

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ANDRÉ BARBOSA MACIEL

Infecção Experimental de Equinos (*Equus caballus*) e Muares (*Equus asinus* x *Equus caballus*) com o Vírus da Anemia Infecciosa Equina

**Belo Horizonte
2008**

ANDRÉ BARBOSA MACIEL

Infecção Experimental de Equinos (*Equus caballus*) e Muares (*Equus asinus* x *Equus caballus*) com o Vírus da Anemia Infecciosa Equina

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

M152i Maciel, André Barbosa, 1981-
Infecção experimental de equinos (*Equus caballus*) e muares (*Equus asinus x Equus caballus*) com o vírus da anemia infecciosa equina / André Barbosa Maciel. – 2008.
54f: il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Muar – Doenças – Teses. 3. Anemia infecciosa equina – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 969 2

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

FOLHA DE APROVAÇÃO



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG
FONES (31)-3409 2056 - 3409 2057 FAX (31) 3409 2059

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
E-mail cap@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ANDRÉ BARBOSA MACIEL**

Às 09:00 horas do dia 07 do mês de novembro de 2008, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado dos Cursos em 08/10/2008 para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE EQUINOS (EQUUS CABALLUS) E MUVARES (EQUUS ASINUS x EQUUS CABALLUS) COM O VIRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

_____, como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.**

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. (a) Marcus Bryan Heinemann, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Dr. <u>MARCOS BRYAN HEINEMANN</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>MARCELO FERNANDES CAMARGOS</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>JENNER KARLISON PIMENTA DOS REIS</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 08 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da dissertação apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 7 de NOVEMBRO de 2008.

Assinatura dos membros da banca:

Marcos Bryan Heinemann

Marcelo Fernando Camargos

(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Aos meus pais Alcimar e Maria Cecília pelo amor, incentivo e exemplos, tanto profissionais quanto pessoais, sem os quais este momento não seria possível,

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas muitas bênçãos durante toda essa jornada.

Ao meu orientador e amigo, Professor Marcos Bryan, pela disponibilidade, conselhos e ajuda durante todo o mestrado.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite, por ter me recebido nesta Escola de Veterinária e pelo apoio e amizade nas horas mais difíceis.

Aos meus avós, Alélia, Maria e Oliveiros, pelo simples fato de vocês existirem na minha vida.

Aos meus Tios Antônio, Sara, Carlos, Leila e Isis, pelo amor e carinho a mim dispensados e cujo apoio foi indispensável para conclusão desta etapa.

A minha irmã Carolina e ao meu cunhado Rodrigo, pelo apoio e carinho em todas as horas da minha vida.

Aos meus queridos tios Luciano e Débora, por todo o carinho e ajuda sem os quais seria impossível a realização deste.

Aos meus grandes amigos, Jair Madureira e Carlos Stief por me darem a honra de suas amizades.

Ao meu primo Roberto, pelo exemplo de vida.

A Raquel e Soraya, minhas primas amadas, e a minha querida amiga Mariana Morbin Leite de Barros, também pelo simples fato de vocês existirem na minha vida.

Ao meu amado padrinho Ademar, por nunca deixar de acreditar em mim.

Aos meus amigos Álvaro P. de Oliveira, Lucas C. Uetanabaro, Rafael Bock, Silvio Hofmann, Guilherme L. Rodrigues, Maira Arruda, André Penido, Geraldo Mascarin, Ulisses Medeiros, Joaquim C. do Prado, Marcos Camargo, Melissa Amim, Ana Ramos, Radamés e Fabiana, Rízia Maria, Jair P. Osório, Pedro Motta e Sandra Marin Gómez, pelo companheirismo, carinho e conselhos em todas as horas.

Aos membros do Retrolab e, em especial ao professor Jenner e a Elizângela, pela ajuda na realização deste.

Aos meus estagiários em Campo Grande, Renato e Rogério, pela dedicação e empenho.

Ao colegiado dos cursos de Pós Graduação, pelo apoio, atenção e colaboração.

"Toda a arte de ensinar é apenas a arte de acordar a curiosidade natural nas mentes jovens, com o propósito de serem satisfeitas mais tarde"

(Anatole France)

RESUMO

Introdução: A AIE é uma enfermidade que acomete somente animais da família *Equidea*, sendo causada por um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus*, e à família *Retroviridae*. Uma maior prevalência do vírus é registrada em áreas geográficas de clima quente e úmido, refletindo a importância da transmissão por insetos tabanídeos hematófagos da ordem *Diptera*. Atualmente, a AIE é um entrave para o desenvolvimento da equideocultura, por seu caráter transmissível e incurável, acarretando prejuízos aos proprietários que necessitam do trabalho desses animais e aos criadores interessados na melhoria das raças. **Objetivo:** comparar a dinâmica da infecção do vírus da anemia equina em equinos e muares, para verificar se há diferenças na infecção entre as duas espécies. **Material e método:** O presente experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados os procedimentos relacionados à inoculação dos animais com o vírus da AIE e a obtenção, alíquotagem e armazenamento das amostras obtidas, bem como a posterior eutanásia dos animais. A segunda etapa realizou-se os testes sorológicos (IDGA e ELISA). **Resultados: Equinos:** os animais apresentaram uma redução no número de plaquetas após o pico febril e no hematócrito, indicando uma leve anemia hemolítica. Não foi observada nenhuma alteração digna de nota em nenhum outro parâmetro avaliado no hemograma. **Muares:** apesar de haver ocorrido algumas variações nos parâmetros avaliados, de forma geral, os animais não apresentaram sinais que evidenciam a infecção com o VAIE. **Equinos versus Muares:** Observou-se que os equinos apresentaram picos febris em torno do 40º dia PI, como também uma queda acentuada no número de plaquetas e nos valores do hematócrito, enquanto que os muares, em média, não apresentaram alterações nos parâmetros normais de temperatura, plaquetas e hematócrito. **Discussão:** Animais infectados com VAIE podem apresentar durante a fase aguda da doença, episódios febris de intensidade variável, trombocitopenia, anemia hemolítica, prostração, anorexia, perda de peso, edema ventral, alopecia, epistaxe e em algumas vezes alterações neurológicas. A ocorrência de sintomatologia mais severa da AIE parece estar associada com episódios febris com picos de temperatura, acima dos 40,5°C, os quais são associados à replicação viral mais intensa e por consequência uma maior carga de RNA viral no plasma. A grande maioria dos animais infectados com o VAIE se recupera após um período variável de dias e permanecem clinicamente saudáveis durante dias ou semanas, até apresentarem episódios recorrentes de febre, trombocitopenia e prostração. Após o período 12 meses após a infecção, a maioria dos animais deixa de apresentar sinais clínicos da infecção e entram na fase assintomática da doença, tornando-se portadores inaparentes do vírus e se tornando uma importante fonte de infecção dentro dos rebanhos. Sugere que algumas espécies de equídeos e raças de equinos são mais resistentes a certas infecções do que outras. Além disso, é amplamente relatada por criadores e por pessoas as quais trabalham diretamente com os animais, uma maior resistência do cavalo pantaneiro e dos muares em manifestar os sinais clínicos da AIE. **Conclusões:** Os muares são mais resistentes a manifestações clínicas causadas pelo VAIE adaptado a equinos. Os cavalos da raça pantaneira apresentam a sintomatologia clássica associada ao VAIE. O ELISA é mais eficiente na detecção de anticorpos anti-VAIE, tanto em muares como em equinos.

Palavras chaves: anemia infecciosa equina; muar; equino; infecção experimental

ABSTRACT

Introduction: AIE is a disease that only affects animals from the Equidae family, being caused by a virus belonging to the genus Lentivirus, and the Retroviridae family. A greater prevalence of the virus is recorded in geographic areas with hot and humid climates, reflecting the importance of transmission by hematophagous tabanid insects of the Diptera order. Currently, AIE is an obstacle to the development of equine farming, due to its transmissible and incurable nature, causing losses to owners who need the work of these animals and to breeders interested in improving breeds. **Objective:** to compare the dynamics of equine anemia virus infection in horses and mules, to verify whether there are differences in infection between the two species. **Material and method:** The present experiment was carried out in two stages. In the first stage, procedures related to the inoculation of animals with the AIE virus and the obtaining, aliquoting and storage of the samples obtained were carried out, as well as the subsequent euthanasia of the animals. The second stage involved serological tests (IDGA and ELISA). **Results:** Horses: the animals showed a reduction in the number of platelets after the fever peak and in hematocrit, indicating a mild hemolytic anemia. No noteworthy changes were observed in any other parameter assessed in the blood count. Mules: although there were some variations in the parameters evaluated, in general, the animals did not show signs that demonstrated infection with VAIE. Horses versus Mules: It was observed that horses presented fever peaks around the 40th day PI, as well as a sharp drop in the number of platelets and hematocrit values, while mules, on average, did not show changes in normal parameters of temperature, platelets and hematocrit. **Discussion:** Animals infected with VAIE may present, during the acute phase of the disease, febrile episodes of varying intensity, thrombocytopenia, hemolytic anemia, prostration, anorexia, weight loss, ventral edema, alopecia, epistaxis and sometimes neurological changes. The occurrence of more severe EIA symptoms appears to be associated with febrile episodes with temperature spikes, above 40.5°C, which are associated with more intense viral replication and consequently a greater load of viral RNA in plasma. The vast majority of animals infected with VAIE recover after a variable period of days and remain clinically healthy for days or weeks, until they present recurrent episodes of fever, thrombocytopenia and prostration. After 12 months after infection, most animals stop showing clinical signs of infection and enter the asymptomatic phase of the disease, becoming inapparent carriers of the virus and becoming an important source of infection within herds. It suggests that some equine species and equine breeds are more resistant to certain infections than others. Furthermore, it is widely reported by breeders and people who work directly with animals that Pantanal horses and mules are more resistant to showing clinical signs of AIE. **Conclusions:** Mules are more resistant to clinical manifestations caused by VAIE adapted to horses. Pantanal horses present the classic symptoms associated with VAIE. ELISA is more efficient in detecting anti-AIAV antibodies, both in mules and horses.

Keywords: equine infectious anemia; mule; equine; experimental infection

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 1, número de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós-infecção	35
Gráfico 2	Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 2, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	36
Gráfico 3	Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 3, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	37
Gráfico 4	Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 4, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	38
Gráfico 5	Relação entre temperatura retal média (°C) do muar 1, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	39
Gráfico 6	Relação entre temperatura retal média (°C) do muar 2, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	40
Gráfico 7	Relação entre temperatura retal média (°C) do muar 3, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	41
Gráfico 8	Relação entre temperatura retal média (°C) do muar 4, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito(%), de acordo com os dias pós-infecção.	42
Gráfico 9	Relação entre temperatura retal (°C) média, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) dos equinos (potros) versus dos muares e hematócrito de ambas as espécies, de acordo com os dias pós-infecção com o vírus da anemia infecciosa equina.	43
Gráfico 10	Dias pós-infecção em que os testes resultam em positividade dos animais. (p1 potro 1, p2 potro 2, p3 potro 3, p4 potro 4, m1 muar 1, m2 muar 2, m3 muar 3, m4 muar 4).	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Animais se alimentando com feno.....	29
Figura 2.	Coleta de Amostras.....	30
Figura 3.	Comparativo do estado clínico dos animais (muar castanho e equino tordilho).	37

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Histórico.....	14
2.2	Etiologia Viral.....	15
2.3	Transmissão.....	16
2.4	Viremia e Replicação Viral.....	17
2.5	Patogenia.....	17
2.6	Sinais Clínicos.....	19
2.7	Resposta Imunológica ao VAIE.....	20
2.8	Infecção com o VAIE em Outros Equideos.....	21
2.9	Métodos de Diagnóstico e Controle da AIE.....	23
3.	OBJETIVOS.....	26
3.1	Geral.....	26
3.2	Específicos.....	26
4.	Material e Métodos.....	27
4.1	Infecção Experimental.....	27
4.1.1	Animais.....	27
4.1.2	Obtenção do Inoculo Viral.....	28
4.1.3	Inoculação Experimental dos Animais.....	28
4.2	Isolamento e Condições dos Animais Durante o Experimento.....	28
4.3	Temperatura e Coleta de Amostras.....	29
4.4	Processamento das Amostras.....	30
4.5	Exames Hematológicos.....	31
4.6	Sorod diagnóstico para Anemia Infecciosa Equina.....	31
4.6.1	Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA).....	31
4.6.2	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto para a Pesquisa de Anticorpos Contra a Proteína Recombinante gp 90.....	32
4.7	Eutanásia dos Animais.....	33
4.8	Análise dos Dados Obtidos.....	33
5.	RESULTADOS.....	34
5.1	Avaliação Clínica.....	34
5.2	Hematologia e Temperatura.....	35
5.2.1	Equinos.....	35

5.2.2	Muare.....	38
5.2.3	Equinos versus Muare.....	43
5.3	Sorologia.....	43
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma enfermidade que acomete somente animais da família *Equídea* (equinos, muares e asininos), sendo causada por um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus*, e à família *Retroviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Esta patologia foi descrita pela primeira vez em 1843 na França e teve definida sua etiologia viral em 1904 (Montelaro, 1993).

