

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 93

ISSN 1981-7215
Dezembro, 2009

ELISA rgp90 – Metodologia Alternativa para o Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal





ISSN 1981-7215
Dezembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

***Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 93***

**ELISA rgp90 – Metodologia Alternativa
para o Diagnóstico da Anemia Infecçiosa
Equina no Pantanal**

Márcia Furlan Nogueira
Aparecida Amorim da Costa Neto
Raquel Soares Juliano
Carlos José Sousa Santos
Elisa de Souza Montezuma
Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Corumbá - MS
2009

Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa,
Exemplares desta publicação podem ser solicitados à Embrapa Pantanal

Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, 1.880 - Caixa Postal 109
79320-900 Corumbá, MS
Fax: (67) 3234-5800
Telefone: (67) 3234-5815
Home page: www.cpap.embrapa.br
Email: sac@cpap.embrapa.br

Comitê de Publicações:

Presidente: *Thierry Ribeiro Tomich*
Secretário-Executivo: *Suzana Maria de Salis*
Membros: *Débora Fernandes Calheiros*
Marçal Henrique Amici Jorge
Jorge Antônio Ferreira de Lara
Secretária: *Regina Célia Rachel*
Supervisor editorial: *Suzana Maria de Salis*
Normalização bibliográfica: *Viviane de Oliveira Solano*
Tratamento de ilustrações: *Regina Célia Rachel*
Foto da capa: *Márcia Furlan Nogueira*
Editoração eletrônica: *Regina Célia Rachel*
Disponibilização na home page: *Luiz Edevaldo Macena de Britto*

1ª edição

Versão on line (2009)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP
Embrapa Pantanal

Eliza rpg90 – metodologia alternativa para o diagnóstico da anemia infecciosa eqüina no Pantanal./ Márcia Furlan Nogueira [et al]... – Dados eletrônicos –. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009.

18 p. (Boletim de Pesquisa / Embrapa Pantanal, ISSN 1981-7215; 93).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=BP93

Título da página da Web (acesso em 30 de dezembro 2009)

1. Equinos 2. Imunização. 3. Soro. 4. Vírus. 5. Pantanal. I. Nogueira, Márcia Furlan. II. Costa Neto, Aparecida Amorim da. III. Juliano, Raquel Soares. IV. Santos, Carlos José Souza. V. Montezuma, Elisa de Souza. VI. Reis, Jenner Karlisson Pimenta. VII. Série. VIII. Embrapa Pantanal.

CDD 636.10981(21. ed.)

© Embrapa 2009

Sumário

	Pág.
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados.....	11
Discussão.....	15
Conclusões.....	17
Referências	17

ELISA rgp90 – metodologia alternativa para o diagnóstico da anemia infecciosa equina no Pantanal

Márcia Furlan Nogueira¹

Aparecida Amorim da Costa Neto²

Raquel Soares Juliano³

Carlos José Sousa Santos⁴

Elisa de Souza Montezuma⁵

Jenner Karlisson Pimenta dos Reis⁶

Resumo

Como teste oficial para diagnóstico da anemia infecciosa equina (AIE), a política governamental brasileira para prevenção e controle da AIE determina que seja usado o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com a proteína p26 do capsídeo viral como antígeno. A Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) afirma que a IDGA e os testes de imunoadsorção enzimática (ELISAs) são ambos testes acurados e confiáveis, classificando os últimos como testes alternativos. Internacionalmente, há quatro ELISAs disponíveis, três usando a p26, e um a p26 e a gp45, um antígeno da transmembrana viral. Pesquisadores brasileiros desenvolveram um ELISA indireto com uma glicoproteína recombinante da superfície viral, a rgp90. Anticorpos contra a gp90 são usualmente detectados antes dos anticorpos contra a p26, e quando os níveis de replicação viral são extremamente baixos. O objetivo deste estudo preliminar foi comparar o desempenho do ELISA rgp90 com a oficialmente aceita IDGA utilizando a p26, em amostras de equídeos do Pantanal. Amostras de soro de 173 equinos e 24 muares de serviço, provenientes de 11 propriedades das sub-regiões do Paraguai, Paiaguás e Nhecolândia, foram submetidas a ambos os testes. Nove (5,2%) amostras de equinos e uma (4,2%) de muar apresentaram resultado indeterminado pelo ELISA rgp90, sendo todas as dez positivas na IDGA. As taxas de prevalência em equinos foram 58,4% (n = 101) em ambos os testes, com 2,9% (n = 5) positivos pela IDGA e negativos pelo ELISA rgp90, enquanto outros 2,9% (n = 5) foram negativos no primeiro e positivos no segundo teste. Em muares, as taxas de prevalência foram 45,8% (n = 11) pela IDGA e 37,5% (n = 9) pelo ELISA rgp90. Para equinos e muares, respectivamente, as taxas de copositividade foram 95,0% e 81,8%, de conegatividade 92,1% e 100,0% e de concordância 93,9% e 91,3%. Amostras positivas pelo ELISA rgp90 e negativas pela IDGA poderiam refletir infecção recente. Desde que a rgp90 utilizada é baseada na sequência da estirpe protótipo do vírus da AIE, uma explicação plausível para amostras negativas pelo ELISA rgp90 e positivas pela IDGA poderia ser uma mutação do gene *env* nas estirpes do Pantanal. Os resultados obtidos, a sensibilidade e a facilidade em processar muitas amostras em um curto período de tempo indicam que o ELISA rgp90 é uma boa metodologia alternativa a ser empregada na triagem de rotina de plantéis testados inicialmente pela IDGA e que têm a intenção de manter o status de controlados para AIE.

