O DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE ANTICORPOS FECAL PARA AJUDAR NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DISTÚRBIOS GASTROINTESTINAIS EM EQUINOS

UM RESUMO SOBRE AS PESQUISAS E DESENVOLVIMENTOS POR TRÁS DO SUCCEED® EQUINE FECAL BLOOD TEST™

SUCCEED™
Equine Fecal Blood Test™

Ao longo de dez anos, observamos uma alta taxa de úlceras gástricas e de cólon em mais de 1.100 equinos em abatedouros nos Estados Unidos e no Canadá. Durante esse período, nós testamos várias tecnologias que tentavam detectar essas lesões usando uma amostra fecal. Nós relatamos agora sobre um kit de teste de anticorpos melhorado.

O SUCCEED® Equine Fecal Blood Test™, teste de sangue oculto fecal equino, é um teste altamente preciso e sensível que pode ajudar os profissionais a diferenciarem problemas de sangramento de origem gástrica ou de cólon que refletem em úlceras, inflamações e patologias relacionadas ao trato digestório dos equinos. O kit é um teste de duas partes, de fácil manuseio, para ser usado a campo que fornece resultados em minutos.

INCIDÊNCIA DA ÚLCERA EM EQUINOS DE ALTA PERFORMANCE

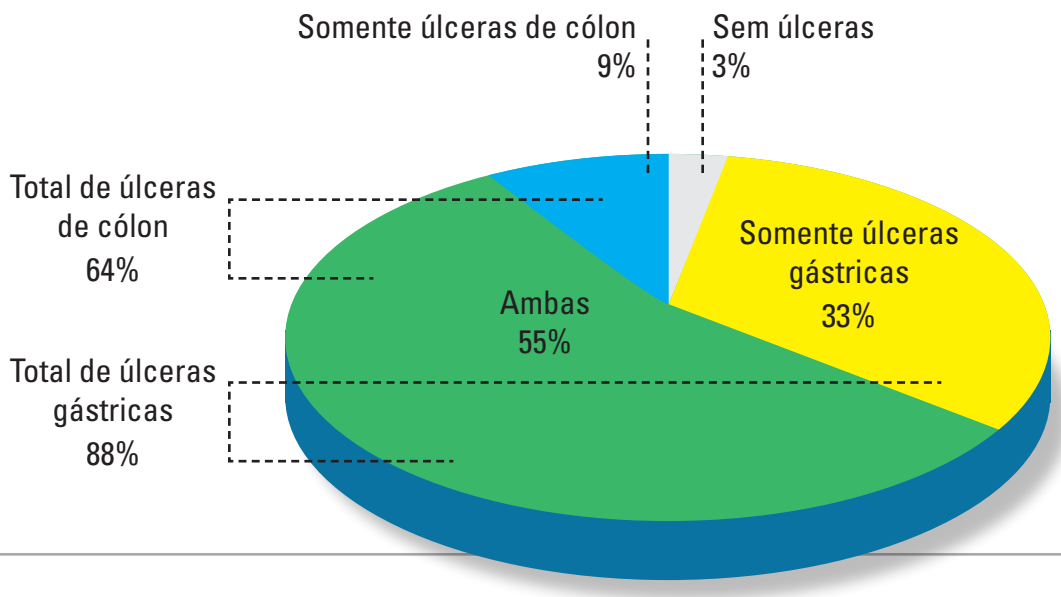


Figura 1: Um estudo feito em 2003 em um abatedouro do Texas descobriu que apenas 3% dos equinos de alta performance não tinham ulceração e que a maioria (55%) tinha lesões tanto colônicas como gástricas.

A maioria dos veterinários está familiarizada com a Síndrome da Úlcera Gástrica Equina (EGUS), que se manifesta principalmente por meio de lesões no esôfago distal, na área escamosa do estômago e no duodeno proximal[1,2,3]. As úlceras gástricas podem ser visualizadas com um endoscópio de três metros, mas a área gástrica onde a Síndrome da Ulcera Gástrica se encontra representa menos de 10% do trato gastrointestinal equino.