Todos os membros desta família (*Retroviridae*) contêm três principais genes estruturais/funcionais denominados: *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas da estrutura viral e enzimas. O gene *gag* codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9; o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, integrase e protease; o gene *env* codifica as glicoproteínas gp90 (superfície externa) e gp45 (transmembrana) (Clements e Zink, 1996).

Uma maior prevalência do vírus é registrada em áreas geográficas de clima quente e úmido, refletindo a importância da transmissão por insetos tabanídeos hematófagos da ordem *Díptera* (Issel e Coggins, 1979). Trata-se de um patógeno de distribuição cosmopolita, que no Brasil, no período de 1993 a 2003, permaneceu sem grandes alterações segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Boletim de Defesa Sanitária Animal, com uma incidência média de 2,06% em 2.168.744 soros testados. Atualmente, a AIE é considerada endêmica em Minas Gerais, com uma prevalência de 5,29% para rebanhos e de 3,08% para animais de serviço. As áreas Norte, Noroeste, Vale do Mucuri e Jequitinhonha apresentam a maior prevalência da enfermidade no Estado (Almeida, 2005).

O Brasil ocupa a terceira posição mundial em relação ao número de equídeos após o México e a China. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), o rebanho equídeo brasileiro é de 5.787.250 animais, sendo que 1.126.815 encontra-se na região Centro-Oeste.

O mercado para o equídeo nacional, principalmente na região Centro-Oeste, está em visível crescimento constituindo uma importante cadeia no agronegócio, com estreita relação com os setores ligados à indústria farmacêutica, alimentícia, esportiva, de turismo entre outras. As atividades que envolvem o cavalo ganham importância social e econômica, pois são traduzidas em movimentações econômicas da ordem de R\$ 7,3 bilhões ao ano e pela

ocupação direta de cerca de 640 mil pessoas. Tal cifra poderia atingir a casa de 3,2 milhões se forem incluídos empregos considerados indiretos.

Atualmente, a AIE é um entrave para o desenvolvimento da equideocultura, por seu caráter transmissível e incurável, acarretando prejuízos aos proprietários que necessitam do trabalho desses animais e aos criadores interessados na melhoria das raças. Além disso, impede o acesso ao mercado nacional e internacional (Almeida, 2005).

O controle da AIE em todo o mundo é baseado na identificação dos animais infectados pelo VAIE por meio de testes sorológicos, seguidos de eutanásia ou isolamento dos mesmos dependendo da legislação vigente em cada país ou região (Issel e Coggins, 1979; Leroux *et al.*, 2004). Os testes laboratoriais mais utilizados são o IDGA (imunodifusão em gel de ágar) considerado teste oficial em vários países, e o ELISA (ensaio imunoenzimático). A grande desvantagem do IDGA, é que ele é considerado pouco sensível, demorado e algumas vezes de difícil leitura especialmente em reações fracamente positivas. Nos Estados Unidos, por exemplo, tem sido associado ao IDGA o uso do ELISA como teste de triagem na tentativa de aumentar a certeza diagnóstica.

Na literatura (Leroux *et al.*, 2004) há relatos que algumas espécies de equídeos são mais resistentes a certas doenças do que outras, como exemplo, a própria anemia infecciosa equina. Entretanto há pouca informação no que diz respeito à patogenia do vírus da anemia infecciosa equina nos muare (*Equus asinus* X *Equus caballus*).

Frente ao exposto, este trabalho tem como objetivo comparar a dinâmica da infecção do vírus da anemia equina em equinos (*Equus caballus*) e muare (*Equus asinus* X *Equus caballus*), para verificar se há diferenças na infecção entre as duas espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A primeira descrição da AIE como enfermidade infecto-contagiosa, que acomete equídeos foi registrada na França em 1843. No entanto, sua etiologia viral só foi confirmada em 1904 (Montelaro, 1993).

Nas Américas, a doença foi diagnosticada pela primeira vez no Canadá, em 1881, sendo que em 1896 já haviam vários casos descritos em diversas regiões dos Estados Unidos. Em 1960, a AIE foi diagnosticada na Venezuela e em 1964 na Argentina (Hammer, 1999). No Brasil, a primeira descrição de caso ocorreu, em 1968, no Jockey Clube Brasileiro, no extinto Estado da Guanabara (Dupont *et al.*, 1968). Em Minas Gerais, o primeiro caso diagnosticado também ocorreu em 1968, contudo, os resultados obtidos por meio de exames clínicos, laboratoriais e anatomo-patológicos só foram divulgados em 1971 (Batista Júnior e Fonseca, 1971). Considera-se, que a AIE chegou ao Mato Grosso do Sul e ao Pantanal na década de 70, onde quase levou a extinção do cavalo pantaneiro.

A partir de 1968, foram implementadas medidas de ordem sanitária pela Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Foram adotadas restrições de trânsito, inclusive aos equídeos destinados ao abate, e eutanásia de todos os animais doentes diagnosticados pelos exames disponíveis na época, como a inoculação de sangue suspeito em equídeo susceptível (Brasil, 1974). A partir de 1974, o teste de Coogins (IDGA), foi declarado como teste oficial para AIE (Coggins e Norcross, 1970) e é utilizado até hoje como prova definitiva para a AIE.

Atualmente, nos países do hemisfério norte (Canadá, Estados Unidos e grande parte da Europa ocidental), a ocorrência da AIE é rara. Contudo, a doença vem se espalhando pelas Américas Central e do Sul, chegando a atingir em alguns países, um percentual acima de 30% de animais positivos em relação ao rebanho total (Hammer, 1999).

2.2 Etiologia Viral

A AIE é uma enfermidade infecto-contagiosa causada por um vírus pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* e que só acomete equídeos (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Seu genoma é constituído por duas fitas de RNA de 8.2 Kb, sendo considerado um dos menores vírus pertencentes a este gênero. Todos os membros desta família contêm três

principais genes estruturais/funcionais denominados: *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas da estrutura viral e enzimas (Clements e Zink, 1996). O gene *gag* codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9 presentes no capsídio viral; o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease e o gene *env* codifica as glicoproteínas estruturais gp90 de superfície externa e a gp45 transmembrana, sendo estas responsáveis pela interação com os receptores da célula-alvo e eventos de penetração celular. Durante o curso da doença a gp90 é submetida à rápida evolução e mutações são restritas a definidas regiões variáveis (Leroux *et al.*, 2004). A variação na gp90, gerando novas variantes, pode ser considerada um dos mecanismos de escape do vírus ao sistema imunológico (Howe *et al.*, 2002).

Além das proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env*, o genoma do VAIE contém três sequências de leitura aberta que codificam as proteínas TAT, REV e S2 que controlam o nível de replicação do vírus. A proteína S2 é um importante determinante na replicação viral e propriedades patogênicas *in vivo* (Stephens *et al.*, 1990; Martarano *et al.*, 1994).

2.3 Transmissão

A principal fonte de infecção para os animais susceptíveis são os próprios animais infectados. O sangue destes animais é a principal via de transmissão (Issel e Foil, 1984). Dessa forma, o reaproveitamento de agulhas e a utilização de material cirúrgico, sem a devida desinfecção e esterilização, têm grande responsabilidade na disseminação do vírus. Resultados de estudos sobre a sobrevivência do VAIE em agulhas indicam que este pode permanecer infectante por até 96 horas. Outra via de transmissão comumente observada são os utensílios de montaria utilizados nas propriedades (Williams *et al.*, 1981).

Na natureza, as condições climáticas e ambientais, a população de insetos hematófagos e a densidade de equídeos em uma mesma área são fatores determinantes para a disseminação da doença (Issel *et al.*, 1988). Uma maior prevalência do vírus é registrada em áreas geográficas de clima quente e úmido, refletindo a importância da transmissão por insetos tabanídeos hematófagos (*Tabanus sp*) da ordem *Diptera*. Nos vetores, o VAIE permanece vivo por um período de 30 minutos a 4 horas, de modo que o inseto deve completar o repasto sanguíneo, que foi interrompido em um animal contaminado, rapidamente em um animal susceptível para que haja transmissão da doença (Hawkins *et al.*, 1973).

A transmissão vertical pode ocorrer através da placenta de éguas soro-positivas no momento do parto. A resposta fetal para a infecção é variável, possibilitando a ocorrência de abortos, nascimentos de vírus positivo ou portadores soropositivos (Issel e Coggins, 1979). Desde que o VAIE foi demonstrado no sêmen de garanhão com sinais agudos, a transmissão venérea é possível tendo grande importância na inseminação artificial, uma vez que nunca foi documentado nenhum caso de transmissão natural em éguas expostas a garanhões contaminados (Issel *et al.*, 1990).

2.4 Viremia e Replicação Viral

O alvo primário do VAIE *in vivo*, são células da linhagem monócito/macrófago, contudo, têm sido recentemente relatado uma limitada infecção em células endoteliais macro vasculares nos tecidos renais de cavalos portadores inaparentes (Maury *et al.*, 1998). A infecção de monócitos do sangue com o VAIE resulta em uma infecção não produtiva e a diferenciação de monócitos infectados em macrófagos é necessária para ativar a replicação viral (Sellon *et al.*, 1996; Maury *et al.*, 1998). Este padrão de infecção indica que os monócitos infectados com o vírus podem servir como “Cavalo de Tróia”, carreando a infecção do VAIE para os tecidos sem detecção do sistema imune (Clements e Zink, 1996). A identificação do VAIE em células endoteliais macro-vasculares sugere que este tipo celular pode também servir como reservatório viral em portadores inaparentes (Maury *et al.*, 1998).

Os altos títulos de vírus observados durante a fase aguda estão associados com altos níveis de replicação do vírus em tecidos ricos em macrófagos, incluindo fígado, baço, rim, pulmões, linfonodos e glândula adrenal. Outros tecidos parecem conter baixos níveis de infecção viral mesmo quando os títulos virais no plasma sanguíneo estão altos (Sellon *et al.*, 1996).

2.5 Patogenia

A patogenia da AIE é dividida clinicamente em três fases bem caracterizadas e decorrentes de fatores inerentes ao vírus (dose e virulência do estrato viral infectante e cepa viral), ao hospedeiro (estado imunológico, idade e susceptibilidade individual do animal) e da combinação de ambos (mecanismos de escape do vírus frente ao sistema imunológico do animal), sendo elas: aguda, crônica e inaparente (Mcguire *et al.*, 1971).

A fase aguda é caracterizada por febre, anorexia, pronunciada viremia resultante de uma extensiva replicação viral nos macrófagos teciduais ou periféricos e possui duração de 5 a 30 dias pós-infecção (Mcguire *et al.*, 1971). Nesta fase da doença o diagnóstico sorológico pode gerar resultados negativos, devido à ausência ou ao baixo título de anticorpos específicos que aparecem geralmente por volta do décimo ao décimo quarto dia pós-infecção (Coggins *et al.*, 1972). Uma das características mais marcantes deste estágio da doença é a anemia e trombocitopenia associada à febre que precede o aparecimento dos anticorpos. Estes sintomas iniciais da doença geralmente desaparecem dentro de poucos dias, contudo, uma pequena porcentagem dos animais infectados pode desenvolver forma grave e fatal da AIE (Crawford *et al.*, 1978).

A anemia é resultante da hemólise e fagocitose mediada pela presença de eritrócitos recobertos pelas proteínas do complemento e pela redução da eritropoiese. Os mecanismos que induzem a trombocitopenia são os mesmos que provocam a anemia, seja pela inibição da eritropoiese pelo aumento dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que é um regulador negativo da produção de plaquetas no plasma dos animais infectados e pela deposição de imunocomplexos com a consequente destruição das plaquetas e dos eritrócitos pelos macrófagos hepáticos. A hipertermia deve-se ao aumento dos níveis de TNF- α e também pela produção de interleucina 1 (IL-1) pelas células da linhagem monocítica-macrofágica. Alguns animais podem apresentar leucopenia com discreta linfocitose e um aumento do número de monócitos circulantes (Ravazzolo e Costa, 2007). Poucos animais desenvolvem um quadro inaparente da doença após essa fase inicial, e a maioria progride para a fase crônica (Crawford *et al.*, 1978).

Logo após a fase aguda, tem início a fase crônica da doença. Esta é caracterizada por episódios recorrentes de viremia, nos quais ocorre toda a sintomatologia apresentada na fase aguda, porém, de um modo geral, a gravidade dos sintomas é mais branda. Os episódios nesta fase tem duração média de 3 a 5 dias e aparecem em intervalos irregulares de tempo, podendo variar de semanas a meses. Acredita-se que a frequência na ocorrência destes episódios esteja associada a condições de manejo, nutricionais e imunológicas dos animais. A maioria dos equídeos infectados que sobrevivem às fases aguda e crônica tornando-se portadores inaparentes do vírus por toda a vida (Montelaro, 1993).