Termos para indexação: equídeo, muar, AIE, retrovírus, IDGA, sorologia

¹ Médica Veterinária, Dra., Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro 1880, 79320-900, Corumbá, MS. furlan@cpap.embrapa.br

² Médica Veterinária, Fiscal Estadual Agropecuária, LADDAN – IAGRO/MS, Av. Senador Filinto Müller, 1146, Vila Ipiranga, 79074-902. Campo Grande, MS. costanneto@hotmail.com

³ Médica Veterinária, Dra., Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro 1880, 79320-900, Corumbá, MS. raquel@cpap.embrapa.br

⁴ Assistente de Pesquisa, Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro 1880, 79320-900, Corumbá, MS. csantos@cpap.embrapa.br

⁵ Acadêmica da UFMS e estagiária da Embrapa Pantanal, Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro 1880, 79320-900, Corumbá, MS. elisa_teka@hotmail.com

⁶ Farmacêutico, Prof. Dr. da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-000, Belo Horizonte, MG. jenner@coltec.ufmg.br

ELISA rgp90 As An Alternative Methodology To Diagnose Equine Infectious Anemia In Southern Pantanal, Brazil

Abstract

As the official diagnostic test for equine infectious anemia (EIA), The Brazilian governmental policy for prevention and control of EIA determines to be used the agar gel immunodiffusion (AGID) test with p26 core protein as antigen. The World Organisation for Animal Health (OIE) states that AGID and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are both accurate and reliable tests, classifying the later as alternative tests. Internationally, there are four ELISAs available, three using p26, and one p26 and gp45, the viral transmembrane antigen. Brazilian researchers developed an indirect ELISA with a recombinant glycoprotein of the viral surface, the rgp90. Antibodies against the gp90 are usually detected before the antibodies against p26, and when the viral replication levels are extremely low. The aim of this preliminary work was to compare the performance of the ELISA rgp90 with the officially accepted AGID p26, in samples of equidae from Pantanal. Serum samples of 173 working horses and 24 working mules from 11 farms of the Pantanal sub-regions of Paraguai, Paiaguás and Nhecolândia were submitted to both tests. Nine (5.2%) equine and one (4.2%) mule samples were in the undetermined range of ELISA rgp90, testing all ten positive in the AGID. Prevalence rates in equines were 58.4% (n = 101) in both tests, though 2.9% (n = 5) were positive by AGID and negative by ELISA rgp90, while other 2.9% (n = 5) were negative in the first and positive in the second assay. In mules, prevalence rates were 45.8% (n = 11) by AGID and 37.5% (n = 9) by ELISA rgp90. For equines and mules, respectively, the copositivity rates were 95.0% and 81.8%, conegativity rates were 92.1% and 100.0%, and agreement rates were 93.9% and 91.3%. Samples positive by ELISA rgp 90 and negative by AGID could reflect recent infection. Since the used rgp 90 is based in a sequence from the prototype strain of the EIA virus, one reasonable explanation for samples negative by ELISA rgp 90 and positive by AGID would be a mutation of the env gene in the local strains. The obtained results, and its sensitivity and facility to process several samples in a short period of time, indicate that the ELISA rgp 90 is a good alternative methodology to be employed in the routine screening of herds tested once by AGID and that intend to keep the status of controlled for EIA.

Index terms: *equidae, mule, EIA, retrovirus, IDGA, sorology.*

Introdução

Dentre as doenças que causam impacto na equideocultura, a anemia infecciosa equina (AIE) ocorre no mundo todo e é causada por um *Lentivirus*, gênero da família *Retroviridae*, a qual também inclui os agentes do *maedi-visna*, da artrite-encefalite caprina, da leucose enzoótica bovina e da síndrome da imunodeficiência adquirida humana. A infecção é limitada aos equídeos e caracterizada por episódios febris recorrentes, trombocitopenia, anemia, perda de peso e edema das regiões ventrais, tendendo a tornar-se inaparente se a morte não ocorrer em fases de agudização dos sinais clínicos. Uma vez o animal portador do vírus, seu sangue permanecerá infectante pelo resto de sua vida. A transmissão ocorre pela transferência do sangue de um animal infectado para outro não infectado, o que pode ocorrer pelo compartilhamento de agulhas, utensílios, através de vetores artrópodes ou *in utero* (OIE, 2008).