Em 2003, a empresa Freedom Health realizou um estudo necroscópico com 180 equinos de alta performance para coletar dados sobre a incidência de úlceras gastrointestinais e correlacionar essas observações com um exame de sangue fecal baseado em guáiaco (gFBT). Nós esperávamos um nível significativo de ulceração gástrica, mas também previámos que as úlceras de cólon também estariam presentes. Essa suposição se baseou nas taxas de anemia subclínica ou inflamação intestinal que acreditávamos que estavam afetando negativamente o desempenho dos equinos de alta performance, mesmo nos casos em que as úlceras gástricas não eram detectadas.

A análise dos resultados (Pellegrini, 2005) revelou que 87% dos equinos tinham úlceras gástricas e 63% tinham úlceras de cólon, com uma taxa de ulceração total de 97% .[4] Neste estudo, nós correlacionamos o gFBT ao exame macroscópico do tecido intestinal com a esperança de que tal teste fecal pudesse auxiliar no diagnóstico dessas condições. Em geral, o gFBT provou ser específico e significativo para identificar a presença de uma úlcera, mas a existência de falsos negativos limitou a precisão total do teste a 65%, o que pode ser comparado a resultados humanos com o mesmo teste.

Nossas observações demonstraram claramente que as lesões e as inflamações no trato digestório equino não se limitam ao estômago. Vimos vários casos de colite dorsal direita (CDD), um problema conhecido em cavalos que fazem uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINE). Além disso, encontramos úlceras em outros quadrantes do cólon. Isso foi inesperado, porque a ulceração de cólon nesses outros quadrantes não havia ainda sido observada na literatura. Nesse estudo e em vários estudos adicionais realizados nos últimos dez anos, encontramos grandes cistos, úlceras focais, úlceras amplamente disseminadas, petéquias e equimoses em todos os quadrantes do cólon.

Apresentando o SUCCEED Equine Fecal Blood Test

Ao longo de um período de 10 anos, entre 2003 e 2013, nós realizamos 1.122 necrópsias equinas em abatedouros nos Estados Unidos e no Canadá e constantemente encontramos lesões tanto no estômago quanto no cólon. Além de uma pesquisa básica sobre a frequência e a gravidade da inflamação gastrointestinal, queríamos saber se poderíamos criar um teste fecal de fluxo lateral que pudesse ser usado nos estábulos e pudesse detectar e, com sorte, diferenciar essas condições.

A digestão equina é dominada pela ação do intestino grosso, onde as úlceras são difíceis de serem observadas. As colonoscopias são impraticáveis devido à dificuldade de evacuar o cólon equino sem expor a saúde do animal. Como consequência, a maioria dos veterinários não está familiarizada com as úlceras do cólon. Mas, como mostramos, as colites e inflamações são comuns e podem afetar negativamente a saúde digestiva dos animais, resultando em dor, desconforto e em comprometimento do desempenho. A capacidade de diagnosticar com precisão a colite e diferenciá-la da gastrite é importante para determinar o tratamento adequado. Essas questões podem refletir em inúmeras patologias e, se não tratadas, podem levar à anemia, laminite, cólica e até à morte.[5]

Para melhor quantificar esse perigo oculto, nós desenvolvemos e testamos vários kits de teste de diagnóstico fecal e realizamos vários estudos de calibração do teste ao longo dos anos. Aqui descrevemos nosso último teste de campo que detecta e diferencia potencialmente as colites e gastrites.

Figura 2: Úlcera gástrica de grau 3 com grande erosão.

