



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

REBECA JÉSSICA FALCÃO CÂMARA

**SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTIRPES DE
CAMPO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUÍDEOS
ERRANTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

MOSSORÓ-RN
2017

REBECA JÉSSICA FALCÃO CÂMARA

**SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTIRPES DE
CAMPO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUÍDEOS
ERRANTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto -
UFERSA

MOSSORÓ-RN
2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

C172s Câmara, Rebeca Jéssica Falcão.
SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE
ESTIRPES DE CAMPO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA
EQUINA EM EQUÍDEOS ERRANTES DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO NORTE / Rebeca Jéssica Falcão Câmara. -
2015.
49 f. : il.

Orientador: Sidnei Miyoshi Sakamoto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2015.

1. EIAV. 2. Equus asinus. 3. Gene gag. 4. Gene
LTR. I. Sakamoto, Sidnei Miyoshi, orient. II.
Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

REBECA JÉSSICA FALCÃO CÂMARA

SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTIRPES DE CAMPO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUÍDEOS ERRANTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

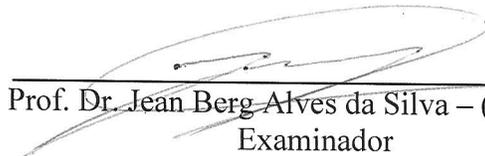
Orientador: Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto - UFERSA

Aprovação em 14 de Fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto – (UFERSA)
Presidente e Orientador



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva – (UFERSA)
Examinador



Profª. Dra. Fernanda Gonçalves de Oliveira – (Ananguera)
Examinadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

REBECA JÉSSICA FALCÃO CÂMARA, filha de Rute Guedes Falcão Câmara e Murilo Robson Câmara, nasceu em 09 de junho de 1992, na cidade de Natal - Rio Grande do Norte. Concluiu o ensino médio na Organização Educacional Farias Brito – FB, em Fortaleza/Ceará. Em 2010, iniciou o ensino superior no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), graduando-se em fevereiro de 2015. Como acadêmica atuou como estagiária na área de Medicina Veterinária Preventiva e Anestesiologia, e foi bolsista de iniciação científica no Laboratório Interdisciplinar do DECAN (Departamento de Ciências Animais). No mesmo mês que se graduou, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da UFERSA, no qual foi bolsista CAPES. No decorrer do curso realizou estágio em docência nas disciplinas de Doenças Infecciosas e Citologia para os cursos de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFERSA. Atuando na linha de pesquisa em Sanidade Animal, adquiriu experiência na área de Virologia e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Rute e Murilo, por todo amor, incentivo e por sempre acreditarem em mim. As minhas irmãs, tias, primas e amigos, pela torcida, orações constantes e por sempre alegrarem-se com minhas conquistas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me abençoar e guardar em todos os momentos de minha vida.

À minha mãe, Rute, por seu apoio incondicional, amor e paciência durante a realização dessa etapa de um sonho.

Ao meu pai, Murilo, e minhas irmãs, Sara e Talita, por seu amor, paciência e incentivo.

Aos meus sobrinhos Miguel e Maria Isabel pelas alegrias e sorrisos.

À Fernanda por sua amizade, ensinamentos, incentivos e pela fundamental ajuda para execução deste trabalho.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto, pela grande oportunidade, paciência e compreensão. Para mim foi uma honra conviver com este ser humano de caráter e humildade incontestável, que se refletem no profissional admirado e respeitado que é. A ele, minha eterna gratidão. Obrigada por tudo.

Aos meus grandes amigos Germana, Bruno e Natália muito obrigada por todos os momentos vividos, pela amizade, companheirismo e todas alegrias compartilhadas.

Ao Jenner, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela essencial parceria para realização deste trabalho.

À André, por todo amor, carinho, enorme paciência, incentivos, companheirismo.

Aos meus amigos, João, Roberto, Milka, Lis e Maria Cristina, pelos incentivos, carinho e amizade, por eu sempre poder contar com vocês não importa a distância.

Aos meus tios do coração, Nilza e Alexandre, por me acolherem, amarem e incentivarem.

Aos meus irmãos e amigos em Cristo, pelo companheirismo, amizade e incentivos.

Ao Sr. Jesus, por ceder seu tempo e propriedade para realização do estudo.

Aos funcionários da fazenda de recolhimento dos Asininos, em Apodi-RN, por disponibilizarem seu tempo e esforço para realização das coletas.

Aos funcionários da Pró - Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação da UFERSA por todos os auxílios.

Aos membros do Laboratório de Retrovírus (RETROLAB) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro de grande importância para a realização deste trabalho.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender durante estes 2 anos de Mestrado, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Corramos com perseverança a corrida que nos é proposta, tendo os olhos fitos em Jesus, autor e consumador da nossa fé.”