A maioria dos equídeos VAIE positivos encontrados na natureza estão na fase inaparente da AIE. Estes animais não apresentam sinais clínicos da doença, e a viremia é insignificante. Apesar disso, estes animais continuam sendo portadores do vírus e são considerados as principais fontes de infecção para os animais susceptíveis (Montelaro, 1993). Achados científicos indicam que a replicação viral, e a doença nesta fase da infecção pelo VAIE estão sob controle do sistema imunológico do hospedeiro equídeo apesar dos mecanismos de escape empregados pelo vírus para manter a persistência (Montelaro, 1993; Hammond *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2002).

2.6 Sinais Clínicos

A infecção, nos equinos, resulta normalmente em uma sequência progressiva, bem caracterizada e cíclica de sinais clínicos, podendo ser dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente (Sellon *et al.*, 1996).

Durante a fase aguda o animal apresenta anorexia, a qual geralmente é causada pelo pico febril, com febre até 41°C, que na maioria dos casos ocorre por volta do décimo quinto dia pós-infecção. O pico febril é acompanhado de uma extensiva replicação viral nos macrófagos teciduais ou periféricos. O período agudo da doença varia de cinco a trinta dias pós-infecção e nesta fase da doença, podem ocorrer resultados falso-negativos, tanto pelo IDGA quanto pelo ELISA, uma vez que os títulos de anticorpos são muito baixos e frequentemente não são detectáveis (Cook *et al.*, 1996; Sellon *et al.*, 1996).

O segundo estágio da doença, a fase crônica, é caracterizado por ciclos recorrentes de viremia os quais são associados à febre, anorexia, edema, leucopenia, anemia, trombocitopenia, hemorragias, diarreia, glomerulonefrite e letargia. Cada episódio clínico, neste estágio, tem duração média de três a cinco dias, e o intervalo entre os ciclos da doença é irregular podendo ser de semanas a meses. A frequência e gravidade dos episódios da doença diminuem com o tempo, e após uma média de seis a oito episódios, o estágio crônico da AIE termina tendo início o estágio inaparente da infecção. A maioria dos equídeos infectados que sobrevivem às fases aguda e crônica torna-se portadores inaparentes do vírus por toda a vida (Cheevers e McGuire, 1985; Montelaro, 1993; Cook *et al.*, 1996; Sellon *et al.*, 1996).

Os animais em fase inaparente da doença são predominantes no campo e constituem as principais fontes de infecção para os animais saudáveis, refletindo a importância do diagnóstico de triagem para evitar a disseminação da enfermidade entre os equídeos. Além da importância para o diagnóstico, animais no período assintomático apresentam uma queda acentuada no desempenho (Montelaro, 1993; Cook *et al.*, 1996; Sellon *et al.*, 1996).

2.7 Resposta Imunológica ao VAIE

Estudos sugerem que durante o curso da infecção pelo VAIE, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune efetiva e duradoura, capaz de manter a replicação viral abaixo do limiar para a indução da doença (Hammond *et al.*, 2000).

De modo geral, altos títulos de vírus circulante (viremia) só são observados nas primeiras 2 a 3 semanas pós-infecção. Acredita-se que isto ocorra devido aos mecanismos celulares e humorais específicos desencadeados pela infecção. Estes mecanismos capazes de interromper a replicação viral inicial e mantê-la em níveis reduzidos, tais como a emergência de linfócitos T citotóxicos (CD8+) específicos para o VAIE e anticorpos específicos não neutralizantes (McGuire *et al.*, 1994; Perryman *et al.*, 1988). Animais infectados pelo VAIE desenvolvem forte resposta imune contra as glicoproteínas de superfície (gp90), transmembrana (gp45) e a principal proteína do core viral, a p26. Apesar da p26 ser a mais abundante proteína do vírus, a resposta humoral anti-p26 é de 10 a 100 vezes mais baixa do que a reatividade contra a gp90 e gp45 (Hammond *et al.*, 1999).

Anticorpos neutralizantes que são capazes de bloquear o estrato infectante, usualmente emergem somente depois de 2 a 3 meses pós-infecção, sugerindo que não são os responsáveis pelo término do episódio agudo inicial. O papel dos anticorpos neutralizantes ainda está incerto nas pesquisas sobre VAIE. Apesar disso, a reincidência dos episódios clínicos está associada à emergência de variantes que escapam dos anticorpos neutralizantes, refletindo a importância destes no controle da replicação viral (Kono *et al.*, 1973; Leroux *et al.*, 1997; Leroux *et al.*, 2001). Estudos da resposta humoral na evolução de estágio crônico para portador inaparente descreveram uma evolução gradual durante os primeiros 10 meses pós-infecção. Durante este período, anticorpos específicos para o VAIE sofrem maturação da especificidade e avidéz. Ainda não se sabe ao certo, mas acredita-se que estas mudanças na

conformação dos anticorpos seja um dos fatores responsáveis pela manutenção dos baixos níveis de replicação durante a fase de portador inaparente (Hammond *et al.*, 2000).

Os primeiros anticorpos a aparecerem no sangue são contra a glicoproteína gp90 (anti-gp90), e são tipicamente detectados aos 7-10 dias pós-infecção, até atingir um pico de concentração, constituindo assim o anticorpo predominante no animal contaminado. A segunda classe de anticorpos detectável é específica para a proteína p26 (principal proteína do core viral), e são observados aos 10-14 dias pós-infecção, atingindo um pico de concentração rapidamente, mas com valores inferiores ao observados para gp90 (Montelaro, 1993).

O teste ELISA indireto com a proteína gp90 recombinante (rgp90) permite detectar a maioria dos cavalos infectados com resultados negativos pelo teste IDGA, que utiliza a proteína p26 como antígeno (Reis, 1997). Este teste mostrou ser um método sensível para detectar anticorpos anti-VAIE, podendo ser realizado em larga escala, com resultados obtidos dentro de 4 a 5 horas, portanto, poderia servir como uma alternativa ao IDGA para o diagnóstico da AIE, já que permitem detectar a maioria dos cavalos infectados não reagentes ao IDGA (Martins, 2004).

Entretanto, há pouca informação no que diz respeito à resposta imune de outros equídeos, como os muares, para a infecção com este vírus. Tem sido relatada a resistência dos muares por criadores e pessoas que lidam com estes animais em rebanhos infectados. Na região do pantanal sul-mato-grossense com prevalência acima de 50%, proprietários rurais já estão optando por muares ao invés de equinos. Esse fato se deve, segundo eles próprios, a maior resistência desses animais em apresentar sintomas da AIE.

2.8 Infecção com o VAIE em outros Equídeos

Os eventos clínicos descritos anteriormente, bem como o estabelecimento de uma resposta imune e a evolução viral estão bem descritos em cavalos e pôneis (*Equus caballus*) (Sellon *et al.*, 1996; Oaks *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 2000; Harrold *et al.*, 2000; Leroux *et al.*, 2001), porém, pouca informação no que diz respeito à infecção e às respostas imunes de outros equídeos como muares (*Equus asinus x Equus caballus*) e asininos (*Equus asinus*) tem sido descrita na literatura. Cook *et al.* (2001) realizaram um trabalho experimental utilizando cinco

pôneis (*Equus caballus*) e três jumentos (*Equus asinus*) inoculados com amostras patogênicas do VAIE. A comparação, da resposta sorológica, viremia, sinais clínicos e analisaram o nível de plaquetas aos 365 dias pós-infecção (DPI), demonstrou experimentalmente que os pôneis inoculados com o VAIE apresentaram episódios febris recorrentes (com até 41,1C°), com significativa queda na contagem de plaquetas (de até 84,5% de redução) e sinais como edema e petéquias na mucosa oral. Somente um dos jumentos inoculados apresentou uma transitória e leve queda na contagem de plaquetas do 24° ao 59° DPI e permaneceu assintomático durante os 365 dias de observação como a maioria dos outros asininos do experimento. Quanto à sorologia, foram detectados nos pôneis anticorpos contra a proteína p26, por meio de ELISA entre o 21° e o 28° DPI. Em relação aos jumentos, não foi possível detectar anticorpos antes do 42° dia PI. No IDGA, além de se detectar reações positivas mais tardiamente, os jumentos apresentavam reações positivas de fraca intensidade das linhas de precipitação. A viremia foi avaliada através de RT-PCR, onde cavalos apresentaram reações positivas e nos jumentos, só foi possível detectar viremia em alguns deles, somente após a realização da nested RT-PCR, um teste conhecidamente muito mais sensível.

Toma (1980) após um levantamento da AIE em um rebanho na França, usando IDGA, detectou grande número de animais positivos. A partir de então realizou um programa de controle no rebanho e conseguiu erradicar a doença. Após seis anos de o rebanho ter sido considerado livre, voltou a surgir um novo foco. O responsável por este foco foi um jumento que tinha sido considerado negativo por apresentar fracas reações no IDGA durante o primeiro surto e na realidade era positivo. Através deste trabalho demonstrou-se como os asininos podiam reagir fracamente na IDGA e a sua importância como mantenedores do VAIE nos rebanhos equídeos.

Os asininos embora susceptíveis ao VAIE, podem apresentar níveis de viremia muito baixos, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem, usualmente, os sinais clínicos da enfermidade (Cook *et al.*, 2001) já que várias linhas de evidência sugerem uma correlação entre níveis de replicação viral e gravidade da doença durante infecção por lentivírus em primatas (Mellors *et al.*, 1996). Como os asininos apresentam reações fracamente positivas nos testes de precipitação (IDGA) existe o risco de se obter resultados falso-negativos, já que a leitura é visual, subjetiva e dependente da habilidade do leitor. Esse fato representa um

problema para o controle da AIE em rebanhos que possuem equinos juntamente com asininos e muares o que é bastante comum no Brasil. A não identificação de animais positivos constitui um fator de manutenção da doença nos rebanhos, pois, apesar de apresentarem baixa viremia os asininos são sabidamente reservatórios e, portanto, transmissores em potencial da AIE.

Motta (2007), em um estudo de comparação da resposta sorológica entre equinos, muares e asininos naturalmente infectados, concluiu que a resposta sorológica e viremia dos muares é diferente, em relação aos equinos.

2.9 Métodos de Diagnóstico e Controle da AIE

Desde o isolamento do VAIE, muitos testes foram empregados com o objetivo de se obter um diagnóstico seguro e precoce da infecção.

O primeiro teste a ser empregado foi à inoculação de amostras em animais susceptíveis a doença. Contudo, este método era caro e a demora para se obter o resultado inviabilizaram a aplicação do mesmo em larga escala. Com a evolução dos métodos de diagnóstico, alternativas surgiram como a fixação de complemento e inibição da hemoaglutinação (Nakajima *et al.*, 1972; Kono *et al.*, 1973; Sentsui *et al.*, 1982).

Por outro lado, a IDGA foi o primeiro teste confiável para detectar anticorpos específicos para VAIE em formato comercial, utilizando a proteína p26 do capsídio viral como antígeno para detecção de anticorpos anti-p26. O IDGA é o teste oficial para diagnóstico da AIE, preconizado pela Organização Mundial em Saúde Animal (OIE) e pelo MAPA. A IGDA detecta anticorpos precipitantes específicos entre 14 a 45 dias pós-infecção, mas apresenta incapacidade de detectar anticorpos específicos nos estágios iniciais da infecção, o que compromete a eficiência dos programas de controle e erradicação da doença (Reis *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1997). Outra limitação seria os resultados falsos negativos ou duvidosos, principalmente quando se trata de muares e asininos que normalmente possuem baixos níveis de viremia (Toma, 1980).

Uma alternativa ao IDGA é o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. O ELISA com a proteína recombinante gp90 (rgp90) possui algumas vantagens frente ao IDGA, entre elas

estão a rapidez e a sensibilidade diagnóstica e analítica. A rapidez se deve ao fato de permitir o teste de várias amostras num tempo variável de 4 e 5 horas e a sensibilidade analítica se deve à detecção dos anticorpos contra a proteína gp90, os primeiros a aparecerem durante a infecção (Martins, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido proposta como método de diagnóstico confirmatório para a AIE e outras retrovíroses. A especificidade do teste é geralmente satisfatória quando são usados iniciadores dirigidos a uma região conservada no genoma do VAIE (Kim e Casey, 1992; Langemeier *et al.*, 1996). A PCR para detecção de DNA proviral do VAIE é sensível e específica para identificar cavalos em estágio sub-clínico, como também cavalos recentemente infectados em processo de montagem de resposta imune (Toma, 1980; McConnell *et al.*, 1983; Issel *et al.*, 1988; Issel e Cook, 1993).

Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que quando se comparam os testes de IDGA e ELISA, existe uma maior concordância entre os resultados dos equinos do que resultados encontrados em muares e asininos demonstrando que os testes estão bem padronizados para os equinos, mas não para muares e asininos (Motta, 2007).