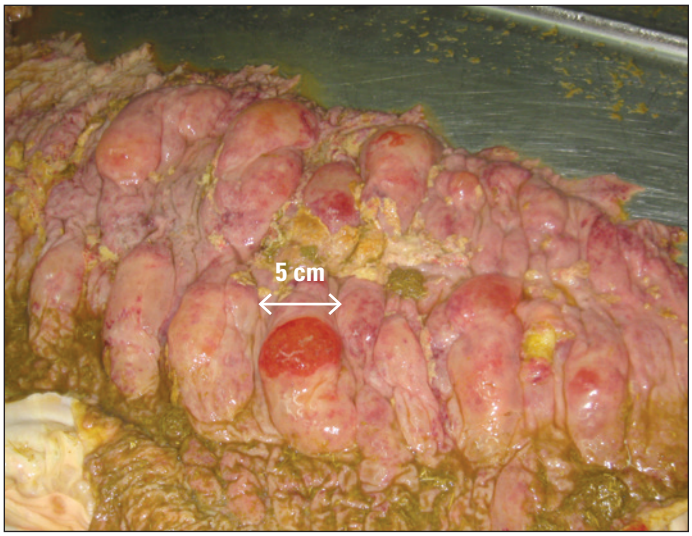


Figura 3: Úlcera de cólon disseminada de grau 3 com grande lesão.

Análise de um teste de guáiaco

Nosso primeiro teste usou o guáiaco, uma substância que fica azul na presença de sangue e peróxido de hidrogênio. Em todos os nossos estudos necroscópicos, uma amostra fecal foi coletada de cada equino antes da eutanásia. Para a necrópsia, o trato digestório foi removido e o estômago e o cólon foram separados para a condução dos exames e, então, foi feita uma lavagem gástrica. Úlceras gástricas foram identificadas e classificadas de acordo com o Sistema de Pontuação Simplificada de Clínicos Gerais (Practitioner's Simplified Scoring System)[6] em uma escala de 0 a 3:

0 Epitélio da mucosa intacta (pode ter vermelhidão leve e/ou hiperqueratose leve)

1 Pequena lesão única ou pequena lesão multifocal

2 Grandes lesões únicas ou multifocais ou extensas lesões superficiais

3 Lesões extensas (muitas vezes coalescentes) com aparentes áreas de ulceração profunda

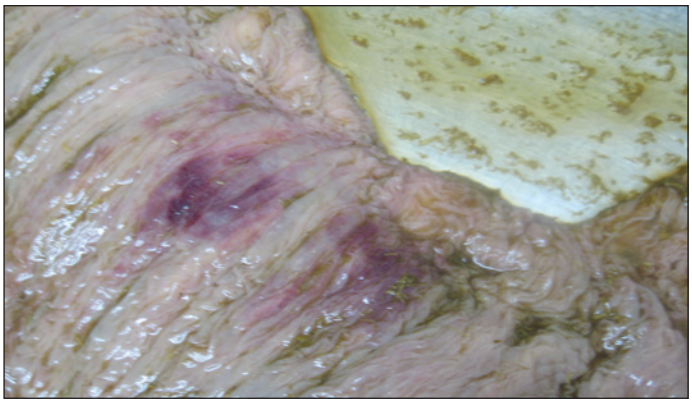


Figura 4: Colite dorsal direita com um nódulo (centro).

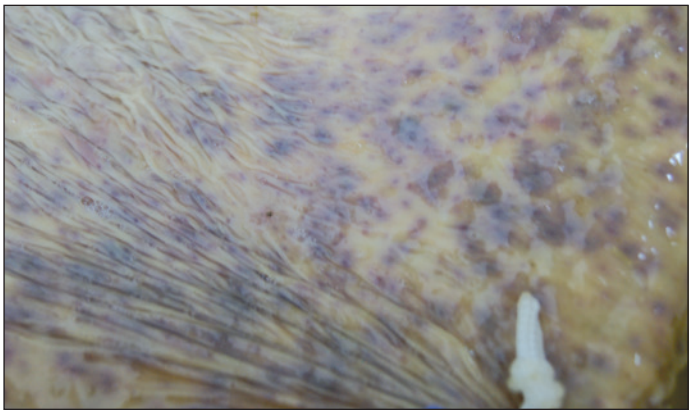


Figura 5: Uma severa equimose do cólon ventral esquerdo.