As Normas para a Prevenção e o Controle da Anemia Infecciosa Equina - A.I.E., no Brasil, estão contidas na Instrução Normativa nº 45, de 15 de junho de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Neste documento, determina-se que para o diagnóstico da AIE seja utilizada a prova sorológica da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com o antígeno p26 (COGGINS; NORCROSS, 1970), ou outra oficialmente reconhecida, porém ainda não houve o reconhecimento oficial de outra prova sorológica. Este exame, com resultado negativo, é imprescindível para o trânsito de animais e sua participação em eventos. Um equídeo sorologicamente positivo deve ser sacrificado ou abatido, sem indenização, sendo que o isolamento somente será permitido para animais portadores localizados em área de alto risco, como é o caso do Pantanal.

No Brasil, não há uma estatística oficial da prevalência da AIE nos Estados, uma vez que os dados de frequência referem-se exclusivamente aos exames laboratoriais realizados para o trânsito interestadual e/ou participação em eventos agropecuários controlados pelos serviços oficiais. No Pantanal, Silva (1976), em 613 equídeos de núcleos registrados na ABCCP, encontrou 48,9% de positividade, utilizando o método da IDGA. Considerando-se apenas os 236 equinos de serviço e 27 asininos e muares, as taxas foram de 66,9% e 11,1%, respectivamente. Quase duas décadas depois, no período de 1990 a 1995, foram testados 3285 equinos de 28 fazendas nas sub-regiões da Nhecolândia, Paraguai e Nabileque, pelo mesmo método (SILVA et al., 1999). A prevalência média encontrada foi de 24,84% e, em animais de serviço, 18,17%. Asininos e muares não foram incluídos neste estudo. Segundo Silva (2004)⁷, a maior porcentagem de focos (propriedades onde houver um equídeo positivo) e casos de AIE no Mato Grosso do Sul estão na região do Pantanal e Peripantanal. Até o mês de novembro daquele ano, apenas os exames obrigatórios para trânsito revelaram 147 focos e 596 casos de equídeos positivos na planície pantaneira, contra 109 focos e 158 casos, na região do Planalto.

Para o diagnóstico da AIE, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008) afirma que tanto a IDGA como o ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, ou ensaio de imunoadsorção enzimática) são testes sorológicos acurados e confiáveis para a detecção de anticorpos contra o vírus da AIE em cavalos, exceto em estágios muito iniciais da infecção ou em potros nascidos de éguas positivas. Nestes dois últimos casos, resultados falsos-negativos e falsos-positivos, respectivamente, podem ocorrer em ambos os testes. Há três ELISAs aprovados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, um competitivo e outro não competitivo, utilizando a proteína interna p26 como antígeno, e um terceiro não competitivo utilizando os antígenos p26 e gp45 (glicoproteína transmembrana).

⁷ SILVA, N. L. da. **Situação atual da anemia infecciosa equina Mato Grosso do Sul**: apresentação. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por furlan@cpap.embrapa.br em 10 dez. 2004.

Um ELISA indireto utilizando como antígeno a glicoproteína gp90 recombinante (ELISA rgp90), glicoproteína do envelope viral, foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os anticorpos anti-gp90 são usualmente detectados antes dos anticorpos anti-p26 e em situações em que são extremamente baixos os níveis de replicação viral. A IDGA, embora simples e de alta especificidade, é uma prova cujo resultado é lido em 48 horas, são processadas apenas 9 amostras por lâmina, o volume de antígeno utilizado é considerável e a leitura, em casos que possam gerar dúvidas, torna-se uma questão subjetiva.

Comparativamente, no ELISA rgp90 haveria detecção precoce da soroconversão, alta sensibilidade, maior rapidez e menor custo dos exames, e objetividade na leitura dos resultados (REIS, 1997).

Qualquer teste diagnóstico deve ser avaliado na situação epidemiológica a qual deverá ser aplicado, como recomenda o capítulo 1.1.3 (Princípios de validação de ensaios diagnósticos para doenças infecciosas) do Manual da OIE, versão *on-line*. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o desempenho do ELISA rgp90 como metodologia alternativa no diagnóstico de anticorpos contra o vírus da AIE em amostras de soro de equídeos de serviço do Pantanal Mato-Grossense-do-Sul.

Material e Métodos

Coleta das amostras

As amostras de sangue foram coletadas de equídeos de serviço em 11 fazendas do Pantanal (Figura 1), nas sub-regiões do Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia e Nabileque, no período de julho de 2007 a julho de 2008. Dentre os 197 animais estudados, 173 (87,8%) eram equinos e 24 (12,2%), muares.

