

# **COMPARAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ANINHADA (NESTED-PCR) NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO DE EQUINOS POR *Babesia equi***

JERÔNIMO DE ALMEIDA MAROSO<sup>1</sup>, ALESSANDRA WOLINSKI ESCOBAR<sup>1</sup>, LEANDRO QUINTANA NIZOLI<sup>2</sup>, SERGIO SILVA DA SILVA<sup>2</sup>, VAGNER RICARDO LUNGE<sup>3</sup>, DANIEL SIMON<sup>4</sup>, DANIEL THOMPSEN PASSOS<sup>5</sup>

## **RESUMO**

*Este trabalho teve como objetivo comparar os testes de reação em cadeia da polimerase aninhada (nested-PCR) e imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de Babesia equi em equinos da raça PSI (Puro Sangue Inglês). Os testes foram realizados em amostras de sangue de 108 equinos. A concordância entre os testes foi de 87,0 % e observou-se alta associação entre as técnicas ( $\chi^2 = 37,9$ ;  $p < 0,001$ ). Nas amostras em que não houve concordância (13 % dos animais), 3 foram positivas na técnica de nested-PCR e negativas na técnica RIFI e 11 foram negativas na técnica de nested-PCR e positivas para RIFI. Novos estudos precisam ser desenvolvidos para esclarecer alguns*

---

<sup>1</sup>Acadêmico(a) do Curso de Medicina Veterinária – Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPEL, Capão do Leão

<sup>3</sup>Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA - Laboratório de Diagnóstico Molecular/ULBRA

<sup>4</sup>Professor do Curso de Biologia/ULBRA

<sup>5</sup>Professor - orientador do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

aspectos relacionados ao diagnóstico da *B. equi*. Entretanto, a boa associação obtida entre os testes de nested-PCR e RIFI permite concluir que a nested-PCR pode ser uma ferramenta eficiente no diagnóstico e no controle da disseminação da babesiose equina.

**Palavras-chave:** *Babesia equi*, nested-PCR, RIFI.

## ABSTRACT

This study aimed the comparison between the nested polymerase chain reaction (nested-PCR) and indirect fluorescent antibody test (IFA) for the detection of *Babesia equi* in English Thoroughbred horses. The tests had been carried in blood samples of 108 equines. The concordance between the tests was 87 % and it was observed a good association between the techniques ( $\chi^2 = 37.9$ ;  $p < 0.001$ ). In the samples with disagreement between the tests (13% of the analysed animals), 3 were positive for the nested-PCR technique and negative for the IFA tests and 11 were negative for nested-PCR tests and positives for IFA tests. New studies should be performed to clarify some aspects related to the diagnosis of the *B. equi*. However, the good association observed between the nested-PCR and IFA tests allows to conclude that nested-PCR can be an efficient tool in the diagnosis and the control of the dissemination of equine babesiosis.

**Key words:** *Babesia equi*, nested-PCR, RIFI.

## INTRODUÇÃO

A babesiose tem sido citada como a principal parasitose equina devido aos danos diretos (perdas de performance, mortalidade) e indiretos (impedimento para comercialização, viagem para o exterior) causados à sanidade animal (FRIEDHOFF, 1990). A doença é causada por dois agentes etiológicos classificados como hematozoários do gênero *Babesia*: *B. equi* e *B. caballi*, tendo como vetores de transmissão os carrapatos, podendo também ser transmitida por agulhas contaminadas com sangue de animais portadores, picadas de moscas ou mosquitos (KNOWLES & UNISS-FLOID, 1983). A doença caracteriza-se por apresentar uma forma aguda com o desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva e uma forma crônica na qual os animais tor-

nam-se portadores muitas vezes assintomáticos (KNOWLES et al., 1980). Em cavalos atletas da raça PSI (Puro Sangue Inglês), a *B. equi* tem se constituído no principal patógeno relacionado a babesiose, já que o estresse provocado pelos treinamentos induz ao aumento da parasitemia em animais com infecções latentes, pois o baço pode abrigar eritrócitos parasitados com *Babesia* e parasitas livres em número elevado (ZWART & BROCKLESBY, 1979). Nos períodos de treinamento o baço se contraí liberando uma grande quantidade de eritrócitos, plaquetas e leucócitos para a circulação (SMITH et al., 1989), resultando em estados anemiantes que diminuem o rendimento dos animais (IBANÉZ et al., 1979). Nestes casos, o diagnóstico da infecção por este parasita é essencial no manejo adequado dos animais para uma melhor performance atlética.