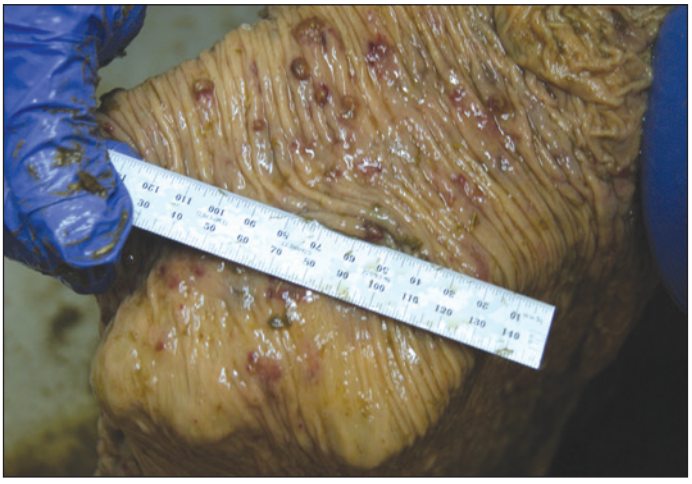


Figura 6: Úlcera de grau 2 no cólon ventral esquerdo.

Nós adotamos o mesmo Sistema de Pontuação para as úlceras de cólon. O sistema não referencia de maneira explícita os sangramentos, mas nossas observações levaram-nos a correlacionar úlceras de grau 2 ou superior com a produção de sangue total. Úlceras de grau 1, sem sangramento, podem ser associadas com a infiltração de albumina no local da lesão. O teste de guáiaco foi bem específico, mas não sensível o suficiente para nosso propósito.

Desenvolvendo um Teste de Anticorpos

Para melhorar a sensibilidade do teste de guáiaco, nós nos voltamos para a tecnologia de ligação de anticorpos, especificamente para os imunoensaios de fluxo lateral. Esses testes são fáceis de usar a campo e ainda fornecem alta sensibilidade e precisão, ambas necessárias para detectar pequenas quantidades de componentes sanguíneos na matéria fecal.

Para detectar e potencialmente localizar as úlceras equinas, nós realizamos uma análise de duas proteínas marcadoras encontradas no sangue, as quais esperávamos que pudessem distinguir as lesões do intestino grosso e da porção anterior do trato gastrointestinal: a albumina e a hemoglobina. Em um experimento conduzido com pesquisadores da Island Whirl Equine Colic Research Laboratory da Universidade da Flórida, sangue equino foi introduzido, através de uma cânula gástrica, em dois cavalos utilizados no experimento e amostras fecais foram então retiradas periodicamente durante as 18 horas seguintes à introdução.

A albumina é conhecida por ser degradada no estômago e no duodeno por enzimas como pepsina e tripsina. Como consequência, esperávamos que qualquer albumina detectada na matéria fecal pudesse surgir de uma lesão da porção caudal do intestino grosso ao duodeno. O estudo também analisou a hemoglobina, a qual nossa pesquisa anterior de guáiaco havia mostrado que pode sobreviver à degradação gástrica e colônica. Em conjunto, percebemos que a detecção dessas duas proteínas poderia fornecer uma nova técnica para ajudar a distinguir essas duas áreas disjuntas de inflamação.

Essas duas proteínas foram analisadas utilizando um Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA). Quando os resultados foram plotados, observamos que os níveis de hemoglobina atingiram o pico e, em seguida, caíram lentamente ao longo do período de 18 horas, como esperado, enquanto os níveis de albumina permaneceram consistentemente baixos devido à digestão gástrica dessa proteína no sangue injetado. Isso demonstrou a utilidade dessas duas proteínas marcadoras para o diagnóstico diferencial. A hemoglobina é um marcador para úlceras de grau dois e superior, tanto na porção anterior do trato gastrointestinal como no intestino grosso, enquanto a albumina indica úlcera apenas no intestino grosso.