O sangue foi coletado por punção jugular, a vácuo, em tubos sem aditivos, com agulhas 25x8. Após a formação do coágulo e, eventualmente, centrifugação quando as condições do local permitiam, o soro foi retirado e acondicionado em microtubos de polipropileno de 1,5 ml. As amostras de soro permaneceram refrigeradas até chegarem ao Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Pantanal, quando então foram armazenadas em freezer a -20°C.

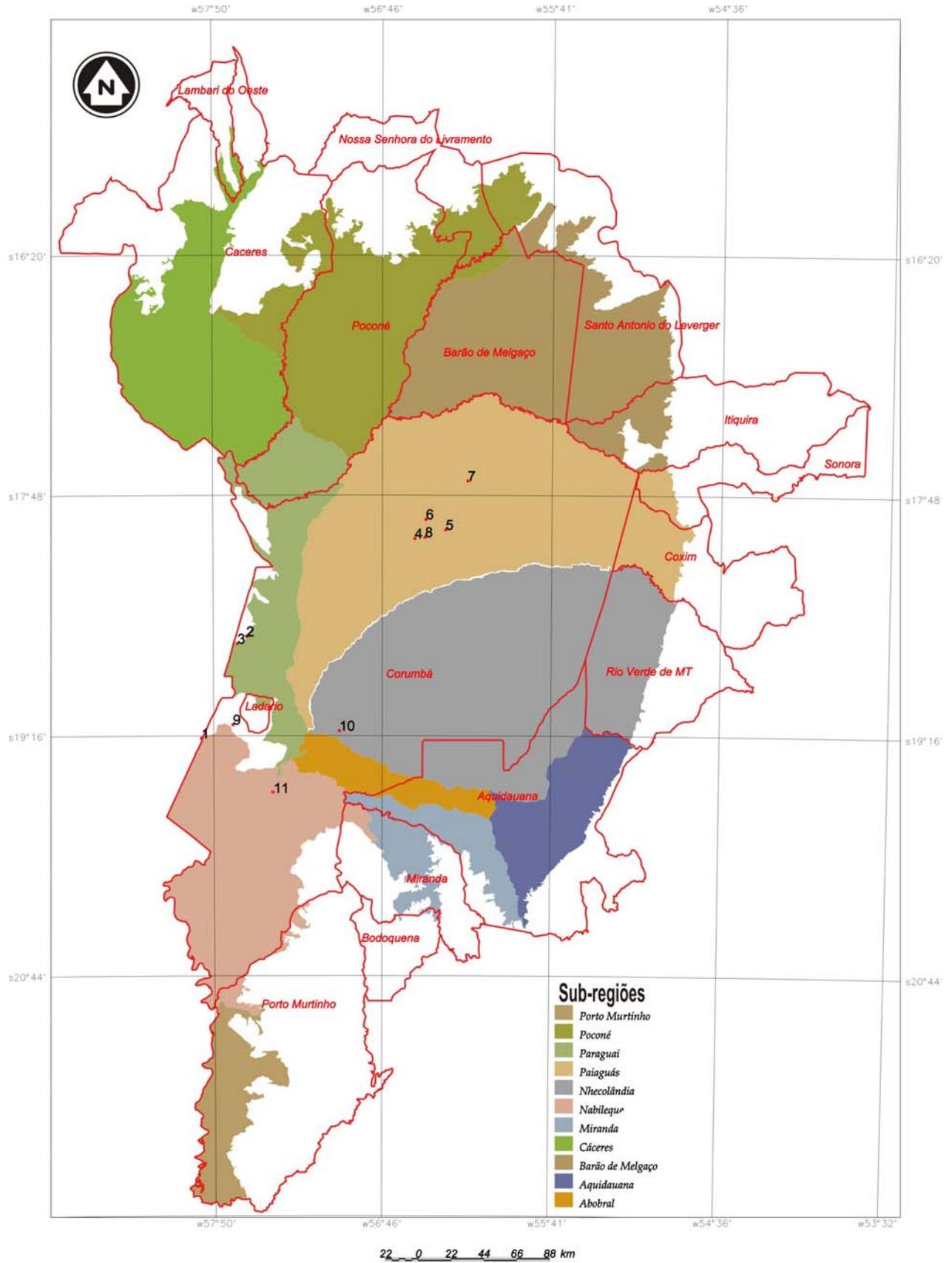


Figura 1. Localização das fazendas onde as amostras de sangue de equídeos foram coletadas, adaptado de Silva e Abdon (1998).