Hebreus 12. 1b-2a

SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTIRPES DE CAMPO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUÍDEOS ERRANTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

CÂMARA, Rebeca Jéssica Falcão. **SOROPREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTIRPES DE CAMPO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUÍDEOS ERRANTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**. 2017. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do SemiÁrido (UFERSA), Mossoró – RN, 2017.

RESUMO: A anemia infecciosa equina (AIE) é a doença infecciosa de etiologia viral mais importante entre os equinos. É uma doença endêmica em populações de equídeos por todo o mundo. Considera-se que todos os equídeos são susceptíveis embora os trabalhos publicados se concentrem em equinos, sendo escassas as informações sobre AIE em asininos. No Rio Grande do Norte (RN) milhares de asininos vivem livres, constituindo um problema para o controle de enfermidades como a AIE, pois podem ser prováveis reservatórios e fontes de transmissão delas. Neste trabalho, amostras de 409 animais (asininos e equinos) foram submetidas aos testes de IDGA, ELISA pgp45 e nested-PCR, utilizando iniciadores para o gene gag e LTR. Quatro amostras (0,98%) foram positivas em pelo menos um teste sorológico, e dessas, três amostras (0,73%) foram positivas na nested-PCR. Não obtivemos material suficiente para sequenciamento das amostras de LTR dos asininos sendo sequenciado apenas o amplificado de LTR referente à amostra do equino positivo. O alinhamento (BLAST) permitiu a identificação da sequência como vírus da AIE (EIAV) com 95% de similaridade de nucleotídeos com estirpes europeias. Os três produtos obtidos da nested-PCR para o gene gag foram sequenciados e submetidos à análise filogenética. O resultado da análise sugeriu que a sequência obtida do cavalo confirmaram a identificação como EIAV, com a mesma origem de isolados da América do Norte, e que as sequências de asininos não possuem identidade com nenhuma outra deo EIAV até o momento publicada. Desta forma, estudos adicionais são necessários para confirmar se, com estes resultados, foram identificados um *lentivirus* ainda não descrito que infecta *Equus asinus* (e qual papel ele teria para outros equídeos) ou se trata de retrovírus endógenos que expressa proteínas usadas como marcadores de diagnóstico da AIE. Embora os dados apresentados sejam incipientes, revelam um cenário interessante para o estudo das lentiviroses em asininos.

Palavras – chaves: EIAV, *Equus asinus*, genes gag, LTR.

**GENETIC CHARACTERIZATION OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA
VIRUS DETECTED IN FREE RANGING EQUIDS FROM
RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL**

CÂMARA, Rebeca Jéssica Falcão. **GENETIC CHARACTERIZATION OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS DETECTED IN FREE RANGING EQUIDS FROM RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL**. 2017. 48f. Dissertation (Master Degree in Animal Science: Animal Health) – Universidade Federal Rural do SemiÁrido (UFERSA), Mossoró – RN, 2017.

ABSTRACT: Equine infectious anemia (EIA) is the most important viral disease among horses. It is an endemic disease in populations of Equidae throughout the world. All equids are considered to be susceptible although most of the published work are focused in horses, with a lack of information on EIA in donkeys. In the State of Rio Grande do Norte, Brazil thousands of donkeys live free, establishing a problem for the control of diseases like the EIA, since they may play a role as reservoirs. In this work, blood samples taken from 409 animals (asinine and equine) were submitted to IDGA, ELISA pgp45 and nested-PCR tests, using gag and LTR gene as molecular markers. Four samples (0.98%) were positive in at least one serological test, and of these, three (0.73%) were positive to nested-PCR. We did not get enough material for sequencing of LTR samples from asinine, then only the amplified referring to the positive equine sample was sequenced. The alignment (BLAST) allowed the identification of the sequence as EIAV with 95% of similarity with european strains. Three product from nested-PCR products for the gag gene were sequenced and submitted to phylogenetic analysis. The result of this analysis suggested that the samples obtained from the horse had the same origin as strains from North America, and that the sequences from donkey samples had no homology with any other already published available EIAV sequence. In the light of the results from this work, additional studies are required. So we could confirm that we found a new strain of EIAV or endogenous retrovirus that are capable of expressing genes that are homologous to EIAV or even a new species of lentivirus. Although the presented data are incomplete, they reveal an interesting scenario for the study of EIAV infection in equids other than the horses.

