

## **SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PARA ALFAVÍRUS EM EQUINOS INVESTIGADOS DURANTE UM SURTO DE ENCEFALITE EQUINA, PARAIBA, 2009**

Francisco Anilton Alves ARAÚJO<sup>1,2</sup>; Maria Auxiliadora ANDRADE<sup>1</sup>; Valéria Sá JAYME<sup>1</sup>; Arthur Levantezi SANTOS<sup>2</sup>, Alessandro Pecego ROMANO<sup>1,2</sup>, Daniel Garkauskas RAMOS<sup>2</sup>, Elenice Maria Sequetin CUNHA<sup>3</sup>; Sueli Guerreiros RODRIGUES<sup>2</sup>, Maria do Carmo Custódio Souza Hunold LARA<sup>3</sup>, Eliana Monteforte VILLALOBOS<sup>3</sup>, Livia CARÍCIO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Goiás.

<sup>2</sup>Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde

<sup>3</sup>Instituto Biológico/SP.

[faaraujo1@gmail.com](mailto:faaraujo1@gmail.com)

Palavras-chave: arbovírus; epizootias; anticorpos; soroneutralização.

### **INTRODUÇÃO:**

A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus*. O gênero *Alphavirus* é de interesse em arbovirologia e abrange aproximadamente 30 espécies de vírus, algumas das quais têm sido associadas com doenças em animais domésticos (equinos e aves), silvestres (aves e mamíferos) e ocasionalmente em humanos. Os alfavírus possuem características estruturais e morfológicas em comum, são transmitidos por artrópodes e apresentam considerável relação antigênica (FLORES, 2007).

Devido o potencial de causar doença encefalitogênica, os Vírus da Encefalite Equina do Oeste (VEEO), da Encefalite Equina do Leste (VEEL), da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) são os *alfavírus* de maior interesse no estudo das arboviroses no Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Dentre esses, o VEEL é o que apresenta maior virulência e patogenicidade (ACHA & SZYFRES, 2003). O VEEL tem os mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Culiseta* como vetores potenciais, equinos e humanos como hospedeiros acidentais e como principais reservatórios as aves silvestres (RIET-CORREA *et al.*, 2007).

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados obtidos para o VEEL obtidos mediante uso das técnicas de Inibição de Hemaglutinação (IH) e Teste Soroneutralização em Microplacas (padrão-ouro), bem como determinar a prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para alfavírus nos equinos investigados durante o surto ocorrido na Paraíba, em 2009, tendo em vista que o método diagnóstico mais empregado na investigação de eventos epidêmicos por arbovírus é a pesquisa de anticorpos mediante técnica sorologia como: IH, PRNT e ELISA (FLORES, 2007; RIET-CORREA *et al.*, 2007; ACHA & SZYFRES, 2003).

### **MATERIAL E MÉTODOS:**

Este estudo faz parte de uma investigação ampla em equinos, realizada pelo Ministério da Saúde em conjunto com as Secretarias de Saúde dos Estados, para detecção e determinação da magnitude das arboviroses de importância em saúde pública que circulam no Brasil e definição da importância da vigilância de epizootias em equinos como instrumento de prevenção e controle das arboviroses.

Foi realizado um estudo transversal, utilizando as amostras de soro de 226 equinos coletadas entre maio e julho de 2009, em 15 municípios da região oeste da Paraíba, onde haviam ocorrido cinco epizootias por EEL diagnosticadas por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).

Os municípios onde se deu a coleta de sangue, bem como o número de animais amostrados, foram: Belém do Brejo do Cruz (2), Brejo do Cruz (27), Cajazeirinhas (2), Condado (2), Coremas (8), Patos (10), Paulista (58), Piancó (1), Poço José de Moura (18), São Bentinho (6), São Bento (12), São Francisco (1), São João do Rio de Peixe (42), São José do Brejo do Cruz (36) e Vista Serrana (1).

Para efeito do estudo, foi considerado animal infectado pelo VEEL aquele reagente ao teste de Soroneutralização em Microplacas (padrão-ouro) tendo em vista: o grande número de casos de animais com clínica compatível com a doença, os resultados de PCR observados em cinco animais que vieram a óbito no local, o não histórico de animais vacinados contra encefalite eqüina no local e a não relato de adoecimento ou morte de animais com histórico de doença neurológica na região.

Durante a coleta de sangue, os animais com clínica neurológica compatível com encefalite eqüina foram classificados como doentes. De acordo com informações obtidas nas localidades, 50% dos equinos estudados não tinha histórico de vacinação contra Encefalites Equinas e o restante havia sido vacinado em até sete dias da coleta de soro. Estes animais foram considerados “não vacinados” tendo em vista que ainda não havia tempo hábil para produção de anticorpos vacinais que pudesse vir a interferir no resultado laboratorial.

O teste de IH foi utilizado para detecção de anticorpos contra os seguintes *Alphavirus*: VEEL, VEE0, VMUC (VEEV, subtipo IIIA) e VMAY. Os soros foram titulados de a partir da diluição de 1:20 até 1:1280, sendo a diluição de 1:20 considerada como ponto de corte. As respostas de anticorpos anti alfavírus detectadas nos equinos foram classificadas em reação monotípica (RM) e reação heterotípica, isto é cruzada (RC), esta última quando a presença de anticorpos IH foi detectada para mais de um alfavírus.

Para a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o VEEL, foi utilizada a técnica de Soroneutralização em Microplacas. Foram considerados reagentes os soros com título de anticorpos neutralizantes  $\geq 10$  para o VEEL.

Para análise dos resultados observados no IH em comparação a Soroneutralização em Microplacas (padrão-ouro), foi construída uma tabela de contingência (2x2), a partir da qual foram determinadas a sensibilidade e especificidade do teste, os valores preditivos positivo e negativo, o *Likelihood ratio* (LR) positivo negativo. Para análise de concordância entre os testes diagnósticos foi utilizado o índice *Kappa*, interpretado de acordo com Landis & Koch (1977). Para todos os testes, assumiu-se nível de significância ( $\alpha$ ) de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* EpiTools.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Dos 226 animais testados, 22 apresentavam clínica compatível com encefalite eqüina na ocasião da coleta de sangue, o que determina uma prevalência pré-teste de 9,7%. Do total, 143 animais foram positivos para EEL pelo Teste de Soroneutralização em Microplacas (prevalência real de 63,3%), e 51 foram positivos pelo IH (prevalência aparente de 22,5%).

Do total de animais positivos para alfavírus no teste de IH, 79,7% (51/64) foram reagentes para o VEEL, sendo que destes, 39,2% (20/51) apresentaram RM e 60,8% (31/51) RC. No caso do VEEO, 56,2% (36/64) foram reagentes, sendo que 86,1% (31/36) foram considerados como RC. Com relação aos VMUC e VMAY, a frequência observada foi de 4,6% (3/64) no primeiro e de 3,1% (2/64) respectivamente, e todos foram considerados como RC por terem sido positivos para outros alfavírus.

Heinemann *et al.* (2006) em Uruará/PA e Casseb (2010) no Pará, utilizando o teste de IH, encontraram prevalências de 18,39% e 30,14% para o VEEL e 6,77% e 22,84% para o VEEO, respectivamente. No Pará, Casseb (2010) detectou prevalências de 5,31% para o VMAY e VMUC, enquanto não foi detectada presença de anticorpos de VMAY por Pauvolid-Corrêa *et al.* (2010) em Nhecolândia/MS, o que sugere a ausência do vírus na área, ou ainda a ausência de vetores ou a baixa atratividade destes aos eqüinos.

Considerando os dados de prevalência de anticorpos para VEEL disponíveis na literatura cujo teste diagnóstico foi o PRNT, Fernandez *et al.* (2000) no Paraná entre 1996 e 1999 encontraram prevalência 54,5% das amostras testadas, Heinemann *et al.* (2006) detectaram índices de anticorpos neutralizantes de 27% em Uruará/PA; e Iversson *et al.* (1993) e Pauvolid-Corrêa *et al.* (2010) encontraram anticorpos neutralizantes anti VEEL de 7% e 47,7%, respectivamente, no pantanal mato-grossense.

Das amostras reagentes para o VEEL pelo Soroneutralização em Microplacas, 16,1% (23/143) apresentaram titulação  $\geq 1:320$ , e destas, 17,4% (4/23) foram  $\geq 1:1280$ , considerada alta se comparada ao *cutoff* estabelecido, ou com os títulos observados por Pauvolid-Corrêa *et al.* (2010).

