	**7coletas**	5916	>4	-	-	2,1200	1
408	**7coletas**	5939	1,27	1,08	0,05	0,8483	1
409	**7coletas**	5940	2,58	2,37	0,07	1,8581	1
410	**7coletas**	5942	3,94	3,20	0,10	2,5045	1
411	**7coletas**	5945	3,47	3,29	0,02	2,5747	1
412	**7coletas**	5946	1,50	1,32	0,01	1,0337	1
413	**7coletas**	5947	1,77	1,18	0,01	0,9858	1
414	**7coletas**	5952	1,25	1,10	0,01	0,9191	1
415	**7coletas**	5958	2,55	2,38	0,07	1,9796	1
416	**7coletas**	5959	2,41	2,02	0,20	1,6853	1
417	**7coletas**	5966	2,93	2,46	0,13	2,0488	1
418	**7coletas**	5970	2,36	2,11	0,01	1,7616	1
419	**7coletas**	5973	1,54	1,02	0,08	0,8470	1
420	**7coletas**	5975	2,85	2,71	0,10	2,2543	1
421	**7coletas**	5977	2,08	1,94	0,04	1,6136	1
422	**7coletas**	5984	3,59	3,47	0,05	2,8925	1
423	**7coletas**	5988	2,83	2,68	0,01	2,2343	1
424	**7coletas**	5989	1,07	0,70	0,05	0,5861	1
425	**7coletas**	5993	1,71	1,54	0,03	1,2851	1
426	**7coletas**	5995	2,51	2,35	0,02	1,9566	1
427	**7coletas**	5997	4,03	3,76	0,06	3,1371	1
428	**FMVZ2026**	272726	0,30	0,05	0,03	0,042	0
429	**FMVZ2026**	289273	0,17	0,03	0,00	0,032	0
430	**FMVZ2026**	287043	0,15	0,04	0,01	0,034	0
431	**FMVZ2026**	289274	0,16	0,02	0,00	0,021	0
432	**FMVZ2026**	259904	0,16	0,03	0,01	0,031	0
433	**FMVZ2026**	279425	0,16	0,01	0,00	0,023	0
434	**FMVZ2026**	202155	0,12	0,00	0,00	0,018	0
435	**FMVZ2026**	151915	0,13	0,00	0,00	0,007	0
436	**FMVZ2026**	296023	0,13	0,00	0,01	0,013	0
437	**FMVZ2026**	292141	0,11	0,00	0,00	0,014	0
438	**FMVZ2026**	296022	0,15	0,00	0,00	0,017	0
439	**FMVZ2026**	226410	0,20	0,02	0,01	0,019	0
440	**FMVZ2026**	200478	0,16	0,00	0,01	0,013	0
441	**FMVZ2026**	174831	0,16	0,00	0,01	0,015	0
442	**FMVZ2026**	226351	0,81	0,10	0,03	0,092	0

No	Grupo	Amostra	DO	DO sem branco	Coeficiente de variação	IP	IDGA
443	**FMVZ2026**	271279	0,17	0,01	0,00	0,012	0
444	**FMVZ2026**	172650	0,10	0,00	0,00	0,009	0
445	**FMVZ2026**	176759	0,17	0,01	0,00	0,020	0
446	**FMVZ2026**	149292	0,72	0,07	0,03	0,052	0
447	**FMVZ2026**	279528	0,25	0,01	0,01	0,015	0
448	**FMVZ2026**	282774	0,23	0,02	0,00	0,019	0
449	**FMVZ2026**	274.353	0,28	0,07	0,03	0,037	0
450	**FMVZ2026**	270.132	0,50	0,13	0,05	0,068	0
451	**FMVZ2026**	270.134	0,35	0,04	0,02	0,026	0
452	**FMVZ2026**	269.530	0,15	0,00	0,00	0,010	0
453	**FMVZ2026**	283.805	0,24	0,02	0,02	0,014	0
454	**FMVZ2026**	272.004	0,22	0,02	0,02	0,015	0
455	**FMVZ2026**	Rosilha	0,39	0,06	0,04	0,035	0
456	**FMVZ2026**	282.773	0,20	0,01	0,00	0,017	0
457	**FMVZ2026**	270.136	0,17	0,00	0,01	0,004	0
458	**FMVZ2026**	293.172	0,11	0,00	0,00	0,006	0

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Apêndice D: Valores de Índice de Positividade (IP) das 80 amostras de campo da Fazenda Nhumirim avaliadas no teste ELISA. Todas as amostras são negativas

No	AMOSTRA	IP
1	41	0,04
2	302	0,03
3	305	0,03
4	312	0,05
5	313	0,07
6	326	0,01
7	336	0,01
8	347	0,01
9	352	0,01
10	355	0,01
11	356	0,01
12	368	0,01
13	380	0,01
14	386	0,01
15	388	0,01
16	389	0,01
17	392	0,01
18	395	0,01
19	403	0,00
20	417	0,00
21	421	-0,01
22	428	0,04
23	432	0,04
24	446	0,02
25	447	0,03
26	458	0,02
27	459	0,01
28	464	0,01
29	472	0,01
30	475	0,01
31	477	0,01
32	480	0,01
33	481	0,02
34	484	0,01
35	486	0,01
36	489	0,01
37	493	0,01
38	494	0,01
39	495	0,01
40	497	0,01
41	498	0,01
42	502	0,01
43	505	0,03
44	509	0,03
45	510	0,04
46	511	0,08
47	513	0,01
48	515	0,01
49	517	0,02
50	520	0,01
51	541	0,00
52	542	0,00
53	543	0,02
54	544	0,01
55	546	0,01
56	548	0,01
57	556	0,01
58	557	0,01
59	560	0,01
60	561	0,01
61	562	0,01
62	563	0,00
63	567	0,02
64	572	0,04
65	575	0,03
66	580	0,04
67	583	0,06
68	584	0,02
69	586	0,01
70	587	0,02
71	588	0,03
72	589	0,01
73	590	0,01
74	591	0,01
75	592	0,01
76	593	-0,05
77	594	0,01
78	595	0,01
79	596	0,00
80	597	0,00