ELISA rgp90

O ELISA rgp 90 foi realizado no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Pantanal, de acordo com Reis (1997), conforme descrito a seguir:

1. Adsorção do antígeno e bloqueio: a rgp90 foi diluída em tampão carbonato 50 mM, pH 9,6, na concentração de 5 µg/ml e aplicou-se 100 µl por cavidade desta solução em microplacas de 96 cavidades de fundo chato (Nunc Maxisorp®). As microplacas foram incubadas por 18 horas a 4°C e então lavadas por duas vezes com a solução de lavagem, constituída de solução salina fosfatada tamponada e Tween 20 a 0,05%, pH 7,6 (PBS-Tween). Posteriormente, adicionou-se 200 µl por cavidade da solução de bloqueio constituída de PBS-Tween mais 5% de leite em pó desnatado e incubou-se a microplaca por no mínimo uma hora, à temperatura ambiente (em torno de 25°C, ambiente sob refrigeração). Realizaram-se mais três lavagens.

2. Aplicação do soro a ser testado: os soros a serem testados, após homogeneização, foram diluídos separadamente em microplaca de fundo redondo, na proporção de 1:50 em solução de diluição PBS Tween mais 1% de leite em pó desnatado (4 µl de soro em 196 µl de solução). Após homogeneização da solução, 100 µl desta foram transferidos para a microplaca contendo o antígeno, a qual foi incubada por uma hora à temperatura ambiente e, em seguida, lavada por três vezes. A placa utilizada para a diluição do soro foi descartada.

3. Aplicação do anti-anticorpo conjugado com enzima: o antisoro de coelho conjugado com peroxidase, coelho anti IgG equina e peroxidase (Sigma), foi diluído na proporção de 1:25.000 em solução salina fosfatada tamponada. Foram aplicados 100 µl / cavidade da solução de conjugado na microplaca e esta incubada por uma hora à temperatura ambiente. Novamente três lavagens foram efetuadas.

4. Adição do substrato da enzima e do cromógeno: o cromógeno, ortofenilenodiamino (OPD) (Sigma), foi diluído na proporção de 0,5 mg/ml em tampão fosfato citrato, pH 5,0, ao qual acrescentou-se 6 µl de peróxido de hidrogênio 30%. Adicionou-se 100 µl por cavidade da solução e a placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente sob refrigeração, na ausência de luz. A reação foi interrompida com 40 µl, por cavidade, de solução de ácido sulfúrico 3 M, e a intensidade da cor resultante lida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm.

Em cada microplaca, foram reservadas duas cavidades sem soro teste, tomadas como o “branco” da reação, duas cavidades para o controle positivo e duas para o controle negativo, estes provenientes de animais sabidamente positivo e negativo, respectivamente, e com valor de leitura da densidade óptica (DO) conhecido. Os soros controle positivo e negativo foram cedidos pelo Laboratório de Retrovíruses, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as amostras foram testadas em duplicata, subtraídas do “branco” e a média dos valores de leitura obtidos corrigida de acordo com o fator de correção para o valor pretendido do controle positivo. Amostras com 20% ou mais de coeficiente de variação entre as leituras da duplicata foram novamente testadas. Os valores de *cut-off* foram aqueles determinados por Martins (2004), considerando-se negativas amostras com DO até 0,219, indeterminadas aquelas na faixa de 0,220 a 0,263 e positivas aquelas com leituras superiores.

IDGA com p26

A IDGA foi realizada no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais e Análise de Alimentos (LADDAN), da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), utilizando-se o *kit* para Teste de Imunodifusão produzido pelos Laboratórios Bruch, de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados positivos foram, em relação à intensidade com que as linhas de precipitação eram visualizadas, classificados em fortemente positivas (+ + +), medianamente positivas (+ +) e fracamente positivas (+).

Análise dos resultados

Calcularam-se as prevalências de animais soropositivos obtidas com ambos os testes. Os resultados obtidos no ELISA rgp90 foram comparados aos obtidos na IDGA, considerado este último como teste de referência. Para o ELISA rgp 90, foram calculados os seguintes parâmetros: copositividade, conegatividade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e concordância com o teste de referência. Todos os cálculos foram efetuados de acordo com Medronho e Perez (2002).

Resultados

Os resultados obtidos no processamento das amostras de soro dos equinos ($n = 173$) e dos muares ($n = 24$) pela IDGA e pelo ELISA rgp90 estão nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Resultados obtidos no processamento das amostras de soro dos equinos pela IDGA e pelo ELISA rgp90.

		IDGA		Total
		positivos	negativos	
ELISA rgp90	positivos	96 (55,5%)	5 (2,9%)	101 (58,4%)
	negativos	5 (2,9%)	58 (33,5%)	63 (36,4%)
	total	101 (58,4%)	63 (36,4%)	164 (94,8%)*

*Nove amostras de equinos (5,2%) foram consideradas indeterminadas no ELISA rgp90 e não foram incluídas nas tabelas. As nove amostras consideradas indeterminadas no ELISA rgp90 foram positivas na IDGA.

Tabela 2. Resultados obtidos no processamento das amostras de soro dos muares pela IDGA e pelo ELISA rgp90.

