



COMPARAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E ELISA COMPETITIVO (cELISA) PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Theileria equi*

NIZOLI, Leandro Quintana¹; GOTZE, Marcelo Mendes¹; FICK, Alexandre Aires²; NOGUEIRA, Carlos Eduardo Wayne³; SILVA, Sergio Silva⁴

¹ Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFPel.

² Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel.

³ Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel.

⁴ Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel.

*Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Centro de Biotecnologia.
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 Pelotas-RS

lqn@pop.com.br

1. INTRODUÇÃO

A babesiose tem sido citada como a principal parasitose eqüina devido aos danos diretos, perdas de performance, mortalidade, e indiretos (impedimento para comercialização, viagem para o exterior) causados à sanidade animal (FRIEDHOFF, 1990). A doença é causada pelos protozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi* caracterizando-se por apresentar uma forma aguda com o desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva e uma forma crônica, na qual os animais tornam-se portadores muitas vezes assintomáticos (KNOWLES et al., 1980). Nesses casos, o diagnóstico da infecção por estes parasita é essencial no manejo adequado dos animais para uma melhor performance atlética.

A técnica laboratorial utilizada até recentemente, para detecção da infecção era a visualização microscópica dos parasitos em esfregaços sangüíneos corados. Devido à baixa sensibilidade desse método, testes imunológicos indiretos têm sido incorporados com sucesso na rotina de laboratórios veterinários. Entre esses testes destaca-se a reação de imunofluorescência indireta (IFI), descrita pela primeira vez para o diagnóstico de *T. equi* por CALLOW et al. (1979). Em estudo recente também foi descrito o desenvolvimento do teste imunoenzimático por competição (cELISA) que permite além de satisfatórias sensibilidade e especificidade, condições de automação, fornecendo resultados rápidos, seguros e com custo relativamente baixo (KNOWLES et al., 1991). O presente estudo comparou o teste de cELISA com o teste de IFI na detecção de anticorpos anti-*T. equi* em eqüinos PSI.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL),

utilizando amostras de soro de 130 eqüinos procedentes de um haras da região sul do estado do Rio Grande do Sul.

A IFI foi realizada de acordo com o procedimento descrito por CUNHA et al. (1993), sendo utilizados soros controle negativos/positivos e os soros a serem testados diluídos 1:80. Utilizou-se como conjugado o anti-IgG equina total marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA®), na diluição de 1:160 em PBS, pH 7,2. As reações foram observadas em microscópio de epifluorescência marca NIKON CF UV-F, em aumento de 400 vezes, tendo como fonte luminosa lâmpada de mercúrio de alta pressão.

Foi utilizado um *kit* ELISA comercial (VMRD, Inc. *Babesia equi* Antibody Test Kit, cELISA) e o teste foi realizado conforme recomendação do fornecedor, usando como ponto de corte para a identificação dos soros negativos 40% de inibição da DO dos soros negativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 130 amostras de soros analisadas, 19 (14,6%) foram positivas e 103 (79,2%) negativas para ambos os testes, 4 (3,1%) obtiveram positividade para IFI e negatividade para cELISA e 4 (3,1%) negatividade para IFI e positividade para cELISA. A reatividade das amostras de soros para detecção de *T. equi* são mostrados na Tabela 1.

A concordância entre as duas técnicas diagnósticas foi de 93,8 % e observou-se alta associação entre as técnicas ($\chi^2 = 80,8$; $p < 0,0001$).

Tabela 1. Concordância entre os testes de IFI e cELISA para diagnóstico de anticorpos anti-*T. equi*.

ELISA	RIFI		Total
	positivo	negativo	
Positivo	19	4	23
Negativo	4	103	107
Total	23	107	130

A técnica de IFI para o sorodiagnóstico foi padronizada de acordo com CUNHA (1993), sendo utilizados antígenos específicos de *T. equi*, possibilitando descartar a hipótese de haver reação cruzada com soros de animais infectados com *B. caballii*. O teste de cELISA utiliza proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais (KNOWLES et al. 1991^{ab}).

Novos estudos precisam ser desenvolvidos para esclarecer alguns aspectos problemáticos relacionados ao diagnóstico da *T. equi*, tais como aqueles observados nos animais que apresentaram resultados discordantes entre os testes, entretanto, a boa associação obtida entre o teste de cELISA em comparação com a IFI; resultados similares foram encontrados por RHALEM et al. (2001) comparando cELISA e IFI, nessa mesma comparação foi estabelecida uma concordância de 91% entre os testes.

4. CONCLUSÕES

Concluindo, a IFI e o cELISA apresentaram alto coeficiente de concordância. A IFI, com alta sensibilidade, apresentou resultados que sustentam seu uso em inquéritos epidemiológicos, na titulação dos soros e no acompanhamento das variações sorológicas apresentadas pelos animais. O cELISA, por sua alta sensibilidade e especificidade, pode ser empregado nas situações de importações e de trânsito interno de animais oriundos de áreas com alta prevalência que poderiam atuar como fontes de infecção nas áreas onde a theileriose não está presente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALLOW, L. L.; MC GREGOR, W.; RODWELL, B. J.; ROGERS, R. J.; FRASER, G. C.; MAHONEY, D. F.; ROBERTSON, G. M. Evaluation of an Indirect Fluorescent Antibody Test to Diagnose *Babesia equi* Infection in Horses. **Australian Veterinary Journal**, v.55, p.555-559, 1979.
- CUNHA, C.W. Babesiose Equina: Padronização da reação de Imunofluorescência indireta para sorodiagnóstico em eqüinos puro sangue inglês. Curso de Pós-Graduação em Veterinária - Área de Concentração em Sanidade Animal, UFPEL, Pelotas, 57 p., 1993.
- FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.4, p. 525-535, 1990.
- KNOWLES, D. P. Jr.; PERRYMAN, L. E.; GOFF, W.L.; MILLER, C.D.; HARRINGTON, R.D.; GORHAM, J.R.. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. **Infection and Immunity**, v. 59, n.7, p.2412-2417, 1991^a.
- KNOWLES, D. P.; PERRYMAN, L. E.; GOFF, W. L. et al. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. **Infect Immun**, v. 59, p. 2412-2417, 1991^b.
- KNOWLES, D. P.; PERRYMAN, L. E.; KAPPEMEYER, L. S.; HENNAGER, S. G. Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol** v. 29, p. 2056-2058, 1991.
- KNOWLES, R. C.; HOURRIGAN, J. L.; HOLBROOK, A. A.. Equine Piroplasmiasis. **Equine Practice**, v.2, n.1, p. 10-14, 1980.
- RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JOHNSON, W. C.; KAPPEMEYER, L. S.; HAMIDOUCH, A.; KNOWLES, D. P.; GOFF W. L. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. **J Vet Diagn Invest**, v. 13, p. 249-251, 2001.