Keywords: EIAV, Equus asinus, genes gag, LTR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Estrutura do vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) mostrando a localização e identidade de proteínas estruturais. (B) Provírus de 8 kpb do EIAV, com terminais de longa repetição (LTR) e as regiões de codificação das proteínas (gag, pol, env, tat, S2, e rev). Fonte: ISSEL et al. (2014, p.563)..... 20
- Figura 2- Representação esquemática do curso clínico da AIE correlacionando a temperatura corporal, contagem de plaquetas e número de cópias de RNA viral no plasma durante as fases da doença. Episódio febril é considerado quando temperatura retal está acima de 39°C; trombocitopenia é definida como contagens de plaquetas abaixo de 105.000/μL de sangue e viremia caracteriza-se pela quantidade de 105 cópias de RNA de EIAV/mL de plasma. Fonte: ISSEL et al. (2014, p.567)..... 25
- Figura 3 - IDGA demonstrando as linhas de precipitação formadas entre Ag p26 e anticorpos anti-EIAV. Fonte: Arquivo pessoal..... 26
- Figura 4 — Representação da lâmina de IDGA demonstrando orifício central para o antígeno (A) e orifícios periféricos alternando entre amostras e o soro padrão. Fonte: Arquivo pessoal. 30
- Figura 5 - Série de reações esperadas na IDGA e exemplos de linhas inespecíficas. Fonte: (disponível em <http://dept.ca.uky.edu/eia/documents/160.pdf>). 31
- Figura 6 - Árvore filogenética baseada em fragmentos parciais do gene gag da amostra de campo UFERSA/UFMG/01 (equino C4 FAS) e sequencias registradas no GenBank. 37

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fatores comparando o potencial do vetor transmitir o EIAV	23
Tabela 2 Sequência de primers utilizados neste estudo de acordo com o marcador e condições de ciclo utilizados.....	33
Tabela 3 - Resultados dos testes sorológicos e molecular.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
AIE - Anemia Infecciosa Equina
EIAV - Vírus da Anemia Infecciosa Equina
IDGA - Imunodifusão em gel de ágar
ELISA - Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
Pgp 45 – Peptídeos sintético da glicoproteína 45 do EIAV
PCR- Polymerase chain reaction
OIE – Office Internacional des Épizooties (Organização Mundial de Saúde Animal)
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
RNA - Ácido Ribonucleico
kpb - Kilo pares de bases
ORF - Open reading frames (fase aberta de leitura)
gp - Glicoproteína
LTR – Long terminal repeat
APOβEC3 - Apolipoproteína β
EIAV-PV- Estirpe patogênica do Vírus da Anemia Infecciosa Equina
RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
Ig - Imunoglobulina
°C- Graus Celsius
μL- microlitro
mL- mililitro
USDA- United States Department of Agriculture
rgp- glicoproteína recombinante
CEUA- Comissão de ética no uso de animais
UFERSA- Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais
RN- Rio Grande do Norte
g- constante gravitacional universal
μg- Micrograma
L- Litros
pH- Potencial hidrogeniônico
EUA - Estados Unidos da América
PBS - Phosphate Buffered Saline
Ta - temperatura ambiente
mg - Miligrama
h - Hora
OD- densidade ótica
mm- milímetro
NVSL- National Veterinary Services Laboratories
NSL- nonspecific line
mM- Milimolar
V- volts
mA- Miliampere
pb- pares de base
ng- Nanograma
seg- segundos
min- minutos

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. GERAL	18
2.2. ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE)	19
3.1.1. Histórico da AIE.....	19
3.1.2. Agente etiológico	19
3.1.3. Epidemiologia	21
3.1.3.1. Epidemiologia molecular	22
3.1.4. Patogenia e transmissão	23
3.1.5. Diagnóstico e controle	25
3.1.5.1. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA).....	26
3.1.5.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	27
3.1.5.3. Imunoblot (WESTERN BLOT)	27
3.1.5.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR)	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS TESTES LABORATORIAIS	28
4.2. COLETA DE MATERIAL.....	28
4.2.1. Local de obtenção das amostras	28
4.2.2. Técnica de coleta de sangue	28
4.3. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	28
4.3.1. ELISA Pgp45	28
4.3.2. IDGA	29
4.3.2.1. Critérios para interpretação da IDGA	30
4.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	32
4.4.1. Nested PCR	32
4.4.2. Visualização do produto das amplificações	33
4.5. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA ..	33
4.6. ESTATÍSTICA	34
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	38

7. CONCLUSÕES	42
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A equideocultura – que envolve a criação de equinos (cavalos), muares (burros e mulas) e asininos (jumentos, asnos) - é uma atividade que vem ganhando cada vez mais destaque na economia brasileira, gerando cerca de 4 milhões de empregos diretos e indiretos, além de movimentar cerca de R\$13 bilhões por ano no país (SNA, 2014). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2015) o Brasil possui um rebanho de mais de 7 milhões de equídeos, sendo o nordeste brasileiro responsável por albergar 35,74% desse rebanho. O rebanho nordestino é composto por, aproximadamente, 1.279.148 equinos, 584.962 muares e 812.467 asininos, representando, respectivamente 24%, 48% e 90% do rebanho nacional (MAPA, 2015).