		IDGA		Total
		positivos	negativos	
ELISA rgp90	positivos	9 (37,5%)	0	9 (37,5%)
	negativos	2 (8,3%)	12 (50%)	14 (58,3%)
	total	11 (45,8%)	12 (50%)	23 (95,8%)*

*Uma amostra (4,2%) de luar foi considerada indeterminada no ELISA rgp90 e não foi incluída na tabela. Esta amostra considerada indeterminada no ELISA rgp90 foi positiva na IDGA.

A copositividade, ou sensibilidade relativa, representa a porcentagem de coincidência de resultados positivos do novo teste (ELISA rgp90) e do teste de referência (IDGA). A conegatividade, ou especificidade relativa, expressa o mesmo conceito, só que para os resultados negativos. A concordância, por sua vez, abrange as coincidências tanto dos resultados positivos como dos negativos. A copositividade, a conegatividade e a concordância do ELISA rgp 90 em relação à IDGA, para os equinos (n = 164) e muares (n = 23), são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades do ELISA rgp 90 em relação à IDGA, para os equinos (n = 164), e muares (n = 23).

	Propriedades ELISA rgp90		
	Copositividade	Conegatividade	Concordância
Equinos	95,0%	92,1%	93,9%
Muares	81,8%	100,0%	91,3%

As intensidades das linhas de precipitação observadas nos resultados positivos à IDGA, correspondentes aos intervalos dos valores de leitura das densidades ópticas (D.O.), estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4. Intensidades das linhas de precipitação observadas nos resultados positivos à IDGA, correspondentes aos intervalos dos valores de leitura das densidades ópticas (D.O.) no ELISA rgp90.

IDGA Equinos			D.O. ELISA rgp90	IDGA Mueres		
Resultados		Intensidade das linhas de precipitação		Resultados		Intensidade das linhas de precipitação
Negativos	Positivos			Negativos	Positivos	
4	0	-	0 - 0,043	0	0	-
34	0	-	0,044 - 0,087	4	0	-
12	1	++	0,088 - 0,131	3	0	-
5	1	+++	0,132 - 0,175	2	1	+
3	3	++ a +++	0,176 - 0,219	3	1	+
0	9	+ a +++	0,220 - 0,263	0	1	++
0	9	+ a +++	0,264 - 0,307	0	1	+
2	12	+ a +++	0,308 - 0,351	0	0	-
0	4	++ a +++	0,352 - 0,395	0	0	-
0	4	+ a +++	0,396 - 0,439	0	3	+ a +++
0	2	+ e +++	0,440 - 0,483	0	0	-
0	5	+ a +++	0,484 - 0,527	0	1	++
0	9	+ a +++	0,528 - 0,571	0	0	-
1	6	+ a +++	0,572 - 0,615	0	1	+

Continua...

14 ELISA rgp90 – Metodologia Alternativa para o Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal

IDGA Equinos			D.O. ELISA rgp90	IDGA Muare		
Resultados		Intensidade das linhas de precipitação		Resultados		Intensidade das linhas de precipitação
Negativos	Positivos			Negativos	Positivos	
0	3	+ a + + +	0,616 - 0,659	0	0	-
1	2	+ + +	0,660 - 0,703	0	1	+
0	5	+ a + + +	0,704 - 0,747	0	0	-
0	4	+ + a + + +	0,748 - 0,791	0	1	+
0	5	+ a + + +	0,792 - 0,835	0	0	-
0	2	+ e + + +	0,836 - 0,879	0	1	++
0	2	+ + e + + +	0,880 - 0,924	0	0	-
1	8	+ + a + + +	0,925 - 0,967	0	0	-
0	4	+ + a + + +	0,968 - 1,011	0	0	-
0	1	+ + +	1,012 - 1,055	0	0	-
0	5	+ + a + + +	1,056 - 1,100	0	0	-
0	4	+ + a + + +	1,000 - 1,169	0	0	-
Total de amostras	63	110		12	12	-

As prevalências estimadas de AIE para os equinos (n = 173), pela IDGA e pelo ELISA rgp90, foram 63,6% e 58,4%, respectivamente. Para os muare (n = 24), foram observados 50%, pela IDGA, e 37,5%, pelo ELISA rgp90.

Discussão

Os resultados obtidos por Martins (2004), que avaliou 1007 amostras de soro de equideos de Minas Gerais, e Motta (2007), que avaliou 124 amostras de equinos e 119 amostras de muare do Mato Grosso do Sul, Sergipe e Minas Gerais, ambos utilizando o ELISA rgp90 e a IDGA, encontram-se na Tabela 5:

Tabela 5. Resultados obtidos por Martins (2004) e Motta (2007), na avaliação de equinos e muare utilizando o ELISA rgp90 e a IDGA.