Até recentemente, a técnica laboratorial mais utilizada para detecção da infecção era a visualização microscópica dos parasitos em esfregaços sanguíneos corados. Devido à baixa sensibilidade deste método, testes imunológicos indiretos têm sido incorporados com sucesso na rotina de laboratórios veterinários. Entre estes testes destaca-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), descrita pela primeira vez para o diagnóstico de *B. equi* por CALLOW *et al.* (1979). Em estudo recente também foi descrito o desenvolvimento de técnica baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) que permite a detecção direta de *B. equi* com maior sensibilidade, especificidade e rapidez (NICOLAIEWSKY *et al.*, 2001; BATTSETSEG *et al.*, 2002). O presente estudo comparou o teste de reação em cadeia da polimerase aninhada (nested-PCR) com RIFI na detecção de *B. equi* em equinos PSI.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de RIFI para detecção de anticorpos anti-*B. equi* foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), utilizando amostras de soro de 108 equinos procedentes de um haras da região sul do estado do Rio Grande do

Sul. O título de 1:80 foi padronizado como o limite de positividade para o teste. Para a reação da nested-PCR, o DNA foi extraído a partir de uma amostra de 100  $\mu$ l de sangue, dos mesmos 108 equinos utilizados nos testes de RIFI, usando o método padrão fenol - clorofórmio e precipitação com etanol (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

O gene EMA-1 (KAPPMAYER *et al.*, 1993) que codifica o antígeno do merozoíto de *B. equi* (EMA-1; KNOWLES *et al.*, 1991) foi escolhido como sequência alvo para a construção dos iniciadores (primers) e estabelecimento da técnica de PCR para a detecção molecular. Dois pares de iniciadores foram definidos para a PCR: EMA-1F/EMA-2R, amplificando um fragmento de 396 pares de bases (pb) e EMA-3F/EMA-4R, amplificando um fragmento de 102 pb, interno ao fragmento de 396 pb (NICOLAIEWSKY *et al.*, 2001). O Quadro 1 apresenta a sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados nas amplificações parciais do gene. Os testes de nested-PCR foram realizados nas condições de amplificação definidas por NICOLAIEWSKY *et al.* (2001). Os produtos da reação de amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de poli-acrilamida 12,5%, corado com nitrato de prata. A confirmação do tamanho do fragmento foi realizada através da comparação com uma escada alélica de 50 pares de bases (Amersham Biosciences).

**Quadro 1** - Sequência dos iniciadores utilizados para detecção de *B. equi*.

Iniciadores	Sequência de Nucleotídeos	Fragmento Esperado
EMA-1F EMA-2R	5'- CCGCCCTTCACCTCGTTCTCAA -3' 5'- CTCCAGTTCCTACGGCGGCTCT -3'	396 pb
EMA-3F EMA-4R	5'- CCGTCTCCGTTGACTTGGCCG -3' 5'- TCCGAGGTCCGTTCCGCGCAGG -3'	102 pb

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes diretos (nested-PCR) e indiretos (RIFI) para detecção de *B. equi* foram realizados em amostras de sangue de 108 equinos PSI. Os resultados são mostrados no Quadro 2. A concordância entre os testes foi de 87,0 % e observou-se alta associação entre as técnicas ( $\chi^2 = 37,9$ ;  $p < 0,001$ ). A sensibilidade e a especificidade da técnica da nested-PCR para a amplificação do gene EMA-1 de *B. equi* foram as mesmas obtidas por NICOLAIEWSKY *et al.* (2001). A técnica de RIFI para o sorodiagnóstico foi padronizada de acordo com CUNHA (1993), sendo utilizados antígenos específicos de *B. equi*, possibilitando descartar a hipótese de haver reação cruzada com soros de animais infectados com *B. caballi*.

Em 3 animais os resultados da técnica de nested-PCR foram positivos e os resultados de RIFI negativos, podendo-se supor que estes animais tenham sofrido uma infecção recente não tendo havido o tempo necessário para o organismo montar uma resposta imune à infecção. WEILAND (1986) observou que cavalos artificialmente infectados com *B. equi* e *B. caballi* demoravam de 3 a 20 dias para produzirem anticorpos detectáveis. Em 11 animais foram observados resultados positivos para RIFI e ne-