Por muitos anos, os asininos foram considerados símbolo da região Nordeste do Brasil, sendo essenciais para economia local, como força de tração no trabalho da lavoura e meio de transporte de produtos e pessoas, mas em sua maioria, devido à mecanização da agricultura e do transporte, têm sido abandonados por seus proprietários, gerando um aumento do número de asininos errantes que vivem próximos às rodovias federais e estaduais (BITTENCOURT, 2016).

Doenças transmissíveis como a Anemia Infecciosa Equina (AIE), representam um grande obstáculo para o crescimento da equideocultura. A AIE é a doença infecciosa mais importante entre os equinos e considera-se que todos os outros equídeos são também susceptíveis (COOK et al, 2001) embora os estudos se concentrem em cavalos e pôneis. A doença é incurável, acarretando prejuízos aos proprietários que necessitam do trabalho desses animais e aos criadores interessados na melhoria das raças, além de impedir o acesso ao mercado internacional. Uma vez que um animal é infectado pelo EIAV, assume-se que ele se tornará positivo em uma prova sorológica para a detecção de anticorpos contra antígenos do agente e esta condição permanecerá por toda a sua vida. Esta premissa é o alicerce da vigilância desta doença, segundo as normas do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (BRASIL, 2008).

O primeiro registro não experimental da AIE no Brasil foi feito no Rio de Janeiro no ano de 1967 (SILVA et al., 2001). Depois desse registro, até a presente data, vários outros casos foram diagnosticados por todo o país. No Rio Grande do Norte, durante o ano de 2015, 24 equídeos foram abatidos, como medida de controle da doença (World Animal Health Information Database - WAHID, 2016).

A falta de um sistema de vigilância ativo faz com que não haja informações precisas sobre a epidemiologia descritiva da AIE no Brasil, uma vez que são notificados

apenas informações de animais submetidos a exames laboratoriais, na maioria das vezes, solicitados para o trânsito interestadual e participação em eventos agropecuários fiscalizados pelos serviços oficiais de defesa sanitária animal (ALMEIDA et al., 2006). A maior parte dos animais testados são de alto valor zootécnico, pertencendo a rebanhos em que, na maioria das vezes, a doença está controlada.

Em todo o Brasil, principalmente no Nordeste, o controle da AIE se tornou um desafio devido ao grande número de animais errantes pelas rodovias e municípios da região e ao desconhecimento do estado sanitário desses animais. Neste cenário, eles são prováveis reservatórios e fontes de contaminação dessa doença, além de representarem riscos de acidentes. Devido a esta problemática, a Polícia Rodoviária Federal passou a capturá-los e levá-los para fazendas de recolhimento.

Diante da importância econômica e social da equideocultura no Brasil e da carência de informações sobre a doença em asininos, foi importante determinar o papel do asinino na cadeia de transmissão do Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) e caracterizar geneticamente as estirpes encontradas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Investigar a presença do Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) no rebanho de equídeos errantes do estado do Rio Grande do Norte, no período de setembro de 2014 à janeiro de 2015.

2.2. ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Realizar o diagnóstico da anemia infecciosa equina através do teste oficial preconizado pelo MAPA, a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e através do recém desenvolvido ELISA pgp45;
- 2.2.2. Detectar provirus de EIAV no DNA extraído de amostras de sangue coletadas dos animais do estudo através do Nested –PCR usando os marcadores para as regiões gênicas *gag* e LTR
- 2.2.3. Realizar a caracterização molecular do EIAV por sequenciamento das amostras amplificadas para os genes *gag* e LTR e posterior análise filogenética, comparando as sequencias obtidas com sequencias do EIAV disponíveis no GenBank.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE)

3.1.1. Histórico da AIE

Primeira doença infecciosa associada a etiologia viral, a anemia infecciosa equina foi descrita pela primeira vez como doença por Lignèe em 1843 na França, conforme publicação de VALLÉ E CARRÉ em 1904 (COOK et al., 2013). O caráter contagioso da AIE foi constatado por Anginiard, através de um experimento no qual ele transmitiu sangue de um equino infectado a outro sadio (RICHETER, 1999).

A AIE foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1954, no estado de São Paulo, em casos de infecção experimental (ALMEIDA, 1974), sendo o primeiro relato registrado posteriormente no extinto estado de Guanabara em 1967, no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2001)

Devido a dificuldades encontradas no isolamento e propagação do vírus em cultivo celular, a caracterização do EIAV só foi realizada vários anos após sua identificação, sendo possível apenas no início do século XX (COOK et al., 2013). Em 1970, foi descoberto por Coggins e Norcross o teste de imunodifusão para o diagnóstico da AIE (COGGINS E NORCROSS, 1970), sendo reconhecido como teste padrão ouro e recomendado pela OIE. O teste de IDGA é o método de diagnóstico oficial para AIE no Brasil e em vários outros países do mundo.