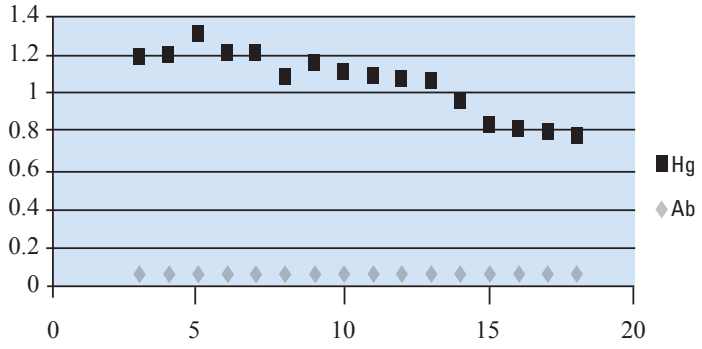


Figura 7: OD450 resulta de uma média do ensaio ELISA em dois cavalos durante um período de 18 horas. Observe a queda lenta da hemoglobina detectada e os consistentes níveis baixos de albumina.

A tabela seguinte ilustra o uso da hemoglobina e da albumina em diagnósticos diferenciais:

		Teste de Albumina (Teste A)	
		Negativo	Positivo
Teste de Hemoglobina (Teste H)	Negativo	Nenhum componente do sangue do trato gastrointestinal detectado. Possível membrana basal comprometida na porção anterior do trato gastrointestinal.	Problema detectado no intestino grosso. Possível membrana basal comprometida na porção anterior do trato gastrointestinal.
	Positivo	Sangramento vascular ativo na porção anterior do trato gastrointestinal.	Problema detectado no intestino grosso. Possível sangramento vascular ativo na porção anterior do trato gastrointestinal, no intestino grosso ou em ambos.

Criando um Teste de Anticorpos

Em seguida, nós determinamos os níveis diagnósticos úteis desses dois componentes sanguíneos no tecido gastrointestinal comprometido. Com base nos experimentos de albumina e hemoglobina da Island Whirl, nós desenvolvemos um kit de imunoensaio para uso a campo que utiliza anticorpos purificados contra a albumina e a hemoglobina. Para preparar o kit, foi escolhida e sintetizada em laboratório uma sequência de peptídeo única para cada proteína equina, conjugada para aumentar a imunogenicidade e depois injetada em coelhos. No segundo e no terceiro mês, os coelhos receberam injeções de reforço da sequência peptídica para aumentar ainda mais sua reação imune e maximizar a produção de anticorpos. Ao final de três meses, amostras de sangue foram colhidas de cada coelho, o soro foi separado do sangue e todas as amostras de soro foram reunidas.[7]

Os anticorpos foram então purificados utilizando uma coluna de afinidade contendo a sequência peptídica original, garantindo que apenas os anticorpos para a sequência escolhida estivessem nas preparações dos anticorpos finais.

Essas proteínas possuem sequências peptídicas que são exclusivamente equinas e, portanto, só estão presentes no trato digestório equino ou por ingestão de sangue (por exemplo, pelos pulmões) ou por meio de sangramento ocorrido em algum ponto do trato digestório.

O teste possui um anticorpo calibrado para detectar albumina acima da linha basal e outro para detectar hemoglobina. Algumas gotas de matéria fecal diluída são colocadas em cada uma das duas cavidades do teste e, após alguns minutos, a presença de albumina e hemoglobina são indicadas e um diagnóstico pode ser feito no local.

Calibrando o Teste de Anticorpos

Nós nos esforçamos para melhorar o teste, principalmente para evitar inundações em altos níveis sanguíneos. Cada nova iteração do kit de anticorpos foi testada com necrópsias adicionais. Esses testes foram realizados utilizando um protocolo semelhante aos estudos originais de guáiaco: após a eutanásia, as amostras fecais foram coletadas e testadas e esses resultados foram correlacionados às observações visuais do trato gastrointestinal equino. Esses testes foram feitos às cegas, a classificação dos testes foi independente da dissecção intestinal. Os resultados dos testes de anticorpos foram posteriormente correlacionados às observações anatômicas para verificar sua precisão e seu valor preditivo positivo.

Para a hemoglobina, o teste de anticorpos foi correlacionado com o nível geral de ulceração gastrointestinal observada, onde o limite positivo gástrico e colônico foi definido em grau 2 ou superior (onde a úlcera produz sangue total e, portanto, a hemoglobina provavelmente está presente). Em nossos testes, os kits melhoraram sua precisão ao longo do tempo, passando de cerca de 75% para mais de 80%. A sensibilidade é excelente, pois os anticorpos podem ser altamente responsivos.

O valor preditivo positivo, que é um indicador da probabilidade de um cavalo ter uma úlcera dado um resultado positivo, sempre foi bom, aumentando com cada reformulação do kit de cerca de 80% para mais de 85%.

Para a albumina, o teste de anticorpos foi correlacionado exclusivamente com o nível de ulceração colônica observada, em que o limite foi definido em grau 1 ou superior (onde a albumina provavelmente está presente). Tal como acontece com os testes de hemoglobina, estes têm melhorado continuamente em relação a sua precisão, pois passamos a melhor entender a taxa basal normal de perda de albumina no intestino grosso.

Devido à natureza da química dos anticorpos, o teste é geralmente muito sensível, levando a um número baixo de falsos positivos. Com isso, obtemos boas correlações, especialmente em métricas como a precisão, a especificidade e o valor preditivo positivo.

O estudo de necrópsia mais recente foi concluído em outubro de 2011, com 178 cavalos. Neste estudo, avaliamos a versão do teste em produção na época e obtivemos os seguintes resultados:

	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo	P-Valor
Albumina (Preditivo para úlceras de cólon)	95,4%	75,0%	0,04
Hemoglobina (Preditivo para úlceras gástricas ou de cólon)	96,9%	57,9%	0,03

O valor preditivo positivo de ambos os testes é alto: um resultado preditivo positivo prevê uma alta probabilidade de que uma úlcera colônica ou gástrica esteja presente. O valor negativo para a hemoglobina parece menos preditivo neste estudo devido a um número reduzido de negativos neste grupo de animais em particular. A porção de albumina da atual iteração do kit de teste tem o limite inferior visível aumentado para 2PPM, em comparação com 1PPM na versão avaliada em 2011.

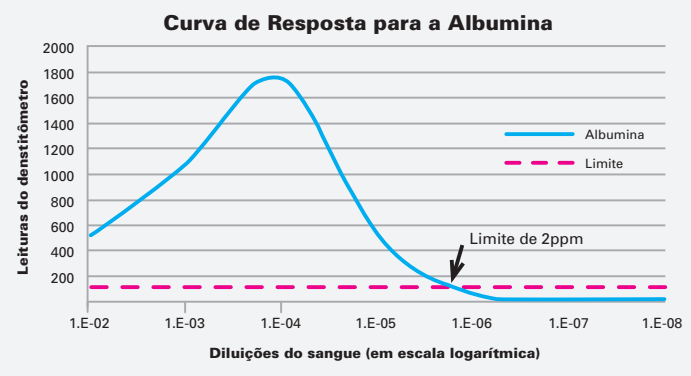
Embora o teste de anticorpos seja confiável e preciso, é importante lembrar que os próprios equinos são um tanto variáveis. O sangue normal do cavalo pode ter de 11-19 g / dL de hemoglobina e 2,4-4,2 g / dL de albumina, mas o sangramento intermitente e as variações na produção fecal também podem afetar as concentrações sanguíneas. Essas medidas podem mudar ao longo do tempo, de modo que os volumes de sangue não podem ser rigorosamente calculados a partir de uma única medida. Como resultado, repetidos testes durante um período estendido podem ajudar a construir um melhor cenário da real perda de sangue.