		ELISA indeterminados		ELISA + IDGA-	ELISA- IDGA +	Copositividade	Conegatividade
		IDGA +	IDGA-				
Martins (2004)	Equino n = 907	12	21	14 (1,4%)	2 (0,2%)	97,81%	96,16%
	Muar n = 100						
Motta (2007)	Equino n = 124			5 (4%)	5 (4%)	93,42%	89,58%
	Muar n = 119			9 (7,6%)	10 (8,4%)	74,35%	88,75%

Martins (2004), para a comparação dos testes, considerou conjuntamente os resultados obtidos para as amostras de equinos e de muare. Esta autora também obteve 33 leituras (3,3%) indeterminadas, das quais 21 revelaram-se negativas na IDGA. Em nosso estudo, se considerarmos todos os resultados conjuntamente (n = 197), teríamos 10 leituras (5,1%) indeterminadas, proporção semelhante ao estudo anterior; estas, porém, foram consideradas todas positivas à IDGA. Este maior número de indeterminados no ELISA, porém positivos na IDGA, provavelmente ocorreram devido à maior prevalência da infecção no Pantanal, que pela IDGA em nosso estudo seria de 58,4%, do que em Minas Gerais, onde Martins (2004) encontrou 9,4%. Ainda com relação aos resultados indeterminados pelo ELISA rgp90, verifica-se, na Tabela 4, que as intensidades observadas na IDGA variaram de reações fracas (+) a fortes (+++), ou seja, uma leitura indeterminada no ELISA rgp90 não correspondeu a um resultado fraco positivo na IDGA. Motta (2007), apesar de considerar o ponto de corte estabelecido por Martins (2004), não relaciona a obtenção de leituras indeterminadas.

Assim como encontrado para a região do Pantanal, considerados equinos e muare conjuntamente, como em Martins (2004), ou somente os equinos, como em Motta (2007), a coincidência de resultados positivos, ou a copositividade, foi maior que a de resultados negativos. As taxas encontradas em nosso estudo, respectivamente 95,0% e 93,9%, situam-se entre os valores observados por Martins (2004) e Motta (2007). Para os muare, em nosso estudo também a copositividade (81,8%) foi menor que a conegatividade (100,0%), assim como observou Motta (2007), com 74,35% e 88,75%, respectivamente. A comparação destas taxas revela que o desempenho do ELISA rgp90 no Pantanal é semelhante ao observado em outras regiões.

Mais importante que evidenciar os resultados concordantes, porém, é a análise dos resultados discordantes. Em todos os três estudos foram observados resultados positivos no ELISA e negativos na IDGA, ou vice-versa. Os resultados positivos no ELISA rgp90 e negativos na IDGA – 1,4% em Martins (2004), 4% e 7,6% para equinos e muares em Motta (2007) e 2,9% para equinos no Pantanal - são frequentemente explicados pela precocidade do ELISA na detecção dos animais infectados (OIE, 2008). Além disso, os anticorpos anti-gp90, segundo Reis (1997), podem ser detectados antes dos anti-p26, que são aqueles revelados na IDGA. Apesar da IDGA ser considerado o teste de referência para a AIE, Pearson (1972) já afirmava que o anticorpo não pode ser detectado por 14 a 40 dias pós-infecção, portanto um animal com resultado negativo pode na realidade estar no período de incubação e, segundo Tashjian (1972), acurácia (a proporção entre os verdadeiros positivos e negativos em relação a todos os resultados possíveis) de positivos em equinos adultos é 95% a 99%. Por outro lado, a OIE (2008) afirma que resultados falsos-positivos tem sido notados nos ELISAs. Na Tabela 4 pode-se observar que os cinco resultados positivos no ELISA e negativos na IDGA apresentaram leituras de D.O. inequivocamente positivas, três das quais acima de 0,500.

Mais difíceis, porém, de serem explicados, são os resultados negativos no ELISA e positivos na IDGA – 0,2% em Martins (2004), 4% e 8,4% para equinos e muares em Motta (2007) e 2,9% e 8,3% para equinos e muares no Pantanal. Tanto Martins (2004), como Motta (2007), argumentaram que estes resultados poderiam ser explicados pela possibilidade de reação cruzada, na IDGA, com outros retrovírus (LANGEMEIER et al., 1996), ou pela existência de nova variedade genética com mutação do gene *env* que não estaria sendo detectada pelo antígeno utilizado no ELISA rgp90, baseado em sequência da estirpe de referência, a “Wyoming” (REIS et al., 2003). Tendo em vista que não há estudos sobre as estirpes do vírus da AIE circulantes no Pantanal, esta última seria uma hipótese plausível para explicar as discrepâncias encontradas. Outro aspecto a ser esclarecido é a persistência dos anticorpos anti-gp90 em animais crônicos e assintomáticos. Reis (1997) detectou a presença dos anticorpos anti-gp90 a partir do sétimo dia pós infecção, porém não foi encontrada na literatura referência sobre sua persistência em animais infectados há longo tempo. Sabe-se que, na região do Pantanal, por ser considerada área endêmica onde o isolamento de animais positivos é permitido, podem ser encontrados equídeos infectados há mais de uma década. Martins (2004), em Minas Gerais, onde a prevalência é mais baixa e o sacrifício obrigatório, encontrou uma proporção bastante baixa de resultados positivos na IDGA e negativos no ELISA.

A análise da Tabela 4, que relaciona as leituras de D.O. com a intensidade das reações na IDGA, indica que não há correspondência entre intensidade da cor obtida no ELISA e intensidade da reação na IDGA, ficando claro que estes sinais representam “medidas” de anticorpos diferentes a antígenos diferentes. Martins (2004) argumentou que este poderia ser mais um aspecto positivo para a utilização do ELISA rgp90, quando a resultados positivos fracos e duvidosos na IDGA poderiam corresponder leituras indubitavelmente positivas no ELISA rgp90. A autora também afirma que, utilizando-se os dois testes, aumenta-se a sensibilidade agregada em 25%, pois estariam sendo detectadas as duas principais e imunodominantes proteínas (p26 e gp90) do vírus da AIE.

Conclusões

A concordância maior de 90% entre o ELISA rgp90 e a IDGA, ainda levando-se em conta que a acurácia do segundo, apesar de teste de referência, não é de 100%, indica que o ELISA rgp90 pode ser considerado uma metodologia alternativa para o diagnóstico da anemia infecciosa equina no Pantanal. Até que novo estudo, com amostra mais abrangente, seja realizado, afirma-se que a utilização do ELISA rgp90, levando-se em conta principalmente a detecção da infecção em estágios bastante iniciais e a rapidez de realização do método, revela-se adequada e uma alternativa interessante para triagem periódica de equídeos nas propriedades, especialmente no caso daquelas que já realizam o controle da AIE, ou de comitivas, quando o *status* sorológico inicial dos animais é conhecido.

Agradecimentos

Ao Técnico Agrícola Ernande Ravaglia, pelas coletas de sangue; à Dra. Erna Kroon, da UFMG, pelo fornecimento do antígeno utilizado no ELISA rgp90; à Elizângela Santos, do Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da UFMG, pelo protocolo detalhado da técnica; ao MSc Luiz Alberto Pellegrin do Laboratório de Geoprocessamento pela adaptação do mapa; à EMBRAPA e à Fundect, pelo apoio financeiro.

Referências

- COGGINS, L.; NORCROSS, I. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Veterinarian**, v.60, p.330, 1970.
- LANGEMEIER, J. L.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; RUSHLOW, K. E.; MONTELARO, R. C.; ISSEL, C. J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and longterm inapparent carrier animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.6, p.1481-7, 1996.
- MARTINS, M. F. **Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp90) no diagnóstico da anemia infecciosa equina**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MEDRONHO, R. A.; PEREZ, M. A. Testes diagnósticos. In: MEDRONHO, R. A. (Ed.). **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 259-270.
- MOTTA, P. M. C. **Comparação da IDGA ELISA e “NESTED” PCR no diagnóstico da anemia infecciosa eqüina em eqüinos, asininos e muares**. 2007. 29 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OIE. World Organization for Animal Health. Equine Infectious Anaemia. In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2008. p.866 -870. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.06_EIA.pdf>. Acesso em 06 dez. 2009.

PEARSON, J. E. Equine infectious anemia diagnosis and prevention. **Iowa State University Veterinarian**, v.34, n.3, p.79-84, 1972.

REIS, J. K. P. **Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da anemia infecciosa equina para uso em imunodiagnóstico**. 1997. 184 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REIS, J. K. P.; CRAIGO, J. K.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Characterization of EIAV LTR variability and compartmentalization in various reservoir tissues of long-term inapparent carrier ponies. **Virology**, n.311, p.169-80, 2003.

SILVA, J. A. Levantamento de AIE em núcleos de equídeos no Pantanal. **Anuário CCCCN**, p. 65-6, 1976.

SILVA, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.33, p.1703- 1711, 1998.

SILVA, N. L. da. **Situação atual da anemia infecciosa equina Mato Grosso do Sul**: apresentação. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por furlan@cpap.embrapa.br em 10 dez. 2004.

SILVA, R. A. M. S.; DÁVILA, A. M. R.; IVERSSON, L. B.; ABREU, U. G. P. Equine viral diseases in the Pantanal, Brazil: studies carried out from 1990 to 1995. **Revue d´Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v.52, p. 9-12, 1999.

TASHJIAN, R. J. Studies in equine infectious anemia. **The Quarter Horse Journal**, v. 25, p.160-162, dec. 1972.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rua 21 de Setembro, 1880 - Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá - MS
Fone 55 (67) 3234-5800 / 3234-5900 Fax 55 (67) 3234-5815
<http://www.cpap.embrapa.br>
E-mail: sac@cpap.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