3.1.2. Agente etiológico

O vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) é o agente etiológico responsável pela doença Anemia Infecciosa Equina (AIE). É um lentivírus da família *Retroviridae* pertencente à subfamília *Orthoretrovirinae*, responsável por causar infecção persistente em espécies da família *Equidae* (equinos, asininos e muares) (ISSEL et al., 2014). É considerado “primo do interior” do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo um dos mais simples lentivírus conhecidos (LEROUX et al., 2004). Uma análise do EIAV por microscopia eletrônica revelou que ele é formado por partículas circulares ou ovais que medem cerca de 115 nm de diâmetro, possui núcleo cônico, encapsulado por uma matriz proteica e limitado por uma membrana lipídica contendo numerosas projeções de 6-8 nm, dentro do núcleo estão duas cópias de RNA genômico de sentido positivo (MATHEKA et al. Al., 1976, WEILAND et al., 1977) (Figura 1A).

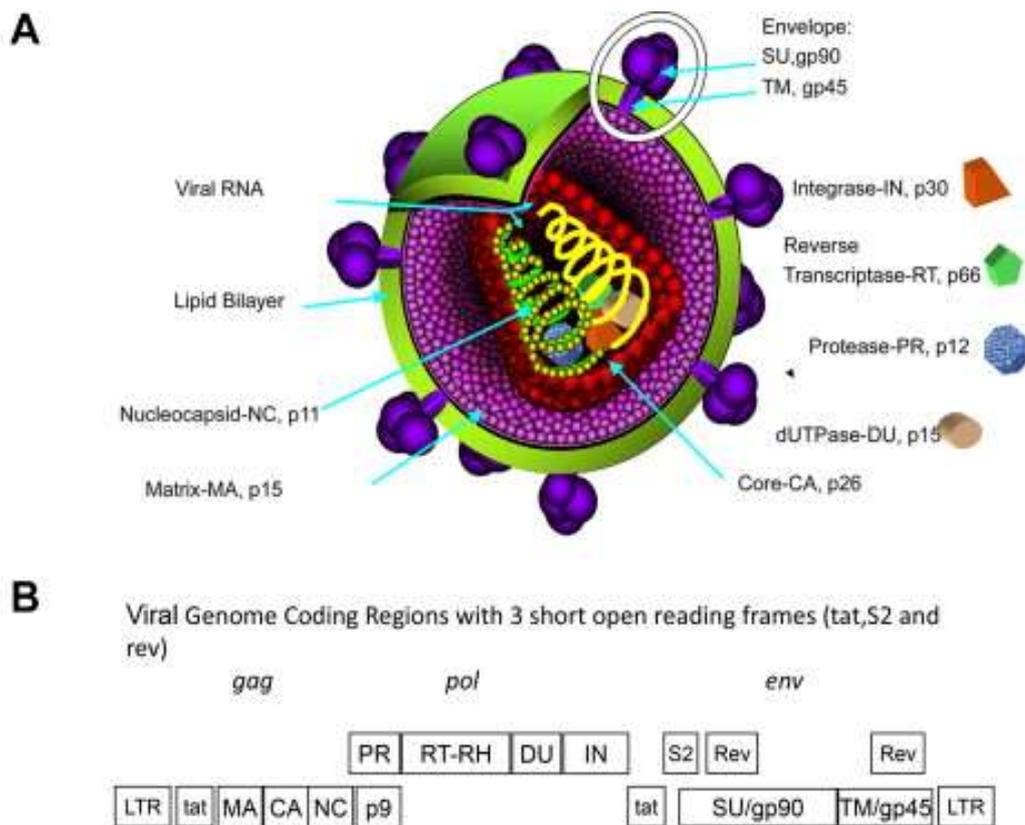


Figura 1 - (A) Estrutura do vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) mostrando a localização e identidade de proteínas estruturais. (B) Provírus de 8 kpb do EIAV, com terminais de longa repetição (LTR) e as regiões de codificação das proteínas (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *S2*, e *rev*). Fonte: ISSEL et al. (2014, p.563).

O EIAV possui aproximadamente 8,2 kpb, apresentando o menor genoma e o menor número de quadros de leitura aberta (ORFs) quando comparado a outros lentivírus conhecidos, possuindo, dentre eles, a organização mais simples do genoma (ISSEL et al., 2014) (Figura 1B). Assim como outros retrovírus, o EIAV possui três genes estruturais principais (*gag*, *pol* e *env*), flanqueados por terminais de longa repetição (LTR) que contém sequências regulatórias (COOK et al., 2013).