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Apêndice E: Resultados de Índice de Positividade (IP) no ensaio iELISA em amostras de campo persistentemente soronegativas com histórico de detecção molecular por PCR do município de Uruguaiana, RS (n=32) *(IDGA/PCR Negativo=0; Positivo=1)*

No	Equino	AMOSTRA	IP	IDGA	PCR
1	Equino 1	#1 - 208	0,0021	0	0
2		#1 - 277	0,0249	0	1
3		#1 - 407	0,0196	0	0
4		#1 - 498	0,0095	0	1
5	Equino 2	#2 - 82	-0,0011	0	0
6		#2 - 109	-0,0016	0	0
7		#2 - 144	0,0042	0	1
8		#2 - 208	-0,0137	0	1
9	Equino 4	#4 - 277	0,0135	0	1
10		#4 - 407	0,0382	0	0
11		#4 - 498	0,0319	0	1
12		#4 - 573	0,0339	0	1
13	Equino 5	#5 - 0	0,0044	0	1
14		#5 - 40	0,0044	0	0
15		#5 - 82	0,0044	0	0
16		#5 - 109	0,0019	0	1
17	Equino 6	#6 - 208	-0,0109	0	1
18		#6 - 277	-0,0039	0	0
19		#6 - 407	0,0193	0	1
20		#6 - 498	0,0450	0	0
21	Equino 8	#8 - 109	-0,0103	0	0
22		#8 - 144	0,0039	0	1
23		#8 - 208	-0,0109	0	1
24		#8 - 277	-0,0128	0	0
25	Equino 9	#9 - 144	0,0446	0	1
26		#9 - 208	0,0223	0	1
27		#9 - 277	0,0066	0	0
28		#9 - 407	0,0818	0	0
29	Equino 10	#10 - 144	0,0050	0	1
30		#10 - 208	0,0124	0	1
31		#10 - 277	-0,0017	0	0
32		#10 - 407	0,0330	0	0

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Apêndice F: Resultados de Índice de Positividade (IP) no ensaio ELISA em amostras de campo negativas (IDGA) do município de Uruguaiana, RS (n=36) (IDGA Negativo=0)

No	AMOSTRA	IP	IDGA	No	AMOSTRA	IP	IDGA
1	CAM 35	0,0958	0	**19**	CAM 64	0,0077	0
2	CAM 36	0,0388	0	**20**	CAM 66	0,0111	0
3	CAM 38	0,0083	0	**21**	CAM 67	0,0227	0
4	CAM 40	0,0363	0	**22**	CAM 69	0,0339	0
5	CAM 45	0,0339	0	**23**	CAM 70	0,0121	0
6	CAM 47	0,0743	0	**24**	CAM 71	0,0116	0
7	CAM 49	0,0545	0	**25**	CAM 72	0,0213	0
8	CAM 50	0,0479	0	**26**	CAM 73	0,0706	0
9	CAM 53	0,0537	0	**27**	CAM 74	0,0145	0
10	CAM 55	0,0167	0	**28**	CAM 75	0,0508	0
11	CAM 56	0,0283	0	**29**	CAM 77	0,0042	0
12	CAM 57	0,0103	0	**30**	CAM 78	0,0053	0
13	CAM 58	0,0604	0	**31**	CAM 80	0,0095	0
14	CAM 59	-0,0083	0	**32**	CAM 82	0,0042	0
15	CAM 60	0,0103	0	**33**	CAM 84	-0,0058	0
16	CAM 61	0,0257	0	**34**	CAM 85	0,0159	0
17	CAM62	-0,0013	0	**35**	CAM 86	0,0048	0
18	CAM63	0,0225	0	**36**	CAM 87	0,0074	0

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Apêndice G: Resultados de Índice de Positividade (IP) no ensaio ELISA em amostras de campo positivas (IDGA) do município de Uruguaiana, RS (n=16) (IDGA Positivo=1)

No	Amostra	IP	IDGA
1	AIE+ 1	0,0740	1
2	AIE+ 2	0,3966	1
3	AIE+ 3	2,1290	1
4	AIE+ 4	1,8921	1
5	AIE + 5	2,7658	1
6	AIE + 6	1,3019	1
7	AIE + 7	0,4093	1
8	AIE + 8	0,8955	1
9	AIE+ 9	0,1175	1
10	AIE+ 10	0,2704	1
11	AIE+ 11	0,0122	1
12	AIE+ 12	1,7142	1
13	AIE+ 13	0,9249	1
14	AIE+ 14	0,4913	1
15	AIE+ 15	0,3196	1
16	AIE+ 16	1,4789	1

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Valores de Índice de Positividade (IP) obtidos no iELISA para amostras séricas reagentes na Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA=1). O ponto de corte (*cutoff*) adotado foi IP > 0,247. Em destaque com bordas reforçadas em negrito estão indicadas as amostras divergentes não reagentes no iELISA (IP ≤ 0,247).