Nos sete municípios que tiveram coleta de amostra em 10 ou mais animais, o percentual de animais reagentes no teste de IH variou entre 18,5% (5/27) em Brejo do Cruz/PB e 33,3% em São Bento (4/12) e Poço José do Moura (6/18), não existindo diferença estatisticamente significativa ( $X^2=1,6$ ;  $p=0,44$ ) entre as prevalências observadas nestas localidades.

O teste de IH é reconhecidamente sensível para detecção de anticorpos para arbovírus, enquanto o teste de neutralização é altamente específico e é empregado no diagnóstico sorológico como teste confirmatório. Desta forma, quando analisados os resultados obtidos no IH para o VEEL em comparação com aqueles obtidos a partir do Soroneutralização em Microplacas, encontrou-se uma especificidade de 85,5% (71/83) para o IH realizado com as amostras em estudo. Os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) foram de 76,5% (39/51) e 40,6% (71/175), respectivamente o que significa que a maioria dos positivos detectados no IH foram confirmados pela Soroneutralização em Microplacas, sugerindo que o alto VPP ser de grande valor o IH para determinar a presença da doença na área estudada.

Ponderando a probabilidade de infecção em indivíduos com teste positivo e teste negativo, o *Likelihood ratio* positivo encontrado foi de 1.88 e o *Likelihood ratio* negativo foi de 0.85, sugerindo que a probabilidade de um animal infectado ter o resultado positivo no teste é duas vezes maior no animal verdadeiramente infectado do que no não infectado. Os resultados também demonstraram que a probabilidade de um indivíduo testado aleatoriamente resultar positivo no teste de IH foi de 17%, considerando a prevalência pré-teste de cerca 10%, enquanto que a probabilidade de resultar negativo foi de 9%.

Quando analisada a concordância entre os testes, obteve-se o índice de kappa de 0.104 (-0,009-0,217), o que sugere que não há concordância, uma vez que a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa, e a baixa concordância observada pode ser atribuída ao acaso.

## **CONCLUSÕES:**

Este estudo nos permite compreender o perfil imunológico para o VEEL em populações de eqüinos no momento da ocorrência de uma epizootia, preenchendo uma lacuna no conhecimento da soro-epidemiologia desta enfermidade e sobre a ocorrência e o comportamento desse arbovírus frente as mudanças ambientais crescentes.

Os resultados sorológicos confirmaram uma intensa circulação de alfavírus entre os eqüinos da área investigada, especialmente do VEEL apesar de muitos animais apresentarem-se assintomáticos no momento do exame clínico. Além disso, indicam que o teste IH pode ser recomendado como de triagem em inquéritos sorológicos desta natureza para determinar a presença de doença, tendo em vista as elevadas taxas de

especificidade e valor preditivo, bem como do *Likelihood ratio* positivos verificados neste estudo.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CASSEB, A.R.. Soroprevalência de anticorpos e padronização do teste Elisa Sanduíche Indireto para 19 tipos de arbovírus em herbívoros domésticos. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Belém, 2010.

FERNÁNDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.

FLORES, E. F.. Classificação e Nomenclatura dos Vírus. *Virologia Veterinária*. Santa Maria : Ed. da UFSM, 2007. p 39 - 58.

HEINEMANN, M.B., SOUZA, M.C.C., CORTEZ, A., FERREIRA, F., HOMEM, V.S.F; FERREIRA-NETO, J.S., SOARES, R.M., CUNHA, E.M.S., RICHTZENHAIN, L.J.. Soroprevalência da encefalomielite eqüina do leste e do oeste no Município de Uruará, PA, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **43**: 1-5, 2006.

IVERSSON, L.B., SILVA, R.A.M.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., BARROS, V.L.R.S. Circulation of *Eastern Equine Encephalitis*, *Wessern Equine Encephalitis*, *Ilhéus*, *Maguari* and *Tacaiuma* viruses in equines of the brazilian pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **35**: 355-359, 1993.

LANDIS, J.R. e KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p. 159-174, 1977.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores*. Informes técnicos. 1985; n. 719, p.126.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; TAVARES, F.N.; COSTA, E.V.; BURLANDY, F.M.; MURTA, M.; PELLEGRIN, A.O.; NOGUEIRA, M.F.; SILVA, E.E.. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6: p. 829-833, Setembro, 2010.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*, 3ª Ed. Santa Maria: Palotti, 2007. Vol 1. p. 103-106.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*; v. 33; n.6; p. 465-476; 1991