O gene *gag* codifica as proteínas do core viral p26 (capsídeo), p15 (matriz), p11 (nucleocapsídeo) e p9 (proteína de domínio tardio); o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, integrase e protease (enzimas importantes na replicação viral reversa); e o gene *env* codifica as glicoproteínas transmembrana, gp45, e do envelope gp90, proteínas envolvidas na ligação ao receptor celular (receptor de lentivírus equino-1 [ELR-1]) e infecção subsequente de célula hospedeira.

O EIAV possui duas proteínas acessórias em comum com outros lentivírus, a proteína reguladora Tat (transativador para replicação) e a Rev (que atua no transporte do RNA viral para o núcleo a partir do citoplasma) que estão envolvidas na replicação viral, e possui uma proteína exclusiva, a S2, que codifica proteína essencial para a virulência (COOK et al., 2013) (Figura 1B). Além disso, o EIAV é o único membro do gênero que não possui uma ORF que codifica a Vif orthologue (proteína importante na defesa dos retrovírus contra a apolipoproteína β – APO β EC3), o que chega a ser intrigante, pois os equinos possuem mais genes APO β EC3 que qualquer espécie não primata (ISSEL et al., 2014).

3.1.3. Epidemiologia

A AIE é uma doença cosmopolita, porém sua prevalência é variada nas regiões do Brasil e do mundo. Os dados da prevalência dessa enfermidade aqui no Brasil, não retratam a realidade, visto que menos de 10% da população de equídeos é frequentemente testada para AIE, sendo que, esses dados são gerados, principalmente, na participação dos equídeos em eventos agropecuários, na troca de proprietários e viagens (internacionais, interestaduais e municipais). Alguns estudos demonstram que a prevalência média da AIE no Brasil e na América do Sul varia de 2-3%, porém, regiões como o Pantanal Mato-grossense e a região Norte do Estado de Minas Gerais são consideradas endêmicas para AIE (Almeida et al., 2006; Borges et al., 3 2013).

O vírus infecta todos os membros da família *Equidae*, porém, a resposta clínica depende dos fatores virais (virulência), e fatores de predisposição do hospedeiro. A maioria dos estudos existentes foram realizados em equinos e pôneis (*Equus caballus*), apesar do vírus também infectar asininos (*Equus asinus*) e mulas (*Equus caballus* x *Equus asinus*). Estudos como o de Spyrou e colaboradores (2003) demonstraram, a partir de achados fisiopatológicos, que os muares possuem sinais semelhantes ao dos equinos. No entanto, asininos são, usualmente, assintomáticos. Em estudo conduzido por Cook e colaboradores (2001) demonstrou-se que esses animais apresentam baixa viremia, através de infecção experimental de asininos e equinos com a estirpe patogênica do EIAV denominada EIAV-PV. Nesse estudo todos os equinos apresentaram sinais clínicos da AIE e os asininos permaneceram assintomáticos durante os 365 dias de observação. A soroconversão dos animais ocorreu 20 e 40 dias pós-infecção para equinos e asininos, respectivamente. Os asininos apresentaram carga viral detectada em ensaios de RT-PCR 100.000 vezes menor, se comparado àquela obtida

para equinos durante as três primeiras semanas pós-infecção. Já na infecção com a estirpe Wyoming (altamente virulenta), a diferença na carga viral entre essas duas espécies, foi cerca de 1000 vezes menor nos asininos, e a soroconversão dos animais foi detectada duas semanas após a infecção.

3.1.3.1. Epidemiologia molecular

Em equídeos infectados, as regiões gênicas *gag* e *pol* são relativamente conservadas ao longo do tempo, enquanto *env* e a ORF que codifica Rev sofrem grande variação genética (ZHENG et al., 1997; LEROUX et al., 1999; BELSHAN et al., 2001). A proteína P26, produto da expressão de *gag* e as enzimas expressas por *pol*, apresentam identidade na sequência de aminoácidos entre as estirpes do EIAV de cerca de 80-89%, enquanto a identidade de aminoácidos entre P9 *gag* e S2 é menor que 50% (ISSEL et al., 2014). Embora exista uma variação genética significativa entre os isolados do EIAV, as partes estruturais e funcionais das proteínas virais são mantidas. Um exemplo é o final do domínio p9 Gag (tirosina, prolina, ácido aspártico, leucina) que está implicado na liberação de vírus através da célula hospedeira, apesar de ele apresentar uma variação genética significativa, foi observado em todas as estirpes analisadas (QUINLIVAN et al., 2006; CAPOMACCIO et al., 2012; DONG et al., 2013).