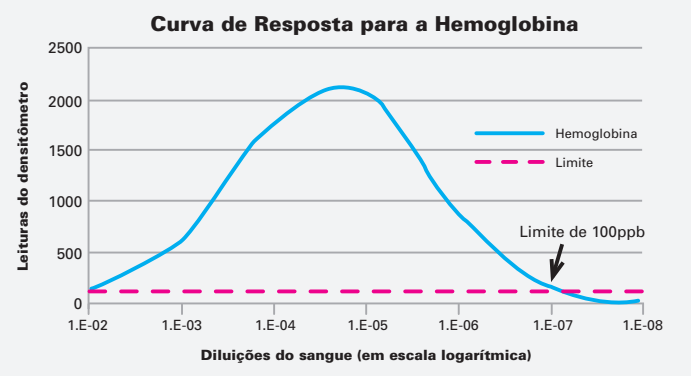
Curvas de resposta de Testes In Vitro

A precisão do SUCCEED FBT é validada por diluições de sangue equino em série, normalmente em potências de dez.

Há duas cavidades no kit: uma para detectar a albumina e outra para detectar a hemoglobina. Na água, a sensibilidade do teste é de 2 partes por milhão (ppm) para a albumina e 0,1 ppm para a hemoglobina, com base em equivalentes do sangue total. Quando qualquer das proteínas excede seu limite, uma linha vermelha aparece em sua janela de visualização.

O gráfico vai de baixa a altas diluições (concentrações inferiores), da esquerda para a direita. O eixo vertical mostra as leituras do densitômetro. A linha tracejada representa o limite do densitômetro, abaixo do qual a linha de teste não é mais visível a olho nu. O limite para albumina é onde a curva intercepta a linha tracejada, a 2 ppm. Para a hemoglobina, o limite é definido como 100 ppb.





O SUCCEED FBT permite realizar um teste simples no próprio estábulo, sem procedimentos ou diagnósticos invasivos e onerosos. O teste fornece uma indicação objetiva e rápida de possíveis lesões no intestino grosso e na porção anterior do trato gastrointestinal e de condições relacionadas, sem depender exclusivamente de sintomatologia e outros dados subjetivos. Munido dessa informação, você pode considerar ou excluir várias hipóteses sobre a saúde do seu equino.

O teste de diagnóstico duplo pode ser realizado em poucos minutos sem nenhum equipamento extra – uma amostra fecal e aproximadamente 90 ml de água limpa e potável, juntamente com o conteúdo de um único kit, são tudo o que você precisa para realizar o teste em seu equino. Os resultados são fáceis de ler diretamente da janela de visualização do teste e aparecem em minutos.

Como o teste pode ser realizado em poucos minutos, é possível testar um grande número de cavalos em um celeiro, ou outro ambiente, no decurso de uma visita a um cliente. Dada a facilidade e a acessibilidade do SUCCEED FBT, profissionais podem testar facilmente todos os cavalos dos seus clientes em um calendário programado. Testes regulares são importantes especialmente para os cavalos de alta performance ou sempre que o manejo, a alimentação ou a criação possam afetar a saúde digestiva dos cavalos, incluindo alimentação intermitente, dietas ricas em grãos ou confinamento em estábulos.

Usando o teste de anticorpos

A albumina e hemoglobina do FBT são úteis para detectar lesões do trato gastrointestinal e possibilitar a diferenciação entre gastrite e colite. O teste pode ser usado em conjunto com o histórico do cavalo para examinar possíveis consequências do uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), incluindo a colite dorsal direita. Também pode ser usado para testar a Enteropatia Perdedora de Proteínas (EPP); a parte de albumina do teste é um indicador sensível de perda de albumina e está calibrada para ignorar níveis basais normais.