gativos para a técnica de nested-PCR, podendo-se supor que estes animais poderiam não estar mais na fase aguda da infecção ou ainda apresentavam anticorpos maternos, já que anticorpos maternos anti-*B. equi* podem permanecer na circulação por até 4 meses após a infecção (DONNELLY *et al.*, 1982). Além disso, quanto a sensibilidade a agentes terapêuticos, a *B. equi* é considerada uma das mais resistentes a babesicidas (KUTTLER *et al.*, 1987; SCHEIN, 1988) e não existem no mercado drogas disponíveis que ofereçam eficácia plenamente satisfatória na esterilização química do parasita, o que resulta em um grande percentual de equinos tratados que, deixam de apresentar sintomatologia clínica, mas que ainda seguem portadores da infecção em níveis de parasitemia baixa (DE WALL, 1992), inferiores a sensibilidade da técnica da PCR, impedindo a detecção direta do parasita. Novos estudos precisam ser desenvolvidos para esclarecer alguns aspectos problemáticos relacionados ao diagnóstico da *B. equi*, tais como aqueles observados nos animais que apresentaram resultados discordantes entre os testes. Entretanto, a boa associação obtida entre o teste de nested-PCR em comparação com a RIFI, nos permite concluir que a nested-PCR pode ser uma eficiente ferramenta no diagnóstico e no controle da disseminação da babesiose equina.

**Quadro 2** - Resultados dos testes de RIFI e Nested-PCR.

Testes/Resultados		RIFI		Total
		Positivo	Negativo	
NESTED-PCR	Positivo	13	3	16
	Negativo	11	81	92
Total		24	84	108

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 351-357, 2002.

CALLOW, L. L.; MC GREGOR, W.; RODWELL, B. J.; ROGERS, R. J.; FRASER, G. C.; MAHONEY, D. F.; ROBERTSON, G. M. Evaluation of an Indirect Fluorescent Antibody Test to Diagnose *Babesia equi* Infection in Horses. **Australian Veterinary Journal**, v.55, p.555-559, 1979.

CUNHA, C.W. **Babesiose Equina**: Padronização da reação de Imunofluorescência indireta para sorodiagnóstico em eqüinos puro sangue inglês. Pelotas: UFPel, Curso de Pós-Graduação em Veterinária - Área de Concentração em Sanidade Animal, 1993. 57 p.

DE WAAL, D. T. Equine piroplasmiasis: review. **British Veterinary Journal**, v. 46, p. 6-14, 1992.

DONNELLY, J.; PHIPPS, L. P.; WATKINS, K. K. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *Babesia caballi* in foals of seropositive mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, p. 126-128, 1982.

FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.4, p. 525-535, 1990.

IBANÉZ, E. A.; GIMÉNEZ, R. L.; ZENOCRATI, L. G. R. Aspectos clínicos y morfológicos de la *Babesia caballi* y *Babesia equi*. **Gaceta Veterinaria**, v.41, n.342, p.422-429, 1979.

KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L. E.; KNOWLES, D. P. Jr. A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, p. 121-124, 1993.

KNOWLES, R. C.; HOURRIGAN, J. L.; HOLBROOK, A. A.. Equine Piroplasmiasis. **Equine Practice**, v.2, n.1, p. 10-14, 1980.

KNOWLES, D.P.Jr.; PERRYMAN, L. E.; GOFF, W.L.; MILLER, C.D.; HARRINGTON, R.D.; GORHAM, J.R. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. **Infection and Immunity**, v. 59, n.7, p.2412-2417, 1991.

KNOWLES, R. C.; UNISS-FLOYD, R. Equine Piroplasmiasis (*Babesiosis*) of the *Babesia caballi* type. **Equine Practice**, v.5, n.3, p. 18-22, 1983.

KUTTLER, K. L.; ZAUGG, J. L.; GIPSON, C. A. Imidocarb and parvaquone in the treatment of piroplasmiasis (*Babesia equi*) in equids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 11, p. 1613-1616, 1987.

NICOLAIEWSKY, T.B.; RICHTER, M.F.; LUNGE, V.R.; CUNHA, C.W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; SILVA, S.S.; OZAKI, L.S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, n.10, p. 9-21, 2001.

SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3. ed. Cold New York: Spring Harbor, 2001.

SCHEIN, E. Equine Babesiosis. In: Ristic, M. (Ed.). **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton: Fl. CRC Press, cap. 12, p. 197-208, 1988.

SMITH, J. E.; ERICKSON, H. H.; DEBOWES, R.M.; CLARK, M. Changes in Circulation Equine Erythrocytes Induced by Brief High-Speed Exercise. **Equine Veterinary**

**Journal**, v. 21, n. 6, p. 444-446, 1989.

WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by mean of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 43-48, 1986.

ZWART, D.; BROCKLESBY, D. W. Babesiosis: Non-specific Resistance, Immunological Factors and Pathogenesis. **Advances in Parasitology**, v. 17, p. 49-113, 1979.