A AIE é uma doença endêmica em populações de equídeos por todo o mundo, porém, a caracterização de isolados globais é pouca, tendo sido publicadas apenas quatro sequências genômicas completas de isolados de campos do EIAV (EIAV_{LIA} [China], EIAV_{IRE} [Irlanda], EIAV_{MIY} [Japão], EIAV_{WY} [USA]) (CAPOMACCIO et al., 2012). Essas sequências apresentam 80% ou mais de identidade de nucleotídeos e cada uma compreende um clado separado, sugerindo que todas evoluíram independentemente, uma vez que todas divergem de um antepassado comum (QUINLIVAN et al., 2006; DONG et al., 2013). A análise filogenética das sequências EIAV *gag* disponíveis no Genbank foi realizada por Capomaccio e colaboradores, sendo observado um forte padrão de aglomeração geográfica para o EIAV, com uma correlação significativa entre os filogrupos de isolados e grandes regiões geográficas, sendo, provavelmente, reflexo de uma menor mobilidade global de equídeos, conduzindo a algumas misturas de estirpes quando isso ocorre. Além disso, o EIAV é o único entre os lentivírus que em condições naturais, as infecções podem ser adquiridas através de transferência mediada por insetos vetores. Isso, por sua vez, facilita as

infecções de curto e longo curso, reforçando ainda mais a estruturação geográfica (CAPOMACCIO et al., 2012; ISSEL et al., 2014).

3.1.4. Patogenia e transmissão

A infecção na maioria das vezes é iniciada pelo contato de um animal sadio com sangue infectado pelo EIAV através de vetores hematófagos da ordem *Diptera*: *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp, *Tabanus* sp, *Hybromitra* spp, sendo os *Tabanus* sp os principais vetores hematófagos (COOK & ISSEL, 2009) e, principalmente, pela ação humana (através de fômites contaminados) (Tabela 1). A transmissão vertical do EIAV no útero da égua para o potro é rara (CRAIGO E MONTELARO, 2008). Um relato recente identificou a expressão do EIAV em células epiteliais do pulmão de equinos infectados na Romênia (BOLFA et al., 2013), demonstrando um potencial para a transmissão via aerossol. Após infecção, o EIAV se liga aos monócitos, onde seu RNA sofre transcrição reversa dando origem ao DNA proviral. Quando o monócito infectado amadurece para macrófago o ciclo viral se completa, ocorre a replicação do vírus, e vírions são liberados na corrente sanguínea infectando outros monócitos, gerando uma infecção persistente, pois o sistema de defesa não detecta os vírions presentes nos monócitos (ISSEL E FOIL, 2015). Os órgãos que possuem abundância de macrófagos são os mais acometidos (fígado, baço, linfonodos, pulmões e rins) (VARGAS, 2008). Durante o curso da doença os títulos virais no soro dos animais infectados oscilam em intervalos largos, apresentando-se elevados durante o episódio febril inicial e diminuindo ao longo das crises febris subsequentes (SELLON et al., 1994).

Tabela 1 - Principais fatores comparando o potencial do vetor transmitir o EIAV

	Grupo de insetos vetores			Homem (fômites)
	Tabanídeos	Mosca do estábulo	Mosquitos	
Importância geral	Alta	Alta	Baixa/Nenhuma	Maior
Taxa de alimentação interrompida	Maior	Alta	Baixa	Sem dados
Volume de sangue transferido	Alto	Mais baixo	Mais baixo	Maior
Distância de disseminação do agente	Mais longa	Mais curta	Mais curta	Mais longa

Fonte: ISSEL et al. (2014, p. 566)

Os vírions são liberados na corrente sanguínea por meio de brotamento usando a membrana da célula infectada, levando-a morte (QUINN et al., 2005), após liberados são adsorvidos pelos eritrócitos do hospedeiro, e quando a IgG ou a IgM reagem com esse complexo ativam o sistema complemento induzindo a hemólise intra e extravascular, resultando em anemia (DEL PIERO, 2008).

O EIAV é o único representante do grupo dos lentivirus que causa uma febre aguda inicial associada a viremia, seguida por ciclos recorrentes da doença e, posteriormente, um período assintomático prolongado (COOK et al., 1996).

A doença se manifesta clinicamente de diferentes formas, sendo dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente (Figura 2), é possível a reversão de uma fase a outra, a qualquer instante. Os sintomas variam de acordo com a virulência da estirpe infectante, da quantidade de vírus que é transmitida e de acordo com o sistema imune do hospedeiro. Os sintomas principais relatados na fase aguda são febre intermitente (39 - 41°C), anorexia, fraqueza, anemia, e a morte pode ocorrer entre o 10º e 30º dia após o início dos sintomas. Ainda na forma aguda da doença, os animais jovens podem apresentar forte prostração e andar cambaleante. Por causa da anemia pode-se notar palidez de mucosas e hemorragias petequiais, ou ainda icterícia e edema nas partes baixas do corpo (COOK et al., 1996).