Mas, o teste tem maior utilidade a longo prazo, um diagnóstico de uso geral a ser incluído em sua rotina. Nós usamos o kit regularmente em nossos cavalos para garantir que nossos produtos alimentares funcionais são seguros e eficazes. Outros veterinários usam o kit regularmente para:

- Estabelecer dados de referência para novos pacientes
- Monitorar o bem-estar geral do animal
- Confirmar um diagnóstico preliminar de problemas no trato gastrointestinal
- Estabelecer um tratamento baseado em qualquer diferencial descoberto no trato gastrointestinal
- Avaliar o progresso do tratamento
- Adicionar importantes conclusões a um exame de pré-compra
- Monitorar sangramentos internos após cirurgias

Realizar o teste, mesmo quando o equino se encontra com boa saúde digestiva, pode fornecer uma oportunidade para o veterinário educar seus clientes sobre essas questões ocultas do trato gastrointestinal. Ele pode ajudá-lo a fornecer um contexto fisiológico apropriado para muitos problemas de comportamento ou de desempenho que proprietários e treinadores de cavalos enfrentam regularmente, mas que muitas vezes são atribuídos ao treinamento inadequado ou à habilidade individual do equino.

Referências:

[1] Andrews FM, Bernard WV, Byars TD (1999), “Recommendations for the diagnosis and treatment of equine gastric ulcer syndrome (EGUS)”, Equine Vet. Educ.; 1: pp. 122–134.

[2] McClure SR, Glickman LT, Glickman NW (1999,) “Prevalence of gastric ulcers in show horses”, J Am Vet Med Assoc; 215: pp. 1130–1133.

[3] Michell RD (2001), “Prevalence of gastric ulcers in hunter/jumper and dressage horses evaluated for poor performance”, in Proceedings. Annual Meeting of the Association of Equine Sports Medicine 2001; pp. 74–77.

[4] Pellegrini FL (2005), “Results of a large-scale necroscopic study of equine colonic ulcers”, J Equine Vet Sci; 25 (3): pp. 113–117.

[5] Murray MJ (1994), “Gastric ulcers in adult horses”, Comp Cont Educ Pract Vet; 16: pp. 792–794, 797.

[6] Andrews FM, Sifferman RL, Bernard W, Hughes FE, Holste JE, Daurio CP, Alva R, Cox JL (1999), “Efficacy of omeprazole paste in the treatment and prevention of gastric ulcers in horses”, Equine Vet. J; 31: pp. 81–86.

[7] Barrows GH, Burton RM, Jarett DD, Russell GG, Alfor MD, Songster CL (1978), “Immunochemical detection of human blood in feces”, Am J of Clin Path; 69 (3): pp. 342–346.

SUCCEED™

Equine Fecal Blood Test™

The SUCCEED Equine Fecal Blood Test – Teste de sangue oculto fecal equino

www.succeedfbt.com.br

Importador e distribuidor no Brasil:

viva AGRO

CNPJ nº 22.150.865/0001-77
Rua Joaquim Nabuco, n° 338 - sala 03 Maringá, PR CEP 87014-100
Atendimento ao consumidor: + 55 (44) 3224-2498
Para pedidos, visite nossa loja online: www.succeed.com.br

SUCCEED™

Equine Fecal Blood Test™

FREEDOM HEALTH, LLC
65 Aurora Industrial Parkway
Aurora, OH 44202

freedom health llc

O SUCCEED Equine Fecal Blood Test é um produto de qualidade de Freedom Health LLC.

SUCCEED® e Equine Fecal Blood Test™ são marcas registradas da Freedom Health LLC ©2018.
Todos os direitos reservados. SUCCEED Equine Fecal Blood Test detém Patente Brasileira: PI 0519060-6 A2

C606BR 04/18