Como não existem vacinas eficazes, o controle da AIE nos equídeos se faz com a identificação, segregação ou eutanásia dos animais infectados. Somente em países como China e Cuba têm sido executados programas de vacinação utilizando amostras atenuadas do VAIE, que parece proteger os animais apenas contra amostras homólogas do vírus (Montelaro, 1993).

Em 1979, o Brasil criou a Comissão Nacional de Anemia Infecciosa Equina (CNAIE) visando o controle e combate da doença. Esta comissão definiu que o Programa Nacional de Combate a AIE deveria considerar a ocorrência diferenciada da doença nas diversas regiões, os variados sistemas de produção e de utilização dos equídeos, bem como definir e estabelecer as áreas indenes, para-endêmicas, epiendêmicas e endêmicas (Bevilacqua, 1993).

Em regiões como o Pantanal brasileiro, com alta prevalência da doença, a eutanásia dos animais positivos comprometeria significativamente ou mesmo inviabilizaria a pecuária extensiva, principal atividade econômica na região. Uma alternativa de controle da AIE, baseada na segregação dos animais positivos, tem sido adotada em alguns países como nos

EUA e proposta como estratégia prática de prevenção e controle para a região do Pantanal (Silva *et al.*, 2001).

3. Objetivos

3.1 Geral

- Comparar a dinâmica da infecção do vírus da anemia equina em equinos (*Equus caballus*) e muares (*Equus asinus* X *Equus caballus*), para verificar se há diferenças na infecção nestas duas espécies.

3.2 Específicos

- Comparar os sinais clínicos entre cavalos (*Equus caballus*) e muares (*Equus asinus* X *Equus caballus*) causado pela infecção do vírus da anemia infecciosa equina;
- Identificar o perfil sorológico de anticorpos anti-VAIE, por meio do IGDA e do ELISA rgp90, em cavalos (*Equus caballus*) e muares (*Equus asinus* X *Equus caballus*) infectados com o vírus da anemia infecciosa equina;
- Descrever as alterações hematológicas em cavalos (*Equus caballus*) e muares (*Equus asinus* X *Equus caballus*) infectados com o vírus da anemia infecciosa equina;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado em duas etapas que serão detalhadas no decorrer deste capítulo.

A primeira foi realizada em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, nas dependências do Hospital Veterinário Dom Bosco (HoVet), da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), no período compreendido entre 15 de junho a novembro de 2007, meses de ausência de vetores da ordem Diptera, o que minimiza o risco da infecção dos animais por vetores. Nesta etapa foram realizados os procedimentos relacionados à inoculação dos animais com o vírus da AIE e a obtenção, aliquotagem e armazenamento das amostras obtidas, bem como a posterior eutanásia dos animais.

Na sequência, realizou-se no Laboratório de Retrovíroses (Retrolab), da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), durante os meses de Junho e Julho de 2008, os testes sorológicos (IDGA e ELISA).

4.1. Infecção Experimental

4.1.1 Animais

Foram utilizados quatro equinos (*Equus caballus*) da raça pantaneira e quatro muares (*Equus caballus* x *Equus asinus*) meio sangue pantaneiro, com idade entre um ano e seis meses e dois anos e seis meses com peso médio superior a trezentos e cinquenta quilogramas e bom estado nutricional e sanitário. Esses animais eram provenientes de uma propriedade livre de AIE e apresentaram dois resultados negativos na imunodifusão em gel de agarose (IDGA), em exames subsequentes com intervalo de trinta dias. Todos os animais foram medicados com endectocida em gel a base de ivermectina e controlados para infestações com ectoparasitas com um produto comercial a base de cipermetrina a 15%, conforme a orientação do fabricante. O *status* sanitário e nutricional foi mantido até o final do experimento.

Os animais foram identificados como Potro 0 (P0), Potro 1 (P1), Potro 2 (P2), Potro 3 (P3), Potro 4 (P4), Muar 1 (M1), Muar 2 (M2), Muar 3 (M3) e Muar 4 (M4).

4.1.2 Obtenção do Inóculo Viral

O potro 0 (P0) foi inoculado, pela via intravenosa, com 100 mL de um *pool* de soro e plasma de animais, oriundos da região pantaneira do Mato Grosso do Sul, com dois resultados positivos na IDGA, em exames subsequentes com intervalo de 30 dias.

Diariamente, a temperatura foi aferida, entre as sete e oito da manhã, e o sangue colhido para que se pudesse, respectivamente, detectar o pico febril e monitorar a soroconversão através da IDGA.

Quando ocorreu o pico febril, principal indicativo da viremia, dois litros de sangue total foram colhidos e armazenados em quatro bolsas de coleta e transfusão de sangue para a produção dos inóculos para a infecção experimental dos demais animais. Após a obtenção do material, o animal foi eutanasiado (item 4.7).

4.1.3 Inoculação experimental dos animais

Após homogeneização manual das bolsas de coleta, por inversão, por cerca de três minutos a temperatura ambiente, o grupo experimental composto pelos animais P1, P2, P3, P4, M1, M2, M3 e M4 foi inoculado com 100 mL de sangue total, imediatamente depois da coleta de P0, por via intravenosa. Os equídeos permaneceram em observação contínua durante vinte e quatro horas, uma vez que poderiam manifestar reação anafilática em função do sangue inoculado.

Antes da inoculação, cada animal recebeu uma prévia antissepsia desinfecção do local de aplicação com álcool 70% e foram utilizadas seringas e agulhas individuais.

4.2 Isolamento e Condições dos Animais Durante o Experimento

Uma vez inoculados todos os animais permaneceram até o momento da eutanásia em um piquete isolado, distante a não menos de 500 metros de quaisquer outros equídeos, positivos ou não para AIE. O acesso a esses animais era apenas permitido às pessoas envolvidas no experimento.

A alimentação consistia em feno de alfafa, fornecido duas vezes ao dia, complementado com ração peletizada e sal mineral próprios para espécie, o qual foi oferecido em um cocho de

dimensões compatíveis a quantidade de animais presentes no experimento (Figura 1). Os animais possuíam acesso irrestrito a água que era ofertada em uma pilheta de dimensões compatíveis a quantidade de animais existentes a fim de garantir que nenhum dos animais sofresse restrições hídricas.



Figura 1. Animais se alimentando com feno.

4.3 Temperatura e Coleta das Amostras

De modo a maximizar o aproveitamento das informações almeçadas durante o experimento, foram estabelecidas duas verificações diárias dos animais, sendo estas realizadas às sete horas da manhã e às cinco horas da tarde de modo a reduzir ao máximo a interferência da temperatura ambiente e padronizar o horário de alimentação dos animais.

A coleta das amostras de sangue foi feita diariamente. Os animais eram conduzidos através de cabresto até um tronco de contenção, onde era feita a punção da VAIE jugular (Figura 2). Desta forma, foram coletados, com o uso de agulha individual e prévia antissepsia do local da punção com álcool 70%, cinco tubos do tipo *Vacumtainer*[®] com capacidade de 7 mL, sendo dois destinados à obtenção de soro sanguíneo (sem anti-coagulante) e os três restantes, tubos com anti-coagulante (EDTA), para a obtenção de plasma sanguíneo, sangue total e DNA.



Figura 2. Coleta de Amostras.

A temperatura dos animais foi aferida tanto no período da manhã quanto no da tarde e os dados foram utilizados para que fosse estabelecida uma média para o dia. Considerou-se como febre temperatura retal acima de 39,5 °C, onde febre baixa foi considerada 1 °C acima do valor normal, moderada de 1,7 a 2,2 °C e alta de 2,8 a 3,3 °C (Radostits et al 2002a). Como não existem valores de referências específicos para muares, utilizou os mesmos que para os equinos. Durante a aferição da temperatura, também foi realizada a inspeção clínica dos animais a fim de garantir que os mesmos se encontravam em bom estado clínico.

4.4 Processamento das Amostras

Uma vez coletadas, as amostras foram levadas ao laboratório para processamento e acondicionamento.

As amostras obtidas sem anti-coagulante foram centrifugadas durante dez minutos a 2000 g e findado este processo, o soro sanguíneo era aliquotado em microtubos de 2 mL e acondicionado em congelador a -20⁰C. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras destinadas a obtenção de plasma.

O DNA das amostras de sangue total foi extraído através do *Kit para Extração de DNA Genômico* (Bio Systems[®], Michigan-USA) seguindo as especificações do fabricante. Com as

amostras de sangue total também foram realizados os exames hematológicos, os quais serão descritos posteriormente. Além disso, uma fração das amostras de sangue total foi aliqüotada em microtubos de 2 mL e armazenadas em nitrogênio líquido para pesquisas posteriores.

4.5 Exames Hematológicos

Os exames hematológicos foram realizados no laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário Dom Bosco (HoVet).

A contagem das células, tanto da série vermelha quanto da série branca, foi feita em câmara de Neubauer, obedecendo aos protocolos estabelecidos para cada série celular. Para a contagem das plaquetas, optou-se pelo método de Rees-Ecker por ser este o método utilizado na rotina do laboratório. A avaliação do hematócrito se deu através da técnica do Micro-Hematócrito. Os valores de referência dos exames hematológicos adotados foram os preconizados por Radostits et al (2002b). Como não existem valores de referências específicos para muares, utilizou os mesmos que para os equinos.

4.6 Sorodiagnóstico para Anemia Infeciosa Equina

4.6.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

A IDGA foi realizada segundo o protocolo desenvolvido por Coggins e Norcross (1970), utilizando um kit comercial (*Idexx*[®], Maine-USA). O gel de ágar Noble a 1% em tampão borato (pH 8,7) foi preparado em microondas e distribuído em lâminas de microscopia (4,5 mL por lâmina). Após solidificação, o ágar foi perfurado com o auxílio de um furador contendo um orifício central e seis periféricos. As lâminas prontas foram armazenadas em câmaras úmidas com solução fenolada a 1% e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas antes de sua utilização. Os soros testados foram colocados nos orifícios periféricos alternando-se com os controles positivos (25µL por orifício). O antígeno foi colocado no orifício central na mesma quantidade dos soros testados e dos controles positivos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas e lidas com o auxílio de uma fonte de luz indireta sob um fundo escuro, para a verificação da presença de uma linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste e que apresenta identidade com a linha formada entre o antígeno e o soro controle positivo.

4.6.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) Indireto para a Pesquisa de Anticorpos contra a Proteína Recombinante gp 90

O ELISA indireto foi realizado segundo Reis (1997). A proteína recombinante rgp90 foi diluída em tampão carbonato (50 mM, pH 9,6) na concentração de 0,5 µg por cavidade e incubada (100 µL por poço) em placas de ELISA (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com 200 µL por poço de PBS-Tween (0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) e incubadas por uma hora com solução de bloqueio PBS-Tween (0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) acrescida de leite em pó desnatado a 5%. Nova lavagem foi realizada (3 vezes) e o soro incubado na diluição de 1:50 em PBS Tween leite (0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, 1% leite desnatado, pH 7,6) por uma hora a temperatura ambiente. Para a diluição do soro foram utilizadas placas próprias para diluição com 96 cavidades e transferidas com pipeta multicanal para a placa ELISA adsorvida previamente com a proteína rgp90. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-Tween (0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) por 3 vezes e incubadas com solução de conjugado na diluição de 1: 28.000 (coelho anti IgG equina-peroxidase SIGMA[®]) em PBS- Tween leite (0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, 1% leite desnatado, pH 7,6) (100 µl por poço) por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS Tween (0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) por 3 vezes, 100µl do substrato foi adicionado: solução de ortofenilenodiamino (OPD) (0,5 mg/mL), 20 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 10 mL de tampão fosfato citrato (pH 5,0) por 10 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 40 µL de solução de ácido sulfúrico a 0,5 N e a densidade ótica lida em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 492 nm

Os animais foram considerados negativos ou positivos de acordo com a seguinte fórmula:

$$R = \frac{FC \times ML}{LP}$$

onde:

R= Resultado

FC = Fator de Correção

ML= Média da Leitura

LP = Leitura do Controle Positivo

O ponto de corte utilizado foi o seguinte: densidade óptica (DO) menor ou igual a 0,222 resultado negativo; DO maior ou igual a 0,222 e DO menor que 0,264 resultado indeterminado e DO maior ou igual a 0,264 resultado positivo.

4.7 Eutanásia dos animais

Após alcançar os objetivos do experimento, todos os animais foram eutanasiados, uma vez que não há tratamento eficaz contra o vírus da AIE.

A eutanásia dos animais deu-se da seguinte forma: os animais foram submetidos a uma pré-sedação com acepromazina na dose de 0,1 mg por Kg de peso vivo, via intravenosa. Após a sedação, foi realizado um protocolo anestésico dissociativo, o qual consistiu na administração, intravenosa, de cloridrato de quetamina 1% na dose de 2,2 mg por Kg e xilazina 10% na dose de 1,1 mg por Kg, de acordo com guia para eutanásia da Associação Norte Americana de Medicina Veterinária (http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf). Uma vez alcançado o plano anestésico, este foi aprofundado até que fosse constatado o óbito. As carcaças foram incineradas.

4.8 Análise dos Dados Obtidos

Foi realizada uma análise descritiva dos dados obtidos, temperatura, número de plaquetas, dia da soroconversão por meio do IGDA e ELISA, por meio de gráficos utilizando para tanto o programa computacional Microsoft Office Excel[®].

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínica

Os quatro muares inoculados experimentalmente com o vírus da AIE não apresentaram, durante o experimento, os sinais clássicos associados à enfermidade como febre, anorexia, alopecia, caquexia, apatia, sudorese intensa e queda de rendimento. Dois equinos, dos quatro animais do grupo experimental, tiveram manifestações clínicas brandas quando comparados com os outros dois animais nos quais a intensidade das manifestações foi mais acentuada (Figura 3). As manifestações clínicas nos equinos, independente da intensidade dos sinais, ocorreram em média, no décimo dia pós-infecção desaparecendo aproximadamente no vigésimo quinto dia pós-infecção, não havendo nenhuma recidiva após a recuperação dos animais.



Figura 3. Comparativo do estado clínico dos animais (muar castanho e equino tordilho).

5.2 Hematologia e Temperatura

5.2.1 Equinos

Conforme demonstrado nos gráficos 1, 2, 3, 4 e 9, os animais apresentaram uma redução no número de plaquetas após o pico febril e no hematócrito, indicando uma leve anemia hemolítica. Não foi observada nenhuma alteração digna de nota em nenhum outro parâmetro avaliado no hemograma.

Potro 1

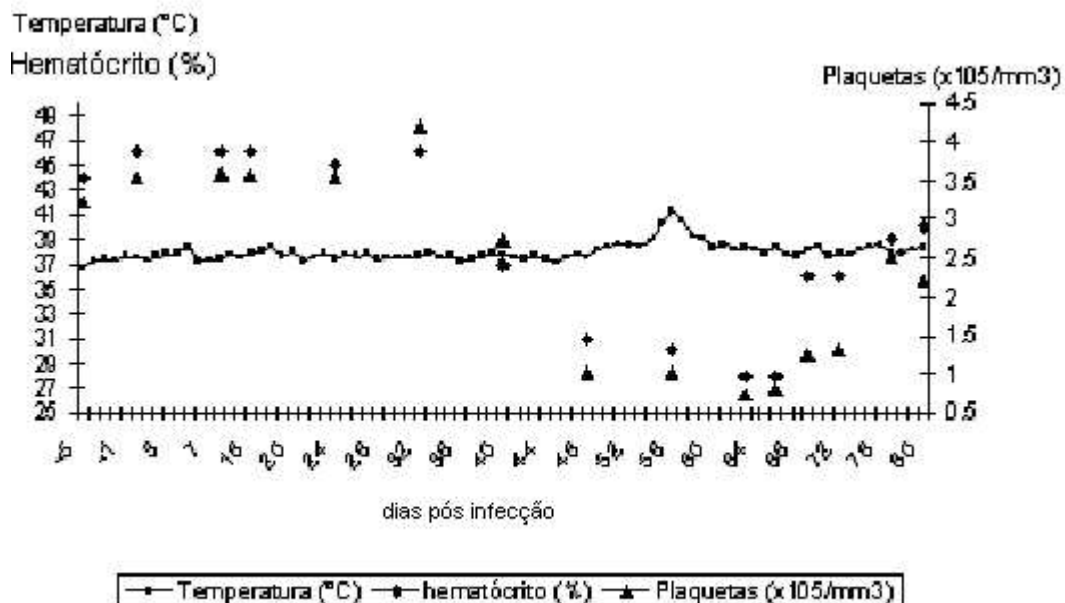


Gráfico 1. - Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 1, número de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós-infecção.

No gráfico 1 observamos que o potro 1, durante os 80 dias de observação, apresentou apenas um pico febril do 55º ao 59º dia PI (pós-infecção), com o ponto máximo de temperatura (41,3 °C) no 56º dia. As plaquetas começaram a cair a partir do quadragésimo dia ($2,73 \times 10^5/\text{mm}^3$), atingindo seu menor valor no 63º dia PI ($0,7 \times 10^5/\text{mm}^3$) sendo restabelecidos os parâmetros normais no 69º dia PI. O hematócrito apresentou o mesmo padrão que observado nas plaquetas. A queda nos valores plaquetários ocorreu no 40º dia pós-infecção e o menor valor

observado (28%) ocorreu no 63º dia e foi restabelecido no 69º dia PI e atingiu os parâmetros fisiológicos da espécie no 77º dia PI.

Potro 2

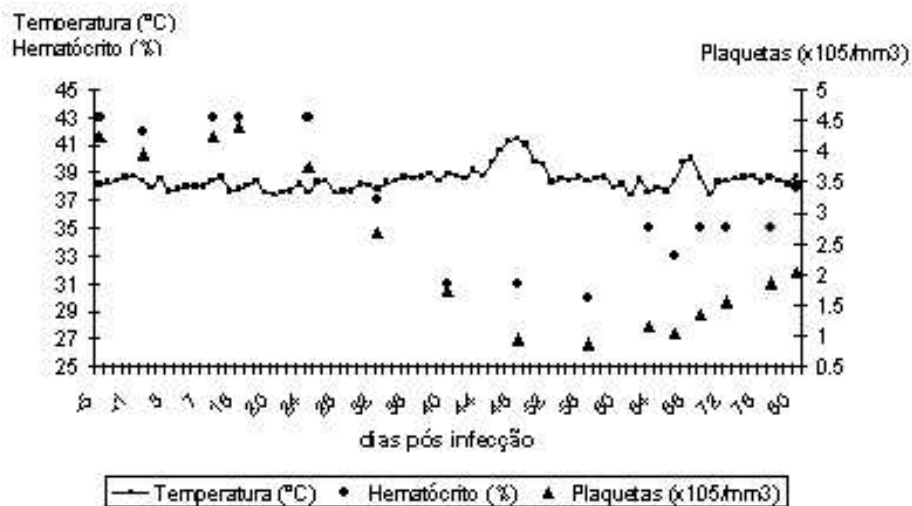


Gráfico 2. - Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 2, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós infecção.

No gráfico 2, observamos que o potro 2 apresentou febre entre o 45º dia ao 51º, com o ponto máximo de temperatura (41,5 °C) no dia 48. Depois de 15 dias do término do primeiro pico febril, o animal apresentou febre por dois dias, com temperatura média de 40,1 °C. As plaquetas começaram a declinar a partir do 40º dia PI ($1,7 \times 10^5/\text{mm}^3$), atingindo seu menor valor com 56 dias PI ($0,87 \times 10^5/\text{mm}^3$). No segundo pico febril, as plaquetas ficaram em torno de $1,3 \times 10^5/\text{mm}^3$ até o 69º dia PI quando demonstraram tendência de aumento. Observou-se também que os valores do hematócrito deste animal começaram a apresentar redução a partir do 32º dia PI e o menor valor observado para foi encontrado no 56º dia PI, sendo os parâmetros fisiológicos restabelecidos no 63º dia PI.

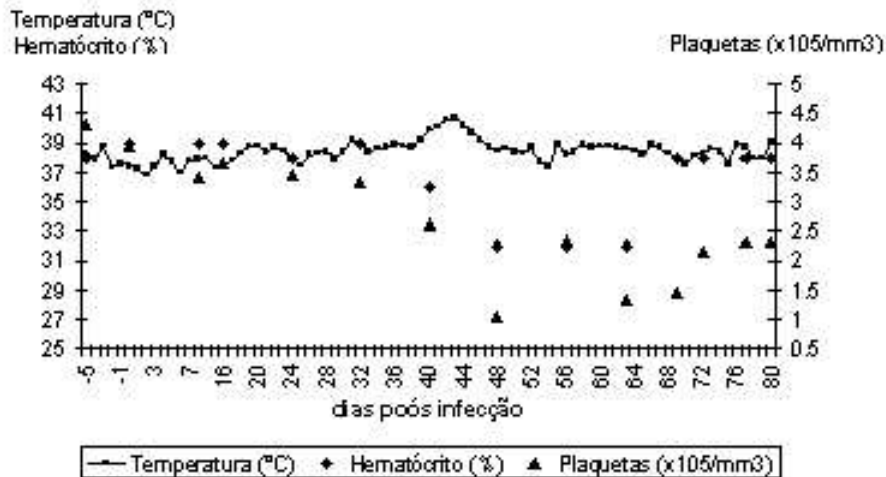
Potro 3

Gráfico 3. - Relação entre temperatura retal média (°C) do potro 3, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%) de acordo com os dias pós infecção.

No gráfico 3, observou-se no potro 3 um aumento da temperatura entre os dias 40º e 45º PI, com um pico de 40,7 °C no 43º dia. Durante todo o período de observação (80 dias), foi constatado somente um pico febril. Não foi observado queda das plaquetas abaixo do limite mínimo do padrão da espécie sendo a menor dosagem de $1,06 \times 10^5/\text{mm}^3$ no 48º dia. Após esta queda, notamos um aumento para $2,34 \times 10^5/\text{mm}^3$ no 56º dia e um novo decréscimo para $1,32 \times 10^5/\text{mm}^3$ no dia 63, a partir desta data houve uma tendência para a normalização do número de plaquetas. Os valores do hematócrito apresentaram redução em seus valores a partir do 40º dia PI, contudo, a exemplo das plaquetas, não foram observados valores abaixo do limite mínimo para a espécie. Após o 63º dia PI, os valores do hematócrito retornaram aos níveis observados antes da inoculação do vírus.

Potro 4

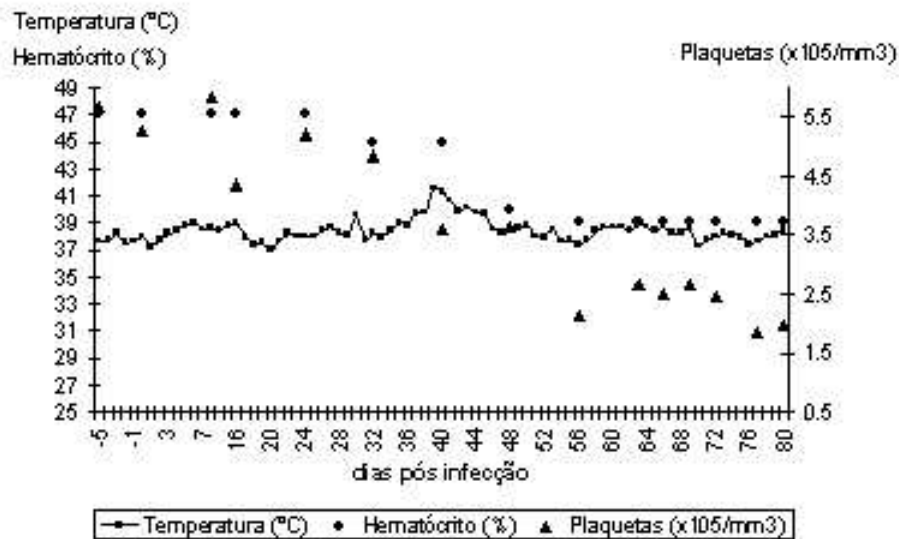


Gráfico 4. - Relação entre temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) média do potro 4, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós infecção.

O potro 4 apresentou dois picos febris (gráfico 4), um no 30^o dia PI, com temperatura em $39,6^{\circ}\text{C}$ e apenas um dia de duração. Já o segundo pico febril durou 9 dias e aconteceu, entre os dias 37 e 45 PI, com uma temperatura máxima de $41,5^{\circ}\text{C}$ no dia 39 pi. Não houve redução de plaquetas abaixo dos valores de referência, mas houve uma tendência de queda durante o período de observação, com o menor valor em $1,85 \times 10^5/\text{mm}^3$ no 70^o dia PI. O hematócrito deste animal se manteve dentro dos valores de referência da espécie, apresentando uma queda 48^o dia PI, sendo esta redução mantida até o 80^o dia PI.

5.2.2 Muares

Conforme demonstrado nos gráficos 5, 6, 7 e 8, apesar de haver ocorrido algumas variações nos parâmetros avaliados, de forma geral, os animais não apresentaram sinais que evidenciaram a infecção com o VAIE.

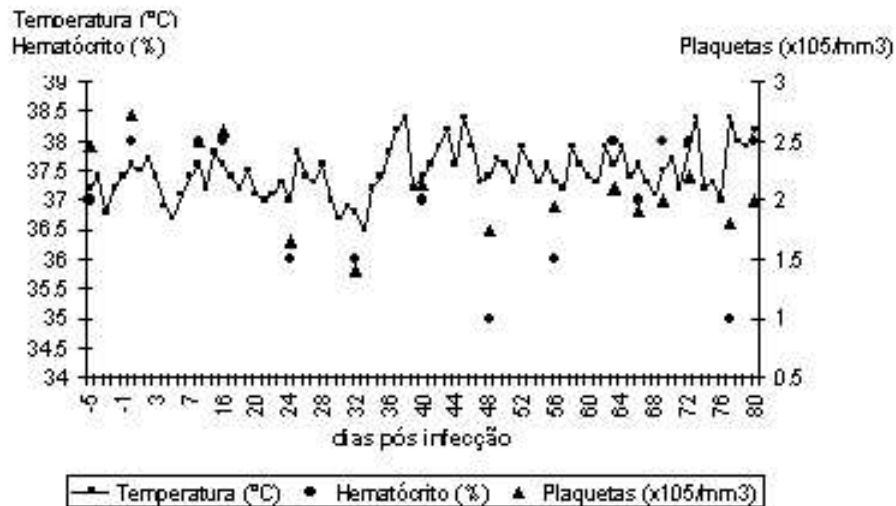
Muar 1

Gráfico 5. - Relação entre temperatura retal média ($^{\circ}\text{C}$) do muar 1, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós infecção.

O gráfico 5 demonstra que o muar não apresentou, durante o período de observação, aumento de temperatura retal que se caracterizasse como febre, sendo a temperatura média 38°C . Da mesma forma, não foi constatada redução nos níveis normais de plaquetas durante todo o período de observação (80 dias), valor médio pós-infecção de $2 \times 10^5/\text{mm}^3$, similar aos valores observados no período pré-infecção. Contudo, houve duas reduções acentuadas nos valores do hematócrito observadas nos dias 56° e 77° PI, em ambos os casos, os valores observados não ultrapassaram o limite mínimo estabelecido.

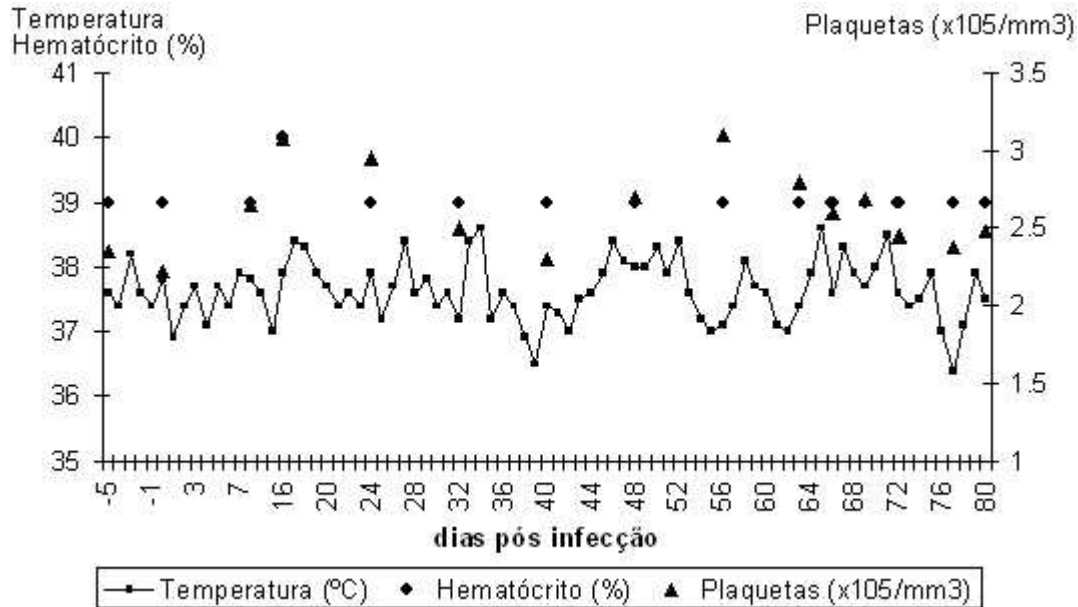
Muar 2

Gráfico 6. - Relação entre temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) média do muar 2, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós infecção.

O gráfico 6 evidencia que não houve alterações fora dos padrões normais de temperatura, números de plaquetas e hematócrito no muar 2 durante todo o experimento. A temperatura média pré e pós-infecção foram $37,7^{\circ}\text{C}$ e $38,1^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O número médio de plaquetas pós-infecção foi de $2,6 \times 10^5/\text{mm}^3$, semelhante ao observado no período pré-infecção. Não foram identificadas alterações no hematócrito deste muar, sendo os valores pré-infecção idênticos aos do período de pós-infecção.

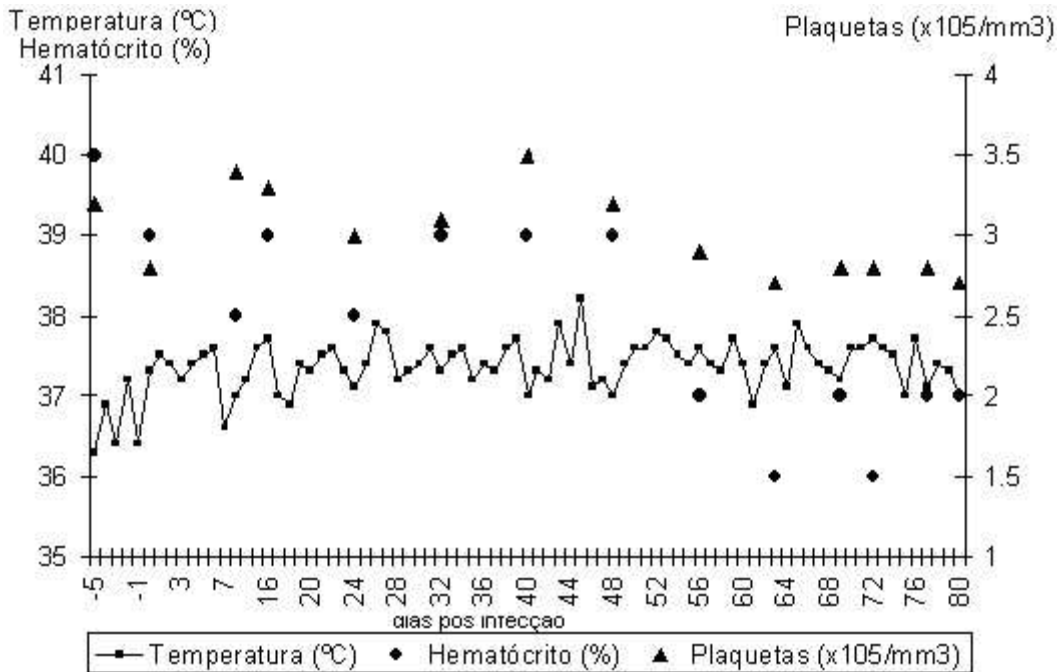
Muar 3

Gráfico 7. - Relação entre temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) média do muar 3, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós infecção.

O muar 3 (gráfico 7) não apresentou nenhuma alteração nos valores de temperatura e número de plaquetas. A temperatura média no período pós-infecção foi de $37,9^{\circ}\text{C}$ e o número de plaquetas de $3 \times 10^5/\text{mm}^3$, valores similares ao do período pré-infecção. Com relação ao hematócrito, em nenhuma das leituras realizadas observaram-se valores considerados inferiores aos limites fisiológicos. Contudo, pôde se identificar uma redução dos valores a partir do 48º dia PI, com os valores mínimos (36 %) sendo observados nos dias 63 e 72 PI.

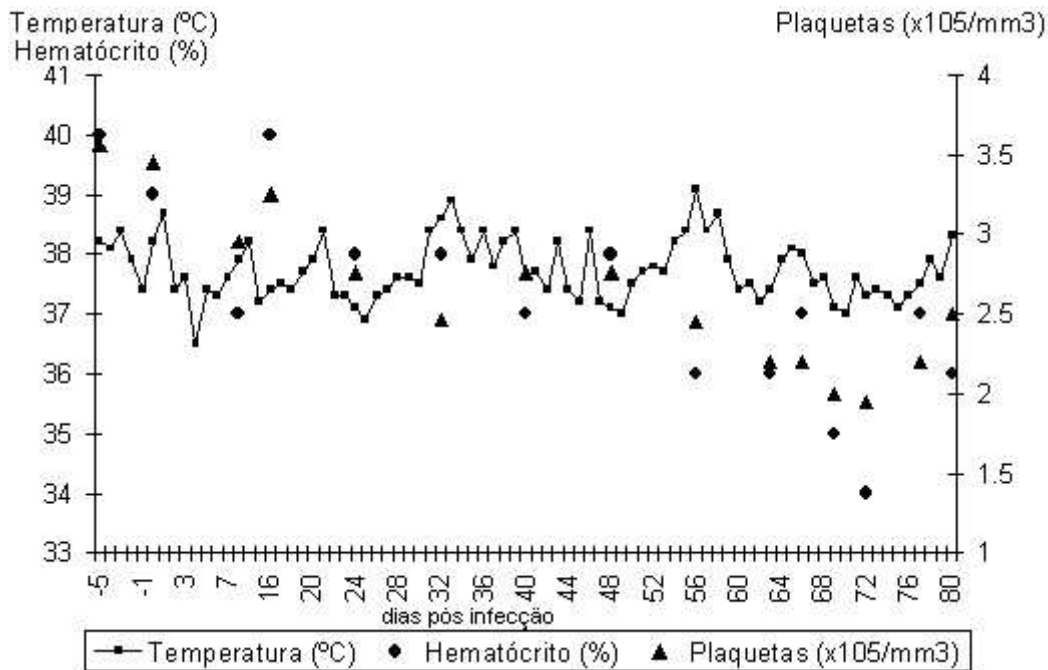
Muar 4

Gráfico 8. - Relação entre temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) média do muar 4, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito (%), de acordo com os dias pós infecção com o vírus da AIE.

O muar 4 apresentou no dia 33 PI um aumento de temperatura para $38,9^{\circ}\text{C}$ e um pico no dia 56 PI com $39,1^{\circ}\text{C}$ com duração de apenas um dia cada (Gráfico 8). Apesar de em nenhum momento ter sido constatada uma queda do número de plaquetas abaixo dos valores de referência, notou-se que o número médio durante o período da pré-infecção era de $3,5 \times 10^5/\text{mm}^3$, sendo de $2,8 \times 10^5/\text{mm}^3$ no período antecedente ao pico febril (dia 56 PI) e $2 \times 10^5/\text{mm}^3$ após o pico febril, com uma tendência de aumento a partir do dia 75 PI. Foi identificada uma redução nos valores do hematócrito a partir do pico febril, o valor mínimo observado (34%) ocorreu no 72º dia PI. Da mesma forma, que os demais muares, em nenhum momento, os valores do hematócrito apresentaram queda abaixo dos valores de referência.

5.2.3 Equinos versus Muares

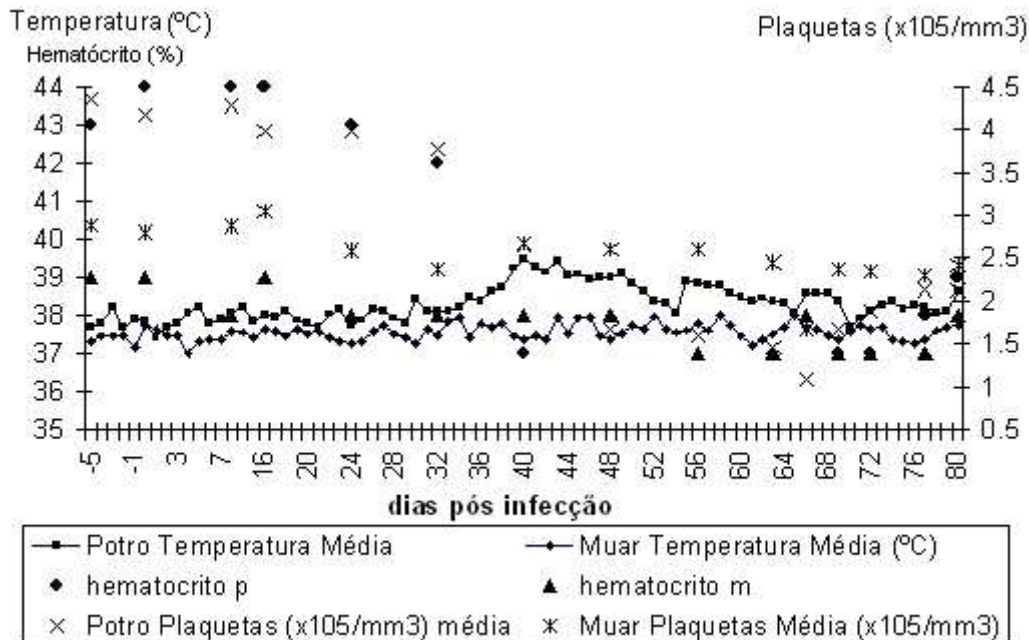


Gráfico 9 - Relação entre temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) média, números de plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$) e hematócrito dos equinos (potros) e muares, de acordo com os dias pós infecção com o vírus da AIE.

O Gráfico 9 exibe os valores médios de temperatura, número de plaquetas e hematócrito dos cavalos e muares utilizados no experimento. Observa-se que os equinos apresentaram picos febris em torno do 40º dia PI, como também uma queda acentuada no número de plaquetas e nos valores do hematócrito, enquanto que os muares, em média, não apresentaram alterações nos parâmetros normais de temperatura, plaquetas e hematócrito.

5.3 Sorologia

Os resultados ilustrados no gráfico 10 evidenciam o momento em que os testes sorológicos (IDGA e ELISA) detectaram a soro-conversão de cada animal. Observa-se, que a IDGA apresentou maior variação em relação à data da soro-conversão ao comparar com o ELISA. O aparecimento de sinal do IDGA ocorreu após o ELISA em ambos os animais. O sinal foi identificado em uma média de 21 e 11,5 dias após o ELISA nos equinos e muares,

respectivamente. Isto evidencia uma maior precocidade na demonstração de animais soropositivos pelo ELISA.

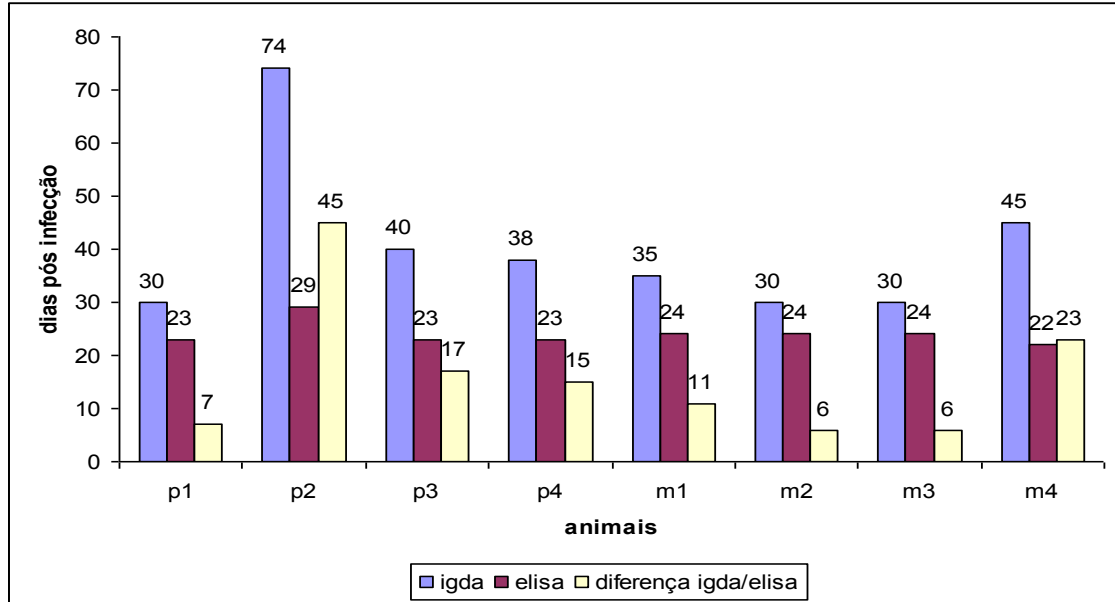


Gráfico 10. - Dias pós-infecção em que os testes resultam em positividade dos animais. (p1 potro 1, p2 potro 2, p3 potro 3, p4 potro 4, m1 muar 1, m2 muar 2, m3 muar 3, m4 muar 4).

6. DISCUSSÃO

Segundo Motta (2007), estudos realizados até hoje mostram que a principal forma clínica da AIE encontrada a campo é a inaparente, sendo que aproximadamente 80% dos animais infectados apresentam esta forma da doença. Tal fato ocorre porque, em geral, as manifestações clínicas observadas em animais com AIE são mais evidentes durante o primeiro episódio febril, o qual ocorre normalmente entre o sétimo e o trigésimo dia pós-infecção (PI).

O primeiro episódio febril dura, nos casos em que este se manifesta, de 3 a 5 dias, podendo prolongar-se em alguns animais (Issel e Coggins, 1979). Sabe-se que as síndromes febris manifestadas pelos animais infectados pelo VAIE, bem como toda a sintomatologia clínica está associada aos picos de replicação viral, sendo que os animais geralmente descrevem alterações clínicas e hematológicas associadas aos períodos de viremia, contudo, a intensidade dos sinais clínicos dependerá de alguns fatores tais como: amostra e virulência do vírus envolvido, a dose infectante e a resposta imune do animal infectado (Sellon *et al.*, 1994).

Animais infectados com VAIE podem apresentar durante a fase aguda da doença, episódios febris de intensidade variável (com temperatura acima de 39°C), trombocitopenia, anemia hemolítica (acentuada ou não), prostração, anorexia, perda de peso, edema ventral, alopecia, epistaxe e em algumas vezes alterações neurológicas (Kono *et al.*, 1973; Issel e Coggins, 1979; Sellon *et al.*, 1996).

A ocorrência de sintomatologia mais severa da AIE parece estar associada com episódios febris com picos de temperatura, acima dos 40,5°C, os quais são associados à replicação viral mais intensa e por consequência uma maior carga de RNA viral no plasma (Leroux *et al.*, 1997).

A grande maioria dos animais infectados com o VAIE se recupera após um período variável de dias e permanecem clinicamente saudáveis durante dias ou semanas, até apresentarem episódios recorrentes de febre, trombocitopenia e prostração (Issel e Coggins, 1979). Nota-se que a frequência e a intensidade dos episódios febris, bem como dos demais sintomas

clínicos diminuem com o passar do tempo, sendo que estes são observados predominantemente apenas durante os 12 meses PI. Após este período, a maioria dos animais deixa de apresentar sinais clínicos da infecção e entram na fase assintomática da doença, tornando-se portadores inaparentes do vírus e se tornando uma importante fonte de infecção dentro dos rebanhos (Kono, 1973).

Pela 1ª vez, equinos (*Equus caballus*) da raça pantaneira e híbridos (*Equus caballus* x *Equus asinus*) obtidos a partir de éguas da raça pantaneira foram submetidos à infecção experimental com o VAIE e tiveram suas respostas frente à infecção avaliadas.

Apesar dos poucos dados referentes à infecção de muares com o VAIE disponíveis na literatura, Motta (2007) sugere que algumas espécies de equídeos e raças de equinos são mais resistentes a certas infecções do que outras. Além disso, é amplamente relatada por criadores e por pessoas as quais trabalham diretamente com os animais, uma maior resistência do cavalo pantaneiro e dos muares em manifestar os sinais clínicos da AIE e devido a isso, muitos proprietários rurais no Brasil Central têm optado pela criação desta raça e de seus híbridos, a fim de minimizar o impacto da doença em seus criatórios.

Em concordância com diversos estudos (Kono *et al.*, 1973; Issel e Coggins, 1979; Sellon *et al.*, 1996), no presente experimento pode-se observar que todos os equinos apresentaram sintomatologia clínica e alterações hematológicas inerentes à infecção.

O potro 1 apresentou apenas um episódio febril durante o período do experimento, o qual perdurou durante quatro dias (55º ao 59º dia PI) e teve seu pico no 56º dia PI (41,3°C). Da mesma forma, o potro 3 também só apresentou um episódio febril durante todo o experimento, do 40º ao 45º dia PI, com pico de temperatura alcançando os 40,7°C no 43º dia PI.

Os potros 2 e 4 apresentaram dois picos febris durante o período de observação, porém foi possível notar algumas diferenças referentes aos padrões como estes se manifestaram. O potro 2 manifestou o primeiro período febril após 44 dias de infecção, tendo este primeiro episódio durado 6 dias e atingindo o pico febril de 41,5°C (febre alta) no 48º dia PI. Após o 51º dia PI, a febre cessou e a temperatura do animal se manteve constante nos valores fisiológicos durante a quinzena subsequente. Um novo episódio febril teve início então no 66º dia PI,

sendo este mais curto que o anterior, durando apenas dois dias e tendo um pico febril com uma temperatura inferior à observada durante o primeiro pico febril (40,1°C).

Já os episódios febris observados no potro 4 apresentaram um padrão totalmente diferente dos demais animais. A manifestação deste foi a mais precoce dentre os equinos, sendo observada no 30º dia PI e com uma temperatura mais baixa quando comparada aos demais equinos (39,6°C). Contudo, apenas sete dias após esse episódio febril, o animal manifestou uma nova síndrome febril que perdurou oito dias, atingindo o pico febril no 39º dia PI a uma temperatura de 41,5°C.

Segundo alguns autores (Kono *et al.*, 1973; Issel e Coggins, 1979; Sellon *et al.*, 1996), após a infecção, o 1º pico febril é observado num intervalo de 7 a 30 dias e, de acordo com estes, todos os equinos do experimento teriam apresentado o 1º pico febril tardio, uma vez que a média do 1º pico febril foi de 42 dias PI.

Contudo, Leroux *et al.* (1997) relataram que o período caracterizado como a fase aguda da enfermidade e onde pode ser observado o 1º pico febril, bem como as manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo VAIE compreende um intervalo de tempo de aproximadamente 100 dias. Desta forma, o resultado obtido pode sugerir uma maior resistência da raça pantaneira em manifestar os sintomas da doença ou uma menor virulência da amostra viral utilizada, mas esta hipótese é menos provável pelo fato dos equinos apresentarem sinais clássicos de anemia infecciosa equino, com os animais atingindo febre alta.

Issel e Coggins (1979), afirmam que a fase aguda da infecção com o VAIE se finda após o primeiro episódio febril, com a recuperação dos animais e a interrupção das manifestações clínicas e, tem início então a fase crônica da doença, com episódios febris recorrentes e de intensidade variável. Contudo, observamos nos casos dos potros 2 e 4, que ambos apresentaram episódios febris subseqüentes e em um intervalo de tempo muito curto. Poder-se-ia dizer que o 2º episódio febril já seria associado à fase crônica da infecção, porém, os sintomas clínicos que também fazem parte da caracterização da fase aguda da doença só regrediram após a 2ª síndrome febril.

Todos os equinos, com exceção do potro 4 durante o 1º episódio febril, apresentaram febre alta, acima dos 40°C, sendo que na maioria das espécies, quando a temperatura retal atinge

valores acima de 41 °C, há um desconforto generalizado evidente, sendo que a febre maior que 41,5 °C pode levar o animal ao coma e a morte (Radostits et al 2002b). Somado a isso, todos os equinos do experimento apresentaram os sintomas clínicos clássicos associados à infecção e previamente descritos no início deste capítulo.

Desta forma, os potros 1 e 2 foram os animais que apresentaram os sinais clínicos mais severos observados durante o experimento. No potro 1, sinais clínicos como anorexia, prostração e progressiva perda de peso começaram a ser observados a partir do 46° dia PI. Associados a estes sintomas, após o 56° dia PI, foram observados um leve edema ventral e uma progressiva alopecia. Os sinais começaram a regredir por volta do 70° dia PI, estando o animal sem sinais clínicos aparentes da infecção ao final do experimento. Também foi observada uma queda na taxa de plaquetas e redução no hematócrito a partir do 40° dia, onde ambos atingiram seus valores mínimos, $0,7 \cdot 10^5/\text{mm}^3$ e 28% respectivamente, no 63° dia PI. Os valores plaquetários e eritrocitários começaram a manifestar tendência de normalização a partir do 69° dia PI, tendo atingido os valores fisiológicos normais no 77° dia PI.

O potro 2 foi o animal que manifestou sinais clínicos mais severos da doença. Os sintomas tiveram início por volta do 35° dia PI e progrediram até o 59° dia PI, deixando o animal bastante debilitado. Foi observado neste animal além de anorexia e rápida perda de peso, um grande edema ventral, prostração, epistaxe e mucosas oculares e bucais hipocoradas. Após o 59° dia PI, não houve progressão dos sintomas, havendo apenas manutenção dos sinais observados. O animal manteve-se gravemente debilitado até o 73° dia PI, quando este começou a mostrar sinais de recuperação. A contagem plaquetaria e o hematócrito acompanharam em média os sinais clínicos, precedendo-os e manifestaram tendência de normalização após o 60° dia PI.

Os sinais clínicos e hematológicos dos potros 3 e 4 foram bastante similares. Ambos foram os equinos menos afetados clinicamente durante o experimento, manifestando apenas uma leve prostração e anorexia durante os períodos de pico febril. Apesar da contagem plaquetaria e hematócrito de ambos os animais apresentarem períodos com tendência de queda, em ambos não houve uma redução destes valores abaixo dos níveis fisiológicos.

Os resultados observados nos equinos no período de pós-infecção foram tardios, mas ocorreram conforme o esperado para a espécie. Segundo diversos autores (Kono *et al.*, 1973; Issel e Coggins, 1979; Sellon *et al.*, 1996; Leroux *et al.*, 1997), a intensidade da manifestação dos sintomas clínicos e alterações hematológicas são variáveis entre os equinos, fato que é atribuído à resposta imune desenvolvida por cada animal e que influencia diretamente a replicação viral.

O acompanhamento sorológico demonstrou que a IDGA apresentou uma maior variação em relação à data da 1ª detecção da soroconversão dos animais quando comparado com o ELISA. Em média, a diferença entre a IDGA e o ELISA na data da 1ª detecção nos equinos foi de 21 dias e nos muares de 11,5 dias, evidenciando a maior precocidade na detecção de animais soropositivos do ELISA quando comparado ao IDGA. Essa precocidade pode estar ligada ao fato que a gp90 é um potente antígeno, estimulando níveis de anticorpos mais altos que a p26, antígeno utilizado na IDGA (Issel; Cook 1993). E porque anticorpos anti gp90 são detectados antes dos anticorpos anti p26 e também pelo fato do ELISA ter uma sensibilidade analítica maior que o IDGA (Reis, 1997; Martins, 2004).

Também é interessante notar que o ELISA mostrou-se mais homogêneo que o IGDA, indicando uma soroconversão semelhante entre todos os animais, equinos e muares, já o IGDA apresentou uma maior diversidade no dia da soroconversão.

Estudos com infecção experimental em equinos relatam uma soroconversão no IDGA em torno de 15 a 25 dias PI (Pearson *et al.*, 1971; Coggins *et al.*, 1972; Issel e Cook, 1993), diferentemente o que foi observado no presente trabalho que teve uma média de soroconversão de 45 dias PI nos equinos, com um dos animais soroconvertendo em 74 dias. Já os muares apresentaram um tempo médio de 24 dias PI no ELISA e 35 dias PI na IDGA para a soroconversão. Mas diferentemente dos equinos, não observou variações entre os muares em relação à soroconversão.

Em relação aos muares não foi possível observar o mesmo padrão de sinais apresentados pelos equinos. Diferentemente dos nossos resultados, Spyrou *et al.* (2003) afirmaram que, em muares, a infecção com o VAIE produz sinais similares aos observados em cavalos, sugerindo que a amostra de VAIE circulante na Grécia seria também virulento para os

muares. Os muares experimentalmente infectados com o VAIE oriundo de um muar naturalmente infectado que veio a óbito apresentaram trombocitopenia durante a 3ª semana PI, sendo que um muar experimentalmente infectado morreu com apenas 25 dias PI, com sinais clássicos de anemia infecciosa equina. Além disso, um dos muares apresentou anorexia e prostração enquanto que o outro apresentou um pico febril, embora baixo, de 39,2°C.

Spyrou *et al.* (2003) não observaram soroconversão, diferente dos animais naturalmente infectados, dos muares experimentalmente infectados até a morte ou eutanásia, mas os autores acompanharam os animais até 25 dias PI. No nosso trabalho observamos a soroconversão de todos os muares em torno de 35 dias PI por meio do IGDA e com uma média 23 dias PI. Esta diferença pode ser ao fato dos autores não terem seguido os animais por mais tempo.

Cook *et al.* (2001) observaram que asininos infectados com VAIE soroconverteram aos 42 dias PI, esta diferença entre os resultados observados por nós pode ser ao fato de utilizarmos um ELISA que detecta anticorpos anti gp90, que é uns dos primeiros anticorpos a aparecerem durante a infecção pelo VAIE. Nosso resultado, em relação a soroconversão apresenta-se de forma semelhante ao observado nos cavalos, tanto em nosso experimento, com média em torno de 23 dias PI, com por vários autores que relatam uma soroconversão em cavalos em torno de 16 dias PI ((Langemeier *et al.*, 1996; Sellon *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 2001).

Diferentemente ao que Spyrou *et al.* (2003) afirmam que o diagnóstico sorológico poderia ser um problema na identificação de animais assintomáticos devido a um atraso na produção de anticorpos anti-VAIE detectáveis, isso não foi observado por nós, onde anticorpos foram detectáveis conforme o padrão observado nos cavalos.

Durante o presente experimento, nenhuma alteração clínica ou hematológica foi observada nos 4 muares, com exceção de um pico febril com temperatura de 39,1°C, considerada baixa, observado no muar 4 ao longo do 56º dia Spyrou *et al.* (2003) observou queda nos valores de plaquetas e febre numa mula naturalmente infectada que veio a óbito, mas não relataram nenhuma alteração nos valores bioquímico de uma segunda mula naturalmente infectado.

Nas mulas experimentalmente infectadas, Spyrou *et al.* (2003) observaram uma primeira queda nos valores de plaquetas, mas dentro dos valores normais, com seguido aumento e uma nova queda mais acentuada, passando abaixo dos valores normais. Este mesmo padrão foi observado por nós, onde os muarees 1, 3 e 4 apresentaram quedas nos valores de plaquetas e hematócritos, mas sem passar do limite inferior de referência.

Cook *et al.* (2001) afirmam que apesar de susceptíveis à infecção pelo VAIE, os asininos não desenvolvem as manifestações clínicas da doença e há uma menor quantidade de vírus circulante no plasma destes animais quando comparados à cavalos infectados com a mesma amostra viral. Uma hipótese para explicar isto é que as amostras virais do VAIE adaptada a equinos teria menos patogênica a asininos. Além disso, estudos mostram que a infecção por lentivírus de espécies próximas pode gerar manifestações clínicas distintas, como neste caso entre equinos e asininos (Jolly *et al.*, 1996; Rey-Cuille *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2001).

7. CONCLUSÕES

1. Os muares são mais resistentes a manifestações clínicas causadas pelo VAIE adaptado a equinos;
2. Os cavalos da raça pantaneira apresentam a sintomatologia clássica associada ao VAIE;
3. O ELISA com a gp90 recombinante e com conjugado anti-equino pode ser usado com a mesma eficiência na detecção de anticorpos anti-VAIE em muares
4. O ELISA é mais eficiente na detecção de anticorpos anti-VAIE, tanto em muares como em equinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, V. M. A. **Prevalência da Anemia Infecciosa Equina, no rebanho de animais de serviço, em Minas Gerais.** 2005. (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte.
- BATISTA JÚNIOR, J.; FONSECA, V. Anemia infecciosa equina. **Arq Esc. Vet**, v. 23, p. 281-290, 1971.
- BEVILACQUA, P. D. Ecossistemas para anemia infecciosa equina em Minas gerais de 1973 a 1991., 1993.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Boletim de Defesa Sanitária Animal., 1974. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/boletins> >. Acesso em: 14 set. 2008.
- CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 83-88, 1985. ISSN 1537-6591.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996. ISSN 0893-8512.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N. Immuno-diffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Veterinarian**, v. 60, p. 330-335, 1970. ISSN 0010-8901.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N.; NUSBAUM, S. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. **American journal of veterinary research**, v. 33, n. 1, p. 11, 1972. ISSN 0002-9645.
- COOK, R.; ISSEL, C.; MONTELARO, R. Equine infectious anemia. **Virus Infections of Equines. Elsevier, Amsterdam**, p. 297-323, 1996.
- COOK, S. J. *et al.* Differential responses of Equus caballus and Equus asinus to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. . **Veterinary Microbiology**, v. 79, p. 93 – 109, 2001.
- CRAWFORD, T. B. *et al.* Equine infectious anemia: virion characteristics, virus-cell interaction and host responses. **Persistent viruses**, v. 11, p. 155-162, 1978.
- DOS REIS, J. K. P. *et al.* Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. **Tropical animal health and production**, v. 26, n. 2, p. 65-68, 1994. ISSN 0049-4747.
- DUPONT, O. *et al.* Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 11. & CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1968. p.160-1.
- HAMMER, M. Controlling equine infectious anaemia. . **Animal Research Development**, v. 50, p. p. 44-57, 1999.

HAMMOND, S. A.; HOROHOV, D.; MONTELARO, R. C. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 71, n. 3, p. 197-214, 1999. ISSN 0165-2427.

HAMMOND, S. A. *et al.* Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. **Journal of virology**, v. 74, n. 13, p. 5968-5981, 2000.

HARROLD, S. M. *et al.* Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3112-3121, 2000. ISSN 0022-538X.

HAWKINS, J. A. *et al.* Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana. **American journal of veterinary research**, v. 34, n. 12, p. 1583, 1973. ISSN 0002-9645.

HOWE, L. *et al.* Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. **Journal of virology**, v. 76, n. 21, p. 10588-10597, 2002. ISSN 0022-538X.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Agricultura e Pecuária., Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/> >. Acesso em: maio 2008.

ISSEL, C. *et al.* Equine infectious anemia: prospects for control. **Developments in biological standardization**, v. 72, p. 49-57, 1990. ISSN 0301-5149.

ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of the American Veterinary Medical Association (USA)**, 1979.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **J. Vet Diagn Invest**, p. 137-141, 1993.

ISSEL, C. J.; FOIL, L. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 3, p. 293-297, 1984. ISSN 0003-1488.

ISSEL, C. J. *et al.* A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. **Veterinary microbiology**, v. 17, n. 3, p. 251-286, 1988. ISSN 0378-1135.

JOLLY, C. J. *et al.* SIVagm incidence over two decades in a natural population of Ethiopian grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops aethiops*). . **J. Med. Primatol.**, v. 25, p. 78-83, 1996.

- KIM, C. H.; CASEY, J. W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. **Journal of virology**, v. 66, n. 6, p. 3879-3882, 1992. ISSN 0022-538X.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. **Archives of virology**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 1973. ISSN 0304-8608.
- LANGEMEIER, J. L. *et al.* Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. . **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1481-1487, 1996.
- LEROUX, C.; CADORÉ, J.-L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary research**, v. 35, n. 4, p. 485-512, 2004.
- LEROUX, C. *et al.* Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. **Journal of virology**, v. 75, n. 10, p. 4570-4583, 2001.
- LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 9627-9639, 1997.
- MARTARANO, L. *et al.* Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein Rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. **Journal of virology**, v. 68, n. 5, p. 3102-3111, 1994.
- MARTINS, M. F. **Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp90) no diagnóstico da anemia infecciosa equina.** 2004. 59 (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária,, Universidade federal de Minas Gerais., Belo Horizonte.
- MAURY, W.; OAKS, J. L.; BRADLEY, S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. **Journal of virology**, v. 72, n. 11, p. 9291-9297, 1998. ISSN 0022-538X.
- MCCONNELL, S.; KATADA, M.; DARNYON, S. M. Occult equine infectious anemia in an immunosuppressed serologically negative mare. **Equine Pract**, v. 5, p. 32-39, 1983.
- MCGUIRE, T.; CRAWFORD, T.; HENSON, J. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. **The American journal of pathology**, v. 62, n. 2, p. 283, 1971.
- MELLORS, J. W. *et al.* Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-**, p. 1167-1169, 1996. ISSN 0036-8075.
- MONTELARO, R. C., BALL, J.M., RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. . In: (Ed.). **Retroviridae**. New York: Plenum Press, v.2, 1993.

MOTTA, P. M. C. Comparação da IDGA, ELISA e nested PCR no diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, Asininos e Muare. 2007.

NAKAJIMA, H.; NORCROSS, N. L.; COGGINS, L. Demonstration of antigenic identity between purified equine infectious anemia virus and an antigen extracted from infected horse spleen. **Infection and immunity**, v. 6, n. 3, p. 416-417, 1972. ISSN 0019-9567.

OAKS, J. L. *et al.* Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7263-7269, 1998. ISSN 0022-538X.

PEARSON, J. E.; BECVAR, C. S.; MOTT, L. O. Evaluation of the immunodiffusions test for the diagnosis of equine infectious anemia. Proc US Animal Health Association **Proc US Animal Health Association** v. 74, p. 259-267, 1971.

RAVAZZOLO, A.; COSTA, U. Retroviridae. **Virologia Veterinária**, v. 31, p. 819-823, 2007.

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

REY-CUILLE, M. A. *et al.* Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. **J. Virol.**, v. 72, p. 3872-3886, 1998.

SELLON, D. C. *et al.* Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. **Journal of virology**, v. 70, n. 1, p. 590-594, 1996. ISSN 0022-538X.

SENTSUI, H. *et al.* Haemagglutination by bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 59, n. 1, p. 83-89, 1982. ISSN 1465-2099.

SILVA, R. A. M. S.; DE ABREU, U. G.; BARROS, A. T. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. **Embrapa Pantanal - Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001.

SPYROU, M. *et al.* Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenecity studies. **Veterinary microbiology**, v. 95, n. 1-2, p. 49-59, 2003.

STEPHENS, R.; DERSE, D.; RICE, N. Cloning and characterization of cDNAs encoding equine infectious anemia virus tat and putative Rev proteins. **Journal of virology**, v. 64, n. 8, p. 3716-3725, 1990.

TOMA, B. Persistent negative serological response in a mare infected with equine infectious anaemia virus. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v. 156, n. 1, p. 55-63, 1980. ISSN 0034-1843.

VAN REGENMORTEL, M. *et al.* Virus nomenclature: consensus versus chaos. **Archives of virology**, v. 145, n. 10, p. 2227-2232, 2000. ISSN 0304-8608.

WILLIAMS, D. *et al.* Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. **American journal of veterinary research**, v. 42, n. 9, p. 1469-1473, 1981. ISSN 0002-9645.