Após a fase aguda o animal entra na fase crônica, essa fase é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia, anemia, perda de peso edema, trombocitopenia e sinais clínicos neurológicos (raramente), caso o animal sobreviva, os episódios diminuem a frequência e intensidade progressivamente, por aproximadamente 1 ano, entrando o animal na fase inaparente, onde não são observamos sintomas e a viremia não é detectada (ISSEL E COGGINS 1979; MONTELARO et al., 1993; ISSEL et al., 2014). Quando submetido a condições de estresse intenso, o animal pode voltar a apresentar a forma aguda da doença, podendo provocar a morte do animal. Os períodos de melhora do quadro clínico e recaídas podem se prolongar por muito tempo, ou mesmo os casos crônicos serem assintomáticos, transformando o cavalo em portador inaparente sem qualquer sinal da doença, mais de 90% dos casos são de portadores inaparentes, esses são as principais fontes de infecção para perpetuação da doença (MONTELARO et al., 1993; COOK et al., 1996).

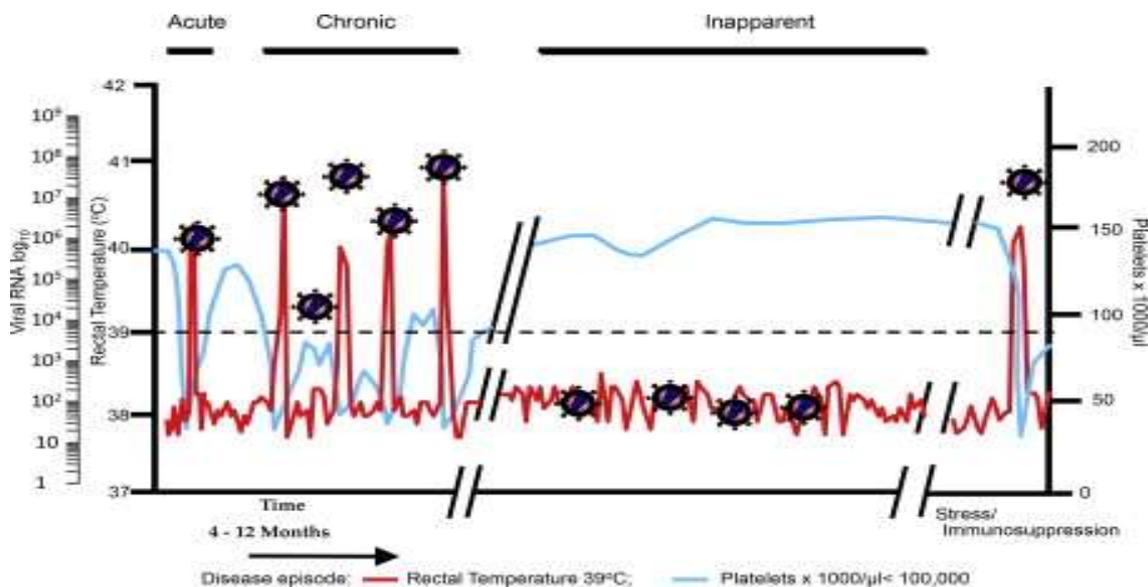


Figura 2- Representação esquemática do curso clínico da AIE correlacionando a temperatura corporal, contagem de plaquetas e número de cópias de RNA viral no plasma durante as fases da doença. Episódio febril é considerado quando temperatura retal está acima de 39°C; trombocitopenia é definida como contagens de plaquetas abaixo de 105.000/ μL de sangue e viremia caracteriza-se pela quantidade de 105 cópias de RNA de EIAV/ mL de plasma. Fonte: ISSEL et al. (2014, p.567).

3.1.5. Diagnóstico e controle

Antes do desenvolvimento do teste de IDGA para AIE na década de 70, o diagnóstico dessa doença era realizado através da inoculação de sangue de um animal suspeito em equinos sabidamente sadios, seguido por um período de observação do surgimento de sinais clínicos característicos. Devido ao elevado grau de dificuldades para realização deste teste muitos outros testes foram desenvolvidos para diagnosticar a AIE tais como, inibição da hemaglutinação, fixação de complemento, imunofluorescência, IDGA, soroneutralização, ELISA, Western blot e reação em cadeia da polimerase (PCR) (OLIVEIRA, 2011).

A AIE é uma doença sem cura, não possui tratamento ou vacina eficaz, sendo seu controle feito pela identificação, segregação e eutanásia dos animais soro positivos para o EIAV. O teste diagnóstico oficial adotado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e pelo MAPA é a IDGA (BRASIