

Pedro Moreira Couto Motta

COMPARAÇÃO DA IDGA, ELISA E “NESTED” PCR NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUINOS, ASININOS E MUARES.

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

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007

M917 Motta, Pedro Moreira Couto, 1980-

Comparação da IDGA ELISA e “NESTED” PCR no diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muare/Pedro Moreira Couto Motta.-2007.

29 p.: il.

Orientador : Rômulo Cerqueira Leite

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Asinino – Doenças – Teses. 3. Muar – Doenças – Teses. 4. Anemia infecciosa equina – Teses. 5. Teste imunoenzimático – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.108 969 2

Assinaturas

Ao meu pai, Pedro Moacyr Pinto
Coelho Motta, por ter me
incentivado chegar até aqui e
principalmente pelo exemplo tanto
pessoal quanto profissional,
Dedico.

*Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht.

AGRADECIMENTOS

A minha família que foi o grande estímulo desta minha jornada.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite, meu orientador, pelo aprendizado, profissionalismo, incentivo e pela sincera amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Jenner Karlínsson Pimenta dos Reis, pela preciosa colaboração nas horas necessárias.

Aos professores Marcos Heinemann, Andrey Lage e Francisco Lobato por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao professor João Paulo Haddad pelas análises estatísticas.

A Nádia pela formatação da dissertação.

Aos colegas e amigos Cristiano Barros de Melo, André B. Maciel, Valéria Maria A. Almeida, Marilda Ferreira Martins e Anapolino Macedo de Oliveira pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da UFMG (RetroLab): Antônio, Daniela, Daniel, Eduardo, Elizangela, Fernanda, Gissandra, Juliano, Jerônimo, Marcelo e Christian, pelas ajudas nas análises laboratoriais e constante disponibilidade.

Aos amigos da veterinária: Luciano, Antônio Claret, Rafahel e Bruno pela ajuda e companheirismo. Aos amigos de infância, até hoje presentes na minha vida, pela certeza de sempre poder contar com a amizade, apoio e estímulo.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) pela ajuda na elaboração do trabalho e por ter me cedido tempo para execução do mesmo.

Ao LANAGRO-MG, na pessoa do seu diretor Dr. Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, por ter dado total apoio laboratorial e por ter me cedido tempo no período final de execução deste trabalho.

Ao colegiado dos cursos de Pós Graduação da Escola de Veterinária, pela atenção e colaboração.

A FAPEMIG, FEP-MVZ e CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Histórico da AIE.....	10
2.2. Infecção e fases da doença.....	11
2.3. Transmissão.....	11
2.4. Estrutura viral, replicação e resposta imunológica.....	12
2.5. Eqüinos X Muares e Asininos.....	13
2.6. Diagnóstico e controle.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Local de realização.....	15
3.2. Coleta de amostras.....	15
3.3. Imunodifusão em gel de ágar.....	17
3.4. ELISA (proteína recombinante gp90).....	17
3.5. nPCR gag.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Eqüinos.....	18
4.2. Muares.....	20
4.3. Asininos.....	21
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	23
5.1. Eqüinos.....	23
5.2. Muares.....	24
5.3. Asininos.....	25
5.4. Muares X Eqüinos.....	25
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência de iniciadores utilizados na nPCR do gene gag do VAIE.....	18
Tabela 2 - Análise de concordância entre IDGA e ELISA no diagnóstico da AIE em eqüinos.....	19
Tabela 3 - Análise de concordância entre IDGA e PCR no diagnóstico da AIE em eqüinos.....	19
Tabela 4 - Análise de concordância entre ELISA e PCR no diagnóstico da AIE em eqüinos.....	20
Tabela 5 - Análise de concordância entre IDGA e ELISA no diagnóstico da AIE em muares.....	20
Tabela 6 - Análise de concordância entre IDGA e PCR no diagnóstico da AIE em muares.....	21
Tabela 7 - Análise de concordância entre ELISA e PCR no diagnóstico da AIE em muares.....	21

Tabela 8 -	Análise de concordância entre IDGA e ELISA no diagnóstico da AIE em asininos	22
Tabela 9 -	Análise de concordância entre IDGA e PCR no diagnóstico da AIE em asininos	22
Tabela 10 -	Análise de concordância entre ELISA e PCR no diagnóstico da AIE em asininos	22
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1-	Coleta de sangue.....	15
Figura 2 -	“Nested” PCR do gene gag do VAIE	19
Figura 3 -	PCR do gene β - actina.....	23

RESUMO

Muitos estudos têm sido realizados em todo o mundo a respeito da resposta imunológica de cavalos (*Equus caballus*) à Anemia Infecciosa Equina (AIE), no entanto existe pouca informação a respeito da resposta imunológica de muares (*Equus caballus* X *Equus asinus*) e asininos (*Equus asinus*) naturalmente infectados pelo VAIE. O objetivo desse trabalho foi comparar o perfil sorológico e a detecção do vírus da AIE em asininos, muares e eqüinos naturalmente infectados e avaliar a importância destas espécies como mantenedoras da AIE nos rebanhos brasileiros. No presente estudo, foi coletado sangue para obtenção de soro e células mononucleares periféricas (PBMC) de 124 cavalos, 119 muares e 75 asininos, perfazendo um total de 318 animais. Foi extraído DNA do PBMC de 114 cavalos, 79 muares e 35 asininos. Todas as amostras foram testadas através da Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) e Ensaio imunoenzimático (ELISA). O DNA foi submetido à reação "nested" da polimerase em cadeia (nPCR). Nos eqüinos ocorreu a melhor correlação entre IDGA e ELISA do que nos muares. O mesmo foi observado entre a IDGA e a nPCR. Quando se comparou a correlação entre ELISA e a nPCR, o melhor resultado foi observado para amostras de eqüinos novamente. O número de amostras de asininos foi insuficiente para se fazer uma análise estatística, mas os resultados mostraram que dez asininos, negativos na IDGA, foram positivos no ELISA e sete positivas na nPCR. As duas amostras positivas na IDGA foram também positivas no ELISA e na nPCR. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que as respostas sorológicas e viremia dos muares são diferentes das respostas dos eqüinos. A concordância entre a IDGA, ELISA e PCR em amostras de eqüinos foi superior aos resultados obtidos em amostras de muares.

Palavras chave: Diagnóstico; AIE; eqüino; mular; asinino.

ABSTRACT

A lot of studies about horses (*Equus caballus*) immune responses to equine infectious anemia virus (EIAV) have been done all over the world, but there are little information concerning immune responses of mule (*Equus caballus* X *Equus asinus*) and donkey (*Equus asinus*) to natural infection with EIAV. The aim of this work was to compare the serological and virus detection in asinus, mules and equines naturally infected with EIAV, and evaluate the importance of mules and asinus to maintain the EIAV in the Brazilian herds. In the present study sera and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples were collected of 124 horses, 119 mules and 75 asinus, in a total of 318 samples. DNA of PBMC was extracted from 114 horses, 79 mules and 35 asinus. All samples were tested by Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). DNA was submitted to nested polymerase chain Reaction (nPCR). The correlation to AGID and ELISA for equines was better than mules. The same was observed between AGID and nPCR. When the correlation between ELISA and nPCR was compared, the best correlation was observed in equines again. The number of asinus was not significant to statistic evaluation but results showed that 10 negative asinus in AGID were positive in ELISA and 7 were positive in nPCR. Two positive asinus in AGID were positive in ELISA and nPCR. These results showed that serological responses and virus detection in mules might be different from the responses in equines. The concordance between AGID, ELISA and PCR tests were better in equine than in mules.

Key words: AIE, diagnosis, horse, mule, donkey.

1. INTRODUÇÃO

A anemia infecciosa eqüina (AIE) é uma doença causada por um RNA vírus, membro da família *Retroviridae* e do gênero *Lentivirus*. É uma virose de distribuição mundial, sendo, atualmente, reconhecida como a mais importante doença dos eqüídeos. A história das retroviroses eqüinas é predominantemente a história do vírus da Anemia Infecciosa Eqüina (VAIE), um *Lentivirus* que provoca uma infecção persistente em cavalos. A doença foi descrita em 1843 na França e a etiologia viral definida em 1904.

Essa doença é hoje um grande obstáculo ao desenvolvimento da eqüideocultura, por ser uma doença transmissível e incurável, acarretando prejuízos aos proprietários que necessitam do trabalho desses animais e aos criadores interessados na melhoria das raças, além de ser importante barreira sanitária.

O diagnóstico laboratorial é de fundamental importância para detecção dos portadores do vírus, que de acordo com a legislação brasileira devem ser sacrificados, ou segundo algumas normas estaduais, os animais positivos devem ser segregados dos demais animais, promovendo dessa maneira o saneamento dos rebanhos.

O rebanho eqüídeo mundial está estimado em 120 milhões de animais, sendo que 90 milhões destes são criados em áreas tropicais e subtropicais, incluindo o território brasileiro. Segundo o IBGE (Banco...2001), o rebanho eqüídeo brasileiro é de 8.385.736 animais, sendo que 13% desse efetivo encontra-se em território mineiro.

Somente a família *Eqüídea* (eqüinos, muares e asininos) é acometida pela AIE. Entretanto há pouca informação no que diz respeito às respostas imunes de outros eqüídeos como muares (*Equus asinus* x *Equus caballus*) e asininos (*Equus asinus*) para a infecção com este vírus. Tem sido descrito na literatura que algumas espécies de eqüídeos são mais resistentes a certas

doenças do que outras. Além dos dados encontrados na literatura, tem sido relatada a resistência dos muares e asininos à AIE por criadores e pessoas que lidam com estes animais em rebanhos infectados. Na região do pantanal mato-grossense que apresenta regiões com prevalência de até 50%, os fazendeiros já estão substituindo os cavalos de serviço por muares devido a sua maior resistência em apresentar sintomas da AIE.

Baseado nestes dados, a proposta deste trabalho foi fazer uma comparação do perfil sorológico e detecção do vírus em asininos e muares naturalmente infectados pelo VAIE em relação aos eqüinos, para avaliação da importância destas espécies como mantenedores da AIE nos rebanhos brasileiros.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 Histórico da AIE

O vírus da Anemia Infecciosa Eqüina foi o primeiro vírus animal a ser identificado (Valle e Carré, 1904), apesar da doença já ser descrita desde 1843 por Ligné na França. Na década de sessenta o VAIE foi cultivado *in vitro* pela primeira vez, o que provavelmente foi um dos motivos para que o estudo da patogênese, imunologia e biologia molecular deste vírus estejam tão avançados (Clementes e Zink, 1996).

Nas Américas a enfermidade foi diagnosticada, pela primeira vez no ano de 1881, em Manitoba, Canadá, sendo que em 1896 foi descrita em Wisconsin já tendo sido diagnosticada em muitas regiões dos Estados Unidos (Byrne, 1960). Na Venezuela, a doença foi descrita por Saxer, (1960). Segundo Monteverde (1964), o diagnóstico da AIE foi estabelecido na Argentina, pela primeira vez em 1964.

No Brasil a AIE foi diagnosticada pela primeira vez em 1968 no extinto Estado da Guanabara por Dupont et al. (1968). No mesmo período a doença foi descrita por Silva et al. (1968) em animais do Clube

Hípico Fluminense e em um animal da cavalaria da Polícia Militar na cidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro. Ainda em 1968, Guerreiro et al. também descreveram o primeiro caso no Estado do Rio Grande do Sul.

Em Minas Gerais, o primeiro caso foi diagnosticado em 1968, em um cavalo na Vila Hípica de Belo Horizonte. Porém, somente em 1971, com base nos exames clínicos, anátomo-patológicos, laboratoriais e inoculação do sangue suspeito em animal sadio, o resultado foi publicado, citando também a comprovação de mais 18 casos em eqüídeos do Jôquei Clube de Minas Gerais (Batista Junior e Fonseca, 1971).

Segundo levantamento soroepidemiológico realizado por Almeida et al. (2005), Minas Gerais foi considerada área endêmica para AIE, com uma prevalência de 5,3% para rebanhos e 3,1% para animais. As mais altas prevalências para rebanho e animais foram encontradas na região Norte/Nordeste, seguida pela região Vale do Mucuri/Jequitinhonha.

2.2 Infecção e fases da doença

Os sinais clínicos da AIE são variáveis e irão depender da dose e da virulência da amostra infectante, como também da susceptibilidade individual do hospedeiro (Sellon, 1993). Apesar disso, a resposta clínica dos eqüídeos seguida por infecção natural ou experimental com o VEIA pode ser dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente.

A fase aguda está associada à exposição inicial ao agente, e é caracterizada por febre de 40 a 41°C, trombocitopenia e depressão, que aparecem dentro de 7 a 30 dias pós-infecção. Normalmente, no início, esses sintomas são brandos e passam despercebidos, na maioria das vezes (Sellon, 1994). No começo dessa fase, os níveis de anticorpos no soro não são suficientes para serem detectados no teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), o que ocorre em média a partir de 45 dias pós-infecção (Issel e Coggins, 1979).

A fase crônica da doença é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia, associados à febre, anorexia, edema, hemorragias, anemia, letargia, diarreia, glomerulonefrites, trombocitopenia e leucopenia (Montelaro et al., 1993). O título do VAIE nos eqüídeos, nessa fase, não é estável, porém é alto durante os picos febris. Cada episódio clínico tem duração média de três a cinco dias, e o intervalo dos ciclos da doença é irregular podendo ser de semanas a meses. A frequência e a gravidade dos episódios usualmente declinam com o tempo e terminam no primeiro ano. Neste período a maioria dos cavalos tornam-se portadores inaparentes, fato único entre as lentiviruses, que normalmente evoluem de uma forma inaparente para aguda (Issel e Coggins, 1979; Montelaro et al., 1993).

Quando a manifestação clínica da doença passa a ser menos freqüente e grave, os eqüídeos tornam-se portadores inaparentes do vírus. A maior parte dos animais infectados nunca demonstram os sinais clínicos, entrando no estágio de portador inaparente, sem passar pelas fases aguda e crônica, só sendo detectados durante um exame de rotina (Issel e Coggins, 1979; Issel, 1998). No campo a maioria dos cavalos positivos para AIE estão na fase assintomática e quando não identificados continuam no rebanho servindo como fonte de disseminação da doença.

Os asininos, apesar de serem susceptíveis ao VAIE, podem apresentar níveis de viremia bem baixos, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem, usualmente, os sinais clínicos da enfermidade (Cook et al., 2001). Segundo Spyrou et al. (2003), os achados clinicopatológicos e laboratoriais, mostram que os muarees produzem sinais clínicos semelhantes aos observados em eqüinos.

2.3 Transmissão

A AIE é uma enfermidade cuja morbidade e mortalidade são variáveis. De um lado, as condições ecológicas e população de insetos hematófagos; de outro, a densidade demográfica de eqüídeos, facilitam a

difusão e aumentam a taxa de infecção, sempre havendo maior morbidade onde ambas as populações sejam numericamente grandes (Corrêa e Corrêa, 1992).

O sangue de cavalos contaminados é a forma mais importante de transmissão do EIAV, e pode ser transferido por vetores tabanídeos da ordem Diptera (insetos hematófagos): *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp, *Tabanus* sp, *Hybromitra* spp, sendo os *Tabanus* sp os principais responsáveis pela transmissão (Issel e Coggins, 1979; Issel et al., 1988).

A importância de indivíduos que trabalham diretamente com os animais ou veterinário, na indução da infecção através de fômites contaminados (principalmente agulhas), também deve ser enfatizada (Williams et al., 1981; Issel et al., 1985).

A transmissão da AIE pode ocorrer também pela placenta em éguas com altos títulos de vírus que infectam o feto ao nascer. A resposta fetal para a infecção é variável, pode ocorrer aborto, nascerem “vírus positivo” ou portadores “soro positivo” (Issel e Coggins, 1979; Issel et al., 1988 e 1990). Desde que o VAIE foi demonstrado no sêmen de garanhão com sinais agudos, a transmissão venérea é teoricamente possível, apesar de não ter sido documentado nenhum caso de transmissão natural em éguas expostas a garanhões contaminados (Issel et al., 1990).

A transmissão transplacentária, através do colostro e venérea é possível, porém não apresenta importância epidemiológica (Kemen Junior e Coggins, 1972; Tashjian, 1984; Clabough, 1990).

2.4 Estrutura viral, replicação e resposta imunológica

O EIAV é um membro do gênero *Lentivirus* e da família *Retroviridae*, possui genoma constituído por duas fitas de RNA não complementares de 8.2 Kb. 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, 1996). O gene gag codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9; o gene pol codifica a transcriptase reversa, integrase e protease e o gene env codifica as glicoproteínas gp90 (superfície externa) e gp45 (transmembrana).

Os Lentivirus induzem infecção persistente em seus hospedeiros naturais, que é atribuída a variações antigênicas nas proteínas de superfície da partícula viral. Essas mutações permitem o escape ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas (Montelaro et al., 1984). No caso do VAIE, as mutações determinantes do escape viral estão relacionadas com a glicoproteína gp90.

O ciclo viral inicia-se pela interação da glicoproteína de superfície do vírus com receptores específicos nas células alvo. O ciclo de replicação do VAIE é semelhante ao dos demais lentivírus, entretanto o VAIE envolve células da linhagem monócito/macrófago na infecção dos equídeos. Após a entrada do vírus na célula, o vírus é parcialmente desnudo e o RNA viral é copiado pela transcriptase reversa viral, gerando uma fita dupla de DNA do genoma viral. O DNA genômico viral é então integrado ao genoma celular pelas porções terminais dos LTRs, mediado pela integrase viral. A transcrição do genoma dos vírus passa a ser dependente da presença na célula de fatores de transcrição específicos, o que pode estar associado ao tropismo do vírus. Durante os episódios febris o VAIE se replica predominantemente nos macrófagos maduros no baço, fígado, linfonodo, pulmões, rins e na glândula adrenal (Sellon et al., 1994; Sellon et al., 1996).

Os primeiros anticorpos que 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. O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico 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 observado para gp90 (Montelaro et al., 1993).

2.5 Equinos X Muares e Asininos

Pouca informação no que diz respeito à infecção e às respostas imunes de outros eqüídeos como muares (*Equus asinus* X *Equus caballus*) e asininos (*Equus asinus*) para a infecção do vírus da AIE tem sido descrita na literatura. Algumas espécies de eqüídeos são mais resistentes a certas doenças do que outras; por exemplo, infecção de cavalos com o vírus da doença do cavalo africano pode resultar em mais de 90% de mortalidade enquanto a infecção em zebras (*Equus burchelli*) é normalmente subclínica e a infecção de jumentos pode ser subclínica ou associadas a sintomas leves (Alexander, 1948; Erasmus et al., 1978; Barnard, 1993). Ainda comparando a cavalos, jumentos infectados com o vírus da arterite eqüina apresentam sintomatologia mais branda (McCollum et al., 1995). Cook et al. (2001) realizaram um trabalho experimental utilizando cinco pôneis (*Equus caballus*) e três jumentos (*Equus asinus*) inoculados com amostras patogênicas do VAIE, e compararam a resposta sorológica, viremia, sinais clínicos e analisaram o nível de plaquetas aos 365 dias pós infecção (dpi). Este trabalho demonstrou experimentalmente que os pôneis inoculados com o VAIE apresentaram episódios febris recorrentes (com até 41,1°C), com significativa queda na contagem de plaquetas (de até 84,5% de redução pi) e sinais como edema e petéquias na mucosa oral. Apenas um dos jumentos inoculados apresentou uma transitória e leve queda na contagem de plaquetas do 24^o ao 59^o dpi e permaneceu assintomático durante os 365 dias de observação como a maioria dos outros animais do experimento. Quanto à sorologia, foi detectado, nos pôneis, anticorpos contra a proteína p26 através de ELISA entre o 21^o e o 28^o dpi, já nos jumentos, não foi possível detectar anticorpos antes do 42^o dia pi. No IDGA, além de se detectar reações positivas mais

tardamente, os jumentos apresentavam reações fracamente positivas. 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.

Toma (1980) após um levantamento de 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 podem reagir fracamente a IDGA e a sua importância como mantenedores do vírus da AIE nos rebanhos eqüídeos.

Alem destes dados encontrados na literatura, criadores e pessoas que lidam com muares e asininos tem relatado uma certa resistência destes animais a AIE frente aos eqüinos, o que tem feito muitos pecuaristas trocarem sua tropa de trabalho de eqüinos, por muares e asininos, principalmente em regiões de alta prevalência como o Pantanal Mato-grossense.

2.6 Diagnóstico e controle

Até a década de 60 as pesquisas do VAIE eram restritas pela falta de confiáveis sistemas *in vitro* para seu isolamento, propagação e quantificação (Montelaro et al., 1993). O diagnóstico era feito através da inoculação do sangue de animal suspeito em eqüino sadio, que era monitorado até o aparecimento dos sinais clínicos característicos da AIE. Depois que Kobayashi e Kono (1968) conseguiram multiplicar o VAIE em cultura de leucócitos e posteriormente adaptá-lo a linhagens celulares contínuas, vários testes sorológicos foram desenvolvidos, dentre eles, a Imunodifusão em Gel de Agar

(IDGA), um confiável teste sorológico descrito por Coggins e Norcross em 1970.

A IDGA assim como um grande número de testes sorológicos baseia-se na detecção de anticorpos contra a principal proteína do core viral, a p26. Essa detecção ocorre através da migração do antígeno presente no soro do animal, em um meio semi-sólido (ágar-gel), com a formação de uma linha de precipitação visível a olho nu. Conhecido como Teste de Coggins, é a prova qualitativa reconhecida como o método laboratorial mais importante no diagnóstico da AIE por sua especificidade e facilidade de execução. Detecta anticorpos precipitantes específicos entre 14 e 45 dpi (Coggins et al., 1972; Issel e Coggins, 1979), mas não detecta anticorpos na fase inicial da doença (Reis, 1997). Outra limitação seria os resultados falso negativos ou duvidosos, principalmente quando se trata de mueres e asininos que normalmente possuem baixíssimos níveis de viremia (Toma, 1980; Issel e Adams, 1982; Langemeier et al., 1996). A proteína p26 tem sido preferencialmente utilizada por ser altamente conservada e porque a maioria dos animais infectados produz anticorpos específicos anti-p26. Apesar de suas deficiências, a IDGA é considerado um bom teste e é o teste oficial para diagnóstico da AIE no Brasil.

Testes mais sensíveis na detecção de anticorpos contra o VAIE vem sendo descritos baseados na técnica de ELISA, detectando animais positivos em uma fase mais inicial da infecção. Reis et al. (1997) desenvolveram um ELISA utilizando a glicoproteína recombinante gp90 detectando anticorpos anti VAIE mais precocemente do que o ELISA que utiliza proteína p26. Segundo Martins (2004) o ELISA rgp90 é mais sensível que a IDGA sendo dessa forma um bom teste de triagem a ser utilizado em grandes levantamentos soroepidemiológicos, além de detectar soros que apresentam reações fraco positivo na IDGA com resultados bastante nítidos.

Testes sorológicos convencionais apresentam limitações significativas para a

detecção de anticorpos anti VAIE como, por exemplo, a inabilidade de detectar anticorpos nos primeiros estágios da infecção. Em infecção experimental Ferraz (1998) mostrou que os resultados pelo teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram superiores ao IDGA e ELISA, detectando seqüências do genoma do VAIE três dias após infecção. A PCR tem sido proposta como método de diagnóstico confirmatório para a AIE e outras retrovíroses, e para estudos da variabilidade genética desses vírus (Nagarajan et al., 2001; Langemeier et al., 1996; Camargos et al., 2005). A PCR para detecção de DNA proviral do VAIE é sensível e específica não só para identificar cavalos em estágio subclínico, como também cavalos recentemente infectados em processo de montagem de resposta imune e potros infectados que possuem anticorpos colostrais anti-VAIE, que interferem nos testes sorológicos (Toma, 1980; McConnell et al., 1983; Issel et al., 1985; Issel e Cook, 1993).

Apesar da evolução que os testes de diagnóstico vem sofrendo desde a descoberta da AIE, testes mais sensíveis, acessíveis e aplicáveis para o seu diagnóstico ainda são uma prioridade na medicina veterinária de eqüídeos.

A AIE não tem tratamento nem vacina e a maioria dos portadores são assintomáticos, portanto o diagnóstico laboratorial torna-se fundamental para o controle da doença. Apenas a China e Cuba mantêm esquemas de vacinação com vacinas atenuadas, no entanto estas vacinas parecem proteger apenas contra amostras homólogas do vírus. Além disso a comunidade científica internacional questiona a eficiência destas vacinas.

Medidas como separação de animais positivos dos negativos, testes sorológicos periódicos, uso de uma agulha por animal, separação de potros filhos de éguas positivas são essenciais para o controle e erradicação da AIE.

Desde 1981, através da Portaria nº 200, AIE foi incluída entre as doenças passíveis de

aplicação das medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal (Art.61 do Decreto 24.548, de 03 de julho de 1934), sendo obrigatório o sacrifício dos animais doentes, uma vez que não existe cura ou tratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização

Laboratório de Retrovírus (RetroLab) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG

3.2 Coleta das amostras

Foi coletado sangue total (com anticoagulante, EDTA) e soro de 124

eqüinos, 119 muares e 75 asininos de uma propriedade em Mato Grosso do Sul, diversas propriedades em Sergipe (fig. 1) e em áreas de alta prevalência de AIE em Minas Gerais. A coleta do sangue foi feita na jugular do eqüídeo, utilizando agulha individual e tubo vacutainer após antissepsia do local com álcool etílico a 70°GL. Para obtenção do soro, os tubos vacutainer foram centrifugados após retração do coágulo a uma velocidade de 1500g, durante 10 minutos. A papa de leucócitos foi recolhida para a obtenção de DNA genômico que foi utilizado na amplificação de fragmentos do gene gag pela nPCR de 116 eqüinos, 80 muares e 31 asininos.



Figura 1: Coleta de sangue

3.3 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

A IDGA foi realizada basicamente, com algumas modificações, segundo Coggins e Norcross (1970). O gel de ágar Noble a 1% foi preparado em microondas e distribuído (4,5mL) em lâmina para microscopia ao atingir a temperatura de 45°C. Após sua solidificação o ágar foi perfurado com um furador que contém um orifício central e seis periféricos. As lâminas prontas foram armazenadas em câmaras úmidas com solução fenolada a 1% e mantidas a temperatura ambiente. Os soros a serem testados foram colocados (25µL) alternando-se com os controles positivos nos orifícios periféricos. O antígeno foi colocado no orifício central. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas e a leitura feita a olho nu ou com o auxílio de uma lupa e 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 que tem identidade com a linha formada entre o antígeno e o soro controle positivo.

3.4 ELISA (proteína recombinante gp90)

O ELISA foi realizado segundo Reis (1997). A proteína recombinante gp90 (rgp90) foi diluída em tampão carbonato 50 mM (pH 9,0) na concentração de 0,5 µg/cavidade e incubada em placas de ELISA de 96 cavidades por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas duas vezes com salina tamponada (pH 7,0) contendo tween 20 a 0,05% e foram incubadas por uma hora com solução de bloqueio PBS-tween acrescida de leite em pó a 5%. Nova lavagem foi realizada e o soro foi incubado na diluição de 1:50 em PBS-tween acrescido de leite em pó a 1% por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente

lavadas com solução de PBS tween por três vezes e incubadas com solução de conjugado (coelho anti IgG eqüina-peroxidase) por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-tween por três vezes, foi colocado o substrato: solução de o-fenilenodiamino (OPD) (0,5 mg/ml) e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato citrato (pH 5,0) por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico a 3N e a densidade ótica lida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm. O ponto de corte para se considerar a reação positiva foi o mesmo utilizado por Martins (2004).

3.5 nPCR gag

Para a detecção do DNA proviral do EIAV em células mononucleares de sangue periférico, um ensaio de nested PCR foi executado em paralelo com controles positivos e negativos. O DNA foi extraído de animais naturalmente infectados utilizando-se o método do fenol-cloroformio-álcool isoamílico, proteinase K e precipitação com etanol.

Foi feito concomitantemente com o DNA das amostras, uma PCR para o gene da β -actina (gene normalizador) presente no genoma dos eqüídeos, para averiguar a integridade do DNA extraído em cada amostra (Mirsky et al., 1993).

O DNA extraído foi submetido à amplificação por PCR utilizando dois pares de iniciadores (Oaks et al., 1998) para uma região do gene gag em duas reações. A primeira reação foi realizada com o par de iniciadores 636 e 1399. A segunda reação (nested) foi realizada com o par de iniciadores 854 e 1262 (tab 1).

Tabela 1. Seqüência de iniciadores utilizados na nPCR do gene gag do VAIE.

Iniciadores ^a	Seqüência 5'-3'	Posição no genoma viral	Produto (pb)
Iniciadores externos			
636	ccattgctggaagatgtaac	636 - 655	782
1399	tgcggtctgaatagtcagtg	1399 - 1418	
Iniciadores internos			
854	ggctggaacagaaatttta	854 - 873	427
1262	taggtttccaatcatcact	1262 - 1281	

^a Os iniciadores foram baseados na seqüência publicada por Oaks et al. (1998)

A primeira PCR foi realizada para um volume total de 20µl. A mistura da PCR continha 2 µg da amostra de DNA, 2µl do tampão de PCR 10X (20 mM Tris HCL (pH 8,3), 50mM KCL), 1mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs mix, TAQ polimerase 0,15U, 30 pmol de cada iniciador e água ultra pura q.s.p. 20µL. A amplificação foi executada em um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C/ 30 segundos a 56°C/ 30 segundos a 72°C. A extensão final foi realizada por um ciclo de 7 minutos a 72°C. Todas as reações de PCR foram executadas em termociclador Perkin-Elmer, e cada reação foi coberta com uma gota de óleo mineral para evitar evaporação. Para a nested PCR, a concentração dos reagentes foi a mesma da descrita acima exceto 2µL do produto da primeira reação foi adicionado na segunda reação e o par de iniciador usado foi 854/1262. A temperatura dos ciclos no termociclador foram as mesmas descritas anteriormente. O produto final de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio, juntamente com marcador de tamanho molecular (100 bp).

Foi utilizado controle negativo de reagentes e como controle positivo o DNA extraído de

células da linhagem Derme Eqüina (ED) infectadas com amostra padrão do VAIE.

Utilizou-se tabelas de contingência para estimar os valores de Kappa e o nível de concordância entre os testes, bem como os valores de especificidade e sensibilidade (Dohoo et al., 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Eqüinos

De acordo com os resultados apresentados na tabela 2, referente à comparação entre os dois testes sorológicos, IDGA e ELISA de 124 soros coletados de eqüinos, dez tiveram resultados discordantes, sendo cinco positivos na IDGA e negativos no ELISA e cinco negativos na IDGA e positivos no ELISA. O restante das 114 amostras se dividiu em 43 negativas e 71 animais positivos em ambos os testes. Revelando desta forma um Kappa ótimo de 0,830 com um intervalo de confiança de 95% variando de 0,729 a 0,931. A sensibilidade relativa foi de 93,42% e a especificidade relativa de 89,58%.

Tabela 2 – Análise de concordância entre os testes sorológicos, IDGA e ELISA para o diagnóstico da AIE em eqüinos.

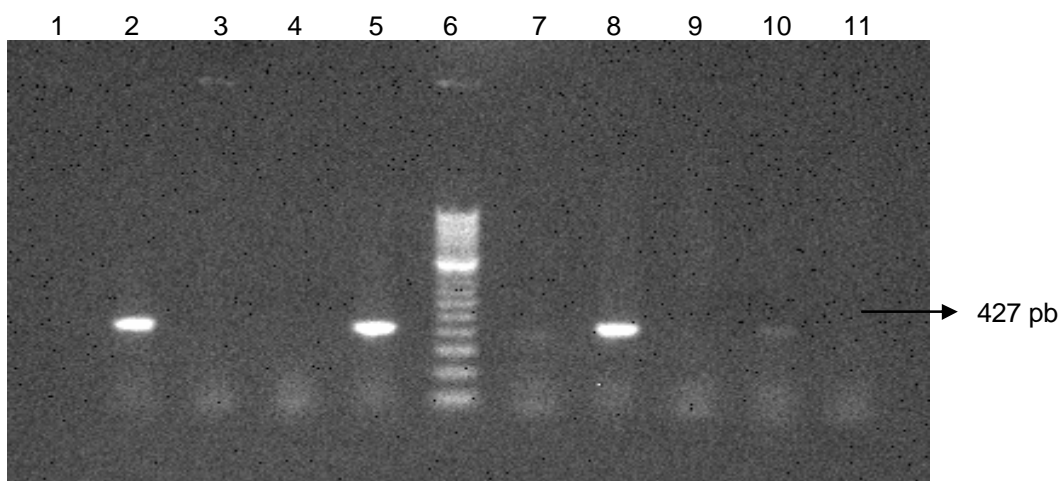
ELISA ²	IDGA ¹		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	71	5	76
Negativo	5	43	48
Total	76	48	124

1. Imunodifusão em Gel de Agar conforme protocolo descrito no item 3.3

2. ELISA rgp90 Reis (1997) conforme item 3.4

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, referente à comparação entre o IDGA e o PCR (fig. 2) de 116 amostras coletadas de eqüinos, 28 tiveram resultados discordantes, sendo sete positivos na IDGA e negativos na PCR e 21 negativos na IDGA e positivos na PCR. O restante das 88

amostras se dividiu em 26 negativas e 62 positivas em ambos os testes. Revelando desta forma um Kappa regular de 0,474 com um intervalo de confiança de 95% variando de 0,305 a 0,644. A sensibilidade relativa foi de 89,85% e a especificidade relativa de 55,31%.



Canaleta (1) controle negativo, (2) controle positivo, (3,4,7,9 e 11) amostras negativas, (6) marcador molecular 100pb e canaletas (5, 8 e 10) amostras positivas.

Figura 2 – “Nested” PCR do gene gag do VAIE.

Tabela 3 – Análise de concordância entre os testes, IDGA e PCR para o diagnóstico da AIE em eqüinos.

PCR ³	IDGA ¹		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	62	21	83
Negativo	7	26	33
Total	69	47	116

1. Imunodifusão em Gel de Agar conforme protocolo descrito no item 3.3

3. nested PCR gag conforme protocolo descrito no item 3.5

De acordo com os resultados apresentados na tabela 4, referente à comparação entre o ELISA e o PCR de 114 amostras coletadas de eqüinos, 32 tiveram resultados discordantes, sendo dez positivas no ELISA e negativas na PCR e 22 negativas no ELISA e positivas na PCR. O restante das

82 amostras se dividiu em 23 negativas e 59 positivas em ambos os testes. Revelando desta forma um Kappa regular de 0,384 com um intervalo de confiança de 95% variando de 0,205 a 0,563. A sensibilidade relativa foi de 51,11% e a especificidade relativa de 85,50%.

Tabela 4 – Análise de concordância entre os testes, ELISA e PCR para o diagnóstico da AIE em eqüinos.

	ELISA ²		Total
PCR ³	Positivo	Negativo	
Positivo	59	22	81
Negativo	10	23	33
Total	69	45	114

2.ELISA rgp90 Reis (1997) conforme item 3.4

3.nested PCR gag conforme protocolo descrito no item 3.5

4.2 Muares

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, referente à comparação entre os dois testes sorológicos, IDGA e ELISA de 119 soros coletados de muares, 19 discordaram os seus resultados, sendo dez positivos na IDGA e negativos no ELISA e

nove negativos na IDGA e positivos no ELISA. O restante das 100 amostras se dividiu em 71 negativas e 29 positivas em ambos os testes. Revelando desta forma um Kappa bom de 0,635 com um intervalo de confiança de 95% variando de 0,486 a 0,784. A sensibilidade relativa foi de 74,35% e a especificidade relativa de 88,75%.

Tabela 5 – Análise de concordância entre os testes sorológicos, IDGA e ELISA para o diagnóstico da AIE em muares.

	IDGA ¹		Total
ELISA ²	Positivo	Negativo	
Positivo	29	9	38
Negativo	10	71	81
Total	39	80	119

1. Imunodifusão em Gel de Agar conforme protocolo descrito no item 3.3

2. ELISA rgp90 Reis (1997) conforme item 3.4

De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, referente à comparação entre o IDGA e o PCR de 80 amostras coletadas de muares, 30 animais tiveram resultados discordantes, sendo 13 positivos na IDGA e negativos na PCR e 17 negativos na IDGA e positivos na PCR. O restante das 50

amostras se dividiu em 24 animais negativas e 26 positivas em ambos os testes. Revelando desta forma um Kappa sofrível de 0,251 com um intervalo de confiança de 95% variando de 0,038 a 0,465. A sensibilidade relativa foi de 66,67% e a especificidade relativa de 58,54%.

Tabela 6 – Análise de concordância entre os testes, IDGA e PCR para o diagnóstico da AIE em muares.

PCR ³	IDGA ¹		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	26	17	43
Negativo	13	24	37
Total	39	41	80

1. Imunodifusão em Gel de Agar conforme protocolo descrito no item 3.3

3. nested PCR gag conforme protocolo descrito no item 3.5

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7, referente à comparação entre o ELISA e a PCR de 79 amostras coletadas de muares, 34 tiveram seus resultados discordantes, sendo 12 positivas no ELISA e negativas na PCR e 22 negativas no ELISA e positivas na PCR. O restante das

45 amostras se dividiu em 24 negativas e 21 positivas em ambos os testes. Revelando desta forma um Kappa fraco de 0,152 com um intervalo de confiança de 95% variando de -0,062 a 0,365. A sensibilidade relativa foi de 63,63% e a especificidade relativa de 52,17%.

Tabela 7 – Análise de concordância entre os testes, ELISA e PCR para o diagnóstico da AIE em muares.

PCR ³	ELISA ²		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	21	22	43
Negativo	12	24	36
Total	33	46	79

2. ELISA rgp90 Reis (1997) conforme item 3.4

3. nested PCR gag conforme protocolo descrito no item 3.5

4.3 Asininos

Devido a condições climáticas pouco favoráveis ao desenvolvimento dos principais vetores transmissores da AIE, juntamente com o fato de que os proprietários dos asininos de onde foram coletadas as amostras não terem o hábito de comércio e trânsito destes animais entre áreas endêmicas da doença, o número de amostras positivas para AIE coletadas destes animais não foi suficiente para se fazer uma análise estatística. Entretanto é de grande importância a análise dos dados

encontrados para se fazer algumas inferências quanto aos métodos de diagnóstico da AIE para asininos.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 8, referente à comparação entre os dois testes sorológicos, IDGA e ELISA de 75 soros coletados de asininos, 10 tiveram seus resultados discordantes, sendo negativos na IDGA e positivos no ELISA. O restante das 65 amostras se dividiu em 63 negativas e duas positivas em ambos os testes.

Tabela 8 – Análise de concordância entre os testes sorológicos, IDGA e ELISA para o diagnóstico da AIE em asininos.

ELISA²	IDGA¹		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	10	12
Negativo	0	63	63
Total	2	73	75

1. Imunodifusão em Gel de Agar conforme protocolo descrito no item 3.3

2. ELISA rgp90 Reis (1997) conforme item 3.4

De acordo com os resultados apresentados na tabela 9, referente à comparação entre a IDGA e a PCR de 35 amostras coletadas de asininos, sete tiveram os seus resultados

discordantes, sendo negativas na IDGA e positivas na PCR. O restante das 28 amostras se dividiu em 26 negativas e duas positivas em ambos os testes.

Tabela 9 – Análise de concordância entre os testes, IDGA e PCR para o diagnóstico da AIE em asininos.

PCR³	IDGA¹		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	7	9
Negativo	0	26	26
Total	2	33	35

1. Imunodifusão em Gel de Agar conforme protocolo descrito no item 3.3

3. nested PCR gag conforme protocolo descrito no item 3.5

De acordo com os resultados apresentados na tabela 10, referente à comparação entre o ELISA e a PCR de 35 amostras coletadas de asininos, sete discordaram os seus resultados, sendo cinco positivas no ELISA

e negativas na PCR e duas negativas no ELISA e positivas na PCR. O restante das amostras se dividiu em 21 negativas e sete positivas em ambos os testes.

Tabela 10 – Análise de concordância entre os testes, ELISA e PCR para o diagnóstico da AIE em asininos.

PCR³	ELISA²		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	7	2	9
Negativo	5	21	26
Total	12	23	35

2. ELISA rgp90 Reis (1997) conforme item 3.4

3. nested PCR gag conforme protocolo descrito no item 3.5

Somente as amostras consideradas positivas no PCR para o gene da β -actina, (gene normalizador) presente no genoma

dos eqüídeos, foram submetidas ao nPCR do gene gag (fig. 3).

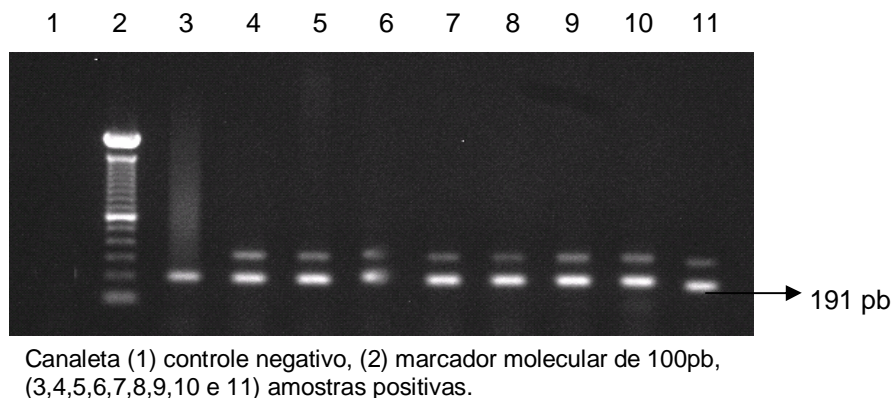


Figura 3 – PCR do gene β -actina (gene normalizador).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A principal forma clínica da AIE encontrada na natureza é a inaparente, mais de 80% dos animais infectados apresentam esta forma. No atual estudo este dado não foi diferente, a grande maioria dos animais coletados não apresentava sinais clínicos da doença. Apesar de não apresentarem sinais clínicos, estes animais apresentam uma perda econômica permanente para a eqüídeocultura e uma fonte de infecção para outros eqüídeos.

Testes principalmente sorológicos para o VAIE em eqüínos vem sendo extensivamente discutidos na literatura e vem revelando algumas limitações assim como incapacidade de detectar anticorpos no início da infecção, reação cruzada com outros lentivírus e a incapacidade de diferenciar imunidade passiva de ativa. A detecção direta do VAIE principalmente por PCR vem sendo preconizado por vários autores sobre vários aspectos como detecção da infecção neonatal e situações que animais apresentam uma resposta imunológica intermitente, mas muito pouco estudo tem sido feito em relação ao diagnóstico laboratorial da AIE em muare e asininos.

Os resultados encontrados no presente estudo apresentam algumas discordâncias quando são comparados os testes IDGA, ELISA e nPCR tanto quando se avalia intraespecies quanto se avalia interespecie. Algumas considerações podem ser feitas após uma análise comparativa entre os testes e entre as espécies:

5.1 Eqüínos

Os resultados da análise de concordância entre os testes sorológicos, IDGA e ELISA para o diagnóstico da AIE em eqüínos revelou um Kappa ótimo segundo interpretações feitas por Medronho (2003) e uma boa sensibilidade e especificidade comparada do ELISA com relação ao IDGA, 93,42% e 89,58% respectivamente. Estes valores estão um pouco abaixo dos encontrados por Martins (2004) que revelou uma sensibilidade comparada de 97,81% e uma especificidade comparada de 96,16%. Tal fato se justifica devido ao número muito superior de animais utilizados pela autora. Cinco amostras positivas no IDGA foram negativas no ELISA. Tal fato pode estar relacionado à possibilidade de reação cruzada com outros retrovírus em relação ao IDGA (Langemeier et al., 1996), bem como a possibilidade da existência de uma

nova variedade genética resultante de mutações no gene *env* e conseqüentemente na antigenicidade das proteínas do envelope como a observada no HIV, já que a proteína *rgp90* usada foi baseada na seqüência clonada a partir da amostra "Wyoming" do VAIE. Cinco amostras foram consideradas negativas no IDGA e positivas no ELISA. Já estes resultados podem estar relacionados a amostras fraco positivas que foram consideradas negativas na IDGA e verdadeiramente positivas no ELISA, sendo esta uma característica importante do teste de ELISA, concordando com Soutullo et al. (2001) e Martins (2004). O fato do ELISA utilizado ser indireto para detecção de anticorpos contra a glicoproteína 90 do VAIE, que são os primeiros a aparecer na AIE e em níveis até 1000 vezes maiores do que anticorpos contra a proteína 26 utilizada na IDGA (Martins, 2004) reforça ainda mais esta hipótese.

Já a análise de concordância entre os testes, IDGA e PCR para o diagnóstico da AIE em eqüinos revelou um Kappa regular segundo Medronho (2003) e uma baixa sensibilidade e especificidade relativa. Tal fato se deve a 21 amostras com resultados negativos na IDGA terem sido consideradas positivas na nPCR. Resultados similares foram obtidos por Langemeier et al. (1996) utilizando RT-nPCR por Ferraz (1998) utilizando nPCR *gp90* em animal experimentalmente infectado e em fase aguda, e por Santos (2006) utilizando o mesmo PCR deste estudo. A possibilidade de um falso positivo na nPCR não pode ser descartada, visto que a estocagem dos produtos da PCR e a contaminação das amostras no laboratório, são problemas em ensaios moleculares de alta sensibilidade (Schochetman et al., 1998) apesar de tal fato ser o menos provável devido aos cuidados tomados e porque todos os resultados foram provenientes de experimentos em duplicata e com controle negativo de reagentes. Por outro lado, sete amostras foram positivas no IDGA e negativas no nPCR. Tal negatividade pode ter sido gerada por número insuficiente de células infectadas ou pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em

decorrência ao término dos episódios de viremia (O'Rourke et al., 1991).

Quando se analisou a concordância entre os testes, ELISA e PCR para o diagnóstico da AIE em eqüinos, o Kappa foi igual ao da concordância anterior, considerado regular segundo Medronho (2003). Isso ocorreu devido ao fato das 22 amostras que foram consideradas positivas na PCR terem sido negativas no ELISA, demonstrando mais uma vez a possibilidade de mutações no gene *env* e conseqüentemente na antigenicidade das proteínas do envelope, e das dez amostras positivas no ELISA terem sido negativas na PCR, resultado gerado por número insuficiente de células infectadas ou pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em decorrência do término dos episódios de viremia, visto que a grande maioria dos animais coletados não apresentavam sinais clínicos da doença.

5.2 Muares

Os resultados da análise de concordância entre os testes sorológicos, IDGA e ELISA para o diagnóstico da AIE em muares revelou um Kappa considerado bom e uma sensibilidade e especificidade comparada do ELISA com relação a IDGA bem abaixo do encontrado por Martins (2004) em eqüinos. Tal fato se justifica devido ao número de eqüinos (907 animais) ter sido muito superior ao número de muares e asininos (100 animais) utilizados por esta autora. Dez amostras positivas na IDGA foram negativas no ELISA. Tal fato pode estar relacionado a uma menor sensibilidade e especificidade do ELISA para os muares, visto que o conjugado do ELISA *rgp90* utilizado é composto por anti IgG eqüina e não anti IgG de muares. Nove amostras negativas na IDGA foram positivas no ELISA. Tal fato pode estar relacionado a amostras fraco positivas consideradas negativas na IDGA e verdadeiramente positivas no ELISA visto que a subjetividade da leitura da IDGA pode levar a falhas na conclusão dos resultados, principalmente em relação aos muares que segundo Cook (2001) podem apresentar níveis de anticorpos inferiores aos eqüinos.

Já a análise de concordância entre os testes, IDGA e PCR para o diagnóstico da AIE em muares revelou um Kappa sofrível e uma baixa sensibilidade e especificidade relativa. Tal fato se deve a 17 amostras com resultados negativos na IDGA terem sido positivas na nPCR e 13 amostras positivas na IDGA terem sido negativas na PCR. As discussões para estes fatos são basicamente as mesmas dos eqüinos, ressaltando o fato de que a IDGA que serviu como teste padrão na avaliação da concordância não é o teste ouro.

Quando se analisou a concordância entre os testes, ELISA e PCR para o diagnóstico da AIE em muares, o Kappa foi considerado fraco. Tal valor se justifica pelo fato das 22 amostras que foram consideradas positivas na PCR terem sido negativas no ELISA e das 12 amostras positivas no ELISA terem sido negativas na PCR. As discussões para tal fato seriam as mesmas apresentadas para a análise da concordância destes dois testes para os eqüinos.

5.3 Asininos:

Quanto aos asininos, pelo fato do número de amostras positivas coletadas desta espécie não ter atingido o número mínimo para se fazer uma análise estatística, vale aqui fazer algumas observações para estudos futuros

Dos 75 soros coletados, somente dois foram positivos na IDGA sendo estas mesmas amostras positivas tanto no ELISA quanto no PCR. Doze amostras foram consideradas positivas no ELISA sendo que dessas doze, duas já haviam sido consideradas positivas na IDGA e sete foram positivas na PCR. Tal fato sugere que para estes animais haveria a necessidade de se utilizar ou até mesmo desenvolver testes mais sensíveis para diagnóstico, visto que esta espécie apresenta níveis de anticorpos, vírus e ácidos nucléicos no plasma inferiores aos eqüinos (Cook et al., 2001).

5.4 Muares X Eqüinos

Ao analisarmos o resultado da correlação entre os testes IDGA e ELISA e compararmos tais valores entre as duas espécies, verifica-se que a correlação é diferente, ou seja, o Kappa foi considerado ótimo para os eqüinos e bom para os muares. Revelando desta forma que o ELISA apresenta uma melhor correlação com a IDGA quando se trabalha com amostras de eqüinos do que quando se trabalha com amostras de muares. Dez amostras positivas na IDGA foram negativas no ELISA, quando se avalia os muares, enquanto somente cinco amostras positivas na IDGA foram negativas no ELISA quando se avalia os eqüinos. Tal fato pode estar relacionado a uma menor sensibilidade e especificidade do ELISA para os muares comparada aos eqüinos, visto que o conjugado do ELISA rpg90 utilizado é composto por anticorpos anti-eqüinos e não anti-muares. Nove amostras negativas na IDGA foram positivas no ELISA, quando se avalia os muares, enquanto somente cinco amostras negativas na IDGA foram positivas no ELISA quando se avalia os eqüinos. Tal fato pode estar relacionado ao maior número de amostras fraco positivas consideradas negativas na IDGA e verdadeiramente positivas no ELISA para os muares do que para os eqüinos.

Quando foi analisado o resultado da correlação entre os testes IDGA e PCR e comparados entre amostras de muares e eqüinos, verifica-se que estatisticamente a correlação é diferente, ou seja, o Kappa foi considerado regular para os eqüinos e sofrível para os muares. Revelando desta forma que a PCR apresenta uma melhor correlação com a IDGA quando se trabalha com amostras de eqüinos do que quando se trabalha com amostras de muares. Treze amostras positivas na IDGA foram negativas na PCR, quando se avalia os muares, enquanto somente sete amostras positivas na IDGA foram negativas no PCR quando se avalia os eqüinos. Tal resultado pode ter sido gerado por número insuficiente de células infectadas ou pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em decorrência ao término dos episódios de

viremia (O'Rourke et al., 1991) com maior frequência nos muares do que nos eqüinos. Animais nesta fase da AIE são os mais abundantes na natureza, quando a viremia no plasma e cópias de provírus em PBMCs são geralmente indetectáveis (Oaks et al., 1998; Harrold et al., 2000). Dezesete amostras positivas no PCR foram negativas no IDGA, quando se avalia os muares, enquanto 21 amostras positivas na PCR foram negativas na IDGA quando se avalia os eqüinos. Estes resultados sugerem que maior número de eqüinos encontravam-se em estágios iniciais da infecção, quando são detectadas cópias do provírus em PBMCs mesmo sob baixas concentrações (Harrold et al., 2000), antes da produção dos anticorpos específicos detectados nos testes sorológicos (Santos, 2006).

Já a correlação entre os testes ELISA e PCR quando se compara muares e eqüinos, verificou-se que a correlação foi diferente, ou seja, segundo Medronho (2003) o Kappa foi considerado regular para os eqüinos e fraco para os muares. Revelando desta forma que a PCR apresentou uma melhor correlação com o ELISA quando se trabalha com amostras de eqüinos do que quando se trabalha com amostras de muares. Doze amostras positivas no ELISA foram negativas na PCR, quando se avaliou os muares, enquanto somente dez amostras positivas no ELISA foram negativas no PCR quando se avaliou os eqüinos. Tal resultado também pode ter sido gerado por número insuficiente de células infectadas ou pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em decorrência ao término dos episódios de viremia (O'Rourke et al., 1991) com maior frequência nos muares do que nos eqüinos. A correlação entre estes dois testes foi baixa para ambas as espécies e principalmente para os muares porque o teste padrão além de não ser o teste ouro, foi o ELISA, que já apresentou uma correlação inferior ao IDGA para os muares.

De uma forma geral os resultados da análise de concordância entre os testes, IDGA e ELISA, IDGA e PCR e entre ELISA e PCR para o diagnóstico da AIE de eqüinos comparados a muares foi estatisticamente diferente. Os testes

revelaram uma maior concordância quando as amostras analisadas eram de eqüinos. As análises revelaram ainda uma sensibilidade e uma especificidade relativa também maior para os eqüinos.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir com este trabalho que a resposta sorológica e viremia dos muares são diferentes da resposta dos eqüinos. Segundo análises estatísticas, a concordância entre os testes IDGA, ELISA e PCR para os eqüinos é superior aos muares. Conclui-se ainda que há uma maior concordância quando se compara dois testes sorológicos entre si (IDGA e ELISA) do que quando se compara um dos testes sorológicos com a PCR, tanto para muares quanto para eqüinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, R.A. The 1944 epizootic of horse sickness in the middle east. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* v.53, p. 471-475, 1948.

ALMEIDA, V.M.A. *Prevalência da anemia infecciosa eqüina, no rebanho de animais de serviço*, em Minas Gerais. 2005. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BANCO de dados agregados. IBGE, 2001. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=12>>. Acesso em 02 nov. 2006.

BARNARD, B.J. Circulation of African horse sickness virus in zebra (*Equus burchelli*) in the Kruger National Park, South Africa, as measured by the prevalence of type specific antibodies. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* v.60, p.111-117, 1993.

BATISTA JÚNIOR, J. A.; FONSECA, V. O. Anemia infecciosa eqüina. *Arq. Esc. Vet.*, v.23, p.281-290, 1971.

BEVILACQUA, P.D. *Ecossistemas para a anemia infecciosa eqüina em Minas Gerais de 1973 a 1991*. 1993. 155f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BYRNE, R. J. Equine infectious anemia. **Md Vet.**, p.6-8, 1960. Resumo in **Progress equine practice**. American Veterinary Publications, 1966. 595p.

CAMARGOS, M. F. *Vírus da Leucemia Bovina: Epidemiologia Molecular e Diagnóstico*, 2005. 95f. Tese (Doutorado em...) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARVALHO, M.; DERSE, D. The PU 1/Spi-1 proto oncogene is a transcriptional regulator of a lentivirus promoter. **J. Virol.** v.67, p.3883-3890, 1993.

CLABOUGH, D.L. Equine infectious anemia: the clinical signs, transmission, and diagnostic procedures. **Vet. Med.**, v.85, n.9, p.1007-1019, 1990

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M.C., Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infectious. **Clin. Micro. Reviews**, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996.

COGGINS, L.; NORCROSS, N.L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Vet.**, v.60, n.2, p.330-335, 1970.

COGGINS, L.; NORCROSS, N.L.; NUSBAUM, S.R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. **Am. J. Vet. Res.**, v.33, n.1, p.11-18, 1972.

COOK, S.J.; COOK, R.F.; MONTELARO, R.C. et al. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. **Vet. Microbiol.**, v.79, n.2, p.93-109, 2001.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C N.M. Anemia infecciosa eqüina. In: _____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. cap. 76, p.695-698.

DUPONT, O.; DACORSO FILHO, P.; MUCHALUAT, M.A. et al. Diagnóstico da anemia infecciosa eqüina no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1, 1968, Niterói. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.160-161.

ERASMUS, B.J.; YOUNG, E., PETERSE, L.M. et al. The susceptibility of zebra and elephants to African horse sickness virus. In: Bryans, J.T., Gerber, H. (Eds.), Equine Diseases IV. Proceedings of the Fourth International Conference on Equine Infectious Diseases. **Vet. Pub.**, Princeton, NJ, pp. 409–413.

FERRAZ, I.B.F. *Vírus da Anemia Infecciosa Eqüina: Amplificação por PCR do DNA proviral da gp90, comparação com o teste de ELISA e IDGA e variabilidade genética de amostras brasileiras*, 1998.153f. Tese (doutorado em...), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GERREIRO, M.G.; BAUER, A.G.; GLOSS, R.M. et al. **Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor**, n.1/2, p.3-4, 1968

HARROLD, S.M.; COOK, S.J.; COOK, R.F. 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. **J. Virol.**, v.74, p.3112-3121, 2000.

ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.174, n.7, p.727-733, 1979.

ISSEL, C.J.; ADAMS JUNIOR, W.V.; MEEK, L. et al. Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.180, n.3, p.272-275, 1982.

- ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V.; FOIL, L.D. Prospective study of the progeny of inapparent carriers of equine infectious anemia virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.1114-1116, 1985.
- ISSEL, C.J.; MACMANUS, J.M.; HAGIUS, S.D. et al. equine infectious anemia: prospects for control. *Develop. Biol. Standart*, v.72, p. 49-57,1990.
- ISSEL, C.J.; COOK, R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.5, p.137-141, 1993.
- ISSEL, C. J. We can beat EIA. **Eqqus**, n.252, p.45-55, 1998.
- KEMEN JUNIOR, M. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: transmission from infected mares to foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.161, n.5, p.496-499, 1972.
- KOBAYASHI, K.; KONO Y. Propagation and titrations of equine infectious anemia virus in leucocyte culture. **Nat. Inst. Anim. Health. Q.**, v.7, n.1, p.8-20,1967.
- LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.34 n.6, p.1481-1487, 1996.
- MADDON, P.J.; McDOUGAL, J.S.; CLAPHAM, P.R. HIV infectious does not require endocytosis of its receptor. **Cell.**, v.54, p.865-874,1998
- MARTARANO, L.; STEPHENS, R.; RICE, N. Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein Ver controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. **J. Virol.**, v.68, p.3102-3111, 1994.
- MARTINS, M. F. *Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp90) no diagnóstico da anemia infecciosa equina.* 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MAURY, W.; OAKS, J.L.; BRADLEY, S. Equine endothelial cells support productive infectious anemia virus. **J. Virol.**, v.72, p.9291-9297, 1998.
- MEDRONHO, R. A. *Epidemiologia.* Local: Ateneu, SP, 2003
- McCollum, W.H.; Timoney, P.J.; Tengelsen, L.A. Clinical, virological and serological responses of donkeys to intranasal inoculation with the KY-84 strain of equine arteritis virus. **J. Comp. Pathol.**, v.112, p.207-211, 1995.
- McCONNELL, S.; KATADA, M.; DARNTON, S.M. Occult equine infectious anemia in an immunosuppressed serologically negative mare. **Equine Pract.**, v.5, p.32-39, 1983.
- MIRSKY, M.L.; DA, Y.; LEWIN, H.A. Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. **PCR Methods and Applications**, n.2, p.333-340, 1993.
- MONTELARO, R.C.; PAREKH, B.; ORREGO, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. **J. Biol. Chem.**, v.259, n.16, p.10539-10544, 1984
- MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.). **The retroviridae.** New York: Plenum Press, 1993. v.2, Cap.5, p.257-359.
- MONTEVERDE, J.J.; MORÁN, B.L.; GARBERS, G. V. Anemia infecciosa equina. **Rev. Med. Vet.**, v.45, n.6, p.431-434, 1964.
- NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v.94, p.97-109, 2001.
- OAKS, J.L.; McGUIRE, T.C.; ULIBARRI, C. et al. Equine Infectious Anemia Virus Is Found in Tissue Macrophages during Subclinical Infection. **J. Virology**, v.72, p.7263-7269, 1998.

- O'ROURKE, K.I.; BESOLA, M.L.; McGUIRE, T.C. Proviral sequences detected by polymerase chain reaction in peripheral blood cells of horses with equine infectious anemia lentivirus. **Arch. Virol.**, v.117, p.109-119, 1991.
- RASTY, S.; DHARVA, B.R.; SCHILTZ, R.L. Proviral DNA integration and transcriptional patterns of equine infectious anemia virus during persistent and cytopathic infections. **J. Virol.**, v.64, p.86-95, 1990.
- REIS, J.K.P. *Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da anemia infecciosa equina, para uso em imunodiagnóstico.* 1997. 184 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- REIS, J.K.P.; MELO, L.M.; REZENDE, M.R. et al. Use of the ELISA test in the eradication of an equine infectious anemia focus. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.26, n.2, p.65-68, 1994.
- SANTOS, E.M. *Avaliação da PCR (Polymerase Chain Reaction) para Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina.* 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SCHOCHETMAN, G.; C. Y. ; JONES, W.K. Polymerase Chain Reaction. **J. Infect. Dis.**, v.158, p.1154-1157, 1989
- SELLON, D.C. Equine infectious anemia. **Vet. Clin. N. Am.**: Equine Practice. v.9, n.2, p.321-336, 1993.
- SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; McGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus Res.**, v.32, p.111-138, 1994.
- SELLON, D.C.; WALKER, K.M.; RUSSELL, K.E. Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. **J. Virol.**, v.70, p.590-594, 1996.
- SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; FREITAS, W.M. et al. Ocorrência da anemia infecciosa no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. **Anais.** Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.173-182.
- SOUTULLO, A.; VERWIMP.; RIVEROS, M.; PAULI, R. et al. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. **Veterinary Microbiology**, n.79, p.111-121, 2001.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V. et al. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 49-59, 2003.
- STEPHENS, R.M.; DERSE, D.; RICE, N.R. cloning and characterization of cDNAs encoding equine infectious anemia virus tat and putative Rev proteins. **J. Virol.**, v.64, p.3716-3725, 1990.
- TASHJIAN, R.J. Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 184, n. 3, p. 282-288, 1984.
- TOMA, B. Reponse serologique negative persistante chez une jument infectee par le virus de l' anemie infectieuse des equides. **Rec. Med. Vet.**, v.156, n.1, p.55-63, 1980.
- VALLÉ, H., CARRÉ, H. Sur La nature infectieuse de L'anemie du cheval **C. R. Acad. Sci.**, v.139, p.331-333, 1904.
- WILLIAMS, D.L.; ISSEL, C.J.; STEELMAN, C.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. **Am. J. Vet. Res.**, v.42, n.9, p.1469-1473, 1981.