



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA P26 NO DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA POR IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR

AUTOR PRINCIPAL: Jorjana Angélica Klassmann

CO-AUTORES: Priscila Secchi, Eloísa Carla Bay

ORIENTADOR: Luiz Carlos Kreutz

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma doença infectocontagiosa cosmopolita dos equídeos, causada por um Lentivírus da família *Retroviridae*.

O teste de diagnóstico oficial estabelecido pela Organização Mundial de Epizootias (OIE) é a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). Nesse teste, a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) ocorre em uma zona de equivalência, equidistante entre os orifícios do antígeno (proteína viral p26) e do anticorpo, traduzido por meio de uma linha de precipitação visível a olho nu quando observada sob um fundo escuro. Os ensaios de IDGA devem ser incubados a 20-25°C por 48h. No entanto, a formação da linha de precipitação pode ser influenciada pela concentração de antígeno, ou anticorpo, e possivelmente pela temperatura de incubação.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a possível influência da temperatura de incubação das lâminas e da concentração da proteína viral p26 na formação dos complexos Ag- Ac.

DESENVOLVIMENTO:

A influência da concentração da p26 foi avaliada através da diluição seriada desse antígeno em tampão borato e mensuração por espectrofotometria da concentração final de proteína viral nas diferentes diluições.

Foram confeccionadas seis lâminas conforme Portaria nº. 84 (BRASIL, 1992), contendo rosetas em duplicata. Em cada roseta, contendo 6 orifícios periféricos e um orifício central, foram distribuídos 25µL de soros, com resultados previamente conhecidos, sendo nos orifícios 2, 4 e 6 distribuídos soros negativos, fraco positivos e forte positivos, respectivamente. Após, 25µL do soro controle positivo (SCP) do kit comercial foi depositado nos orifícios 1, 3, 5 e, no orifício central, 25µL de antígeno nas seguintes concentrações: 22µg/µL (antígeno puro), 6,4 µg/µL, 4,8µg/µL, 3,0µg/µL, 1,5µg/µL e 0,3µg/µL. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a temperatura de 20-25°C.

Para teste da influência da temperatura de incubação foram confeccionadas 3 lâminas de duas rosetas cada, as quais foram adicionadas dos reagentes e incubadas em câmara úmida nas temperaturas de 4°C, 20-25°C e 37°C. Em uma das rosetas foram avaliadas amostras positivas e na outra, negativas. A distribuição dos reagentes foi realizada conforme recomendações da Portaria supracitada e, a leitura dos testes foi realizada por dois avaliadores.

Para avaliação dos resultados classificou-se a formação das bandas do complexo Ag- Ac como excelente (+++), adequada (++) e inadequada (+), levando-se em consideração a intensidade e extensão da mesma.

Verificou-se que diluição do antígeno na concentração 6,4 µg/µL facilita a visualização das bandas, principalmente em amostras fraco positivas onde a precipitação de complexos Ag-Ac ocorre muito próxima ao orifício da amostra testada, dificultando a visualização da fusão das bandas formadas pelo SCP, Ag e soro testado. A p26 diluída nessa concentração permitiu a formação das linhas de precipitação em uma região equidistante entre o orifício do Ag e do Ac(soro testado) mais afastadas do orifício com o soro testado proporcionando uma excelente (+++) leitura, porém, a intensidade dessas linhas foi discretamente mais fraca comparada com as formadas quando utilizado antígeno puro. Nas diluições 4,8µg/µL e 3,0µg/µL houve uma precipitação inadequada(+) de complexos para afirmação do diagnóstico e nas diluições 1,5µg/µL e 0,3µg/µL não foi possível visualizar as bandas.

A incubação a 37°C resultou em bandas discretamente mais intensas (excelentes/+++)
de amostras positivas e negativas quando comparadas àquelas formadas na temperatura 20-
25°C, facilitando a interpretação dos resultados. A 4°C, tratando-se de amostras negativas,
foi possível observar a formação de complexos imunes. No entanto, a qualidade das bandas
de precipitação foi menor do que aquela observada a 20-25°C ou 37°C, mas, adequada (++)
para estabelecimento do diagnóstico. Já para as amostras positivas a formação das bandas
foi de intensidade inadequada (+), dificultando a visualização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A diluição do antígeno na concentração 6,4µg/µL permitiu a formação de uma linha
de precipitação equidistante entre os orifícios contendo Ag e Ac e facilitou a interpretação
do resultado para amostras consideradas fraco positivas. A incubação das lâminas a 37°C
permitiu a formação de linhas de precipitação mais visíveis e intensas, e poderia ser utilizada
na rotina de diagnóstico de AIE.

REFERÊNCIAS

BRASIL. PORTARIA do Secretário Nacional de Defesa Agropecuária nº. 84, de 19 DE
OUTUBRO DE 1992. Dispõe sobre as Normas de Credenciamento e Monitoramento de
Laboratórios de Anemia Infeciosa Equina. Anexo I. Publicado no D.O.U, Brasília, DF, 22 de
outubro de 1992. Seção 1, p.14874.

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.

JACOBO, R. A. et al. *Reações não específicas no diagnóstico da anemia infecciosa equina*. A
Hora Veterinária. Porto Alegre, n. 151, mai./jun.,2006. Ano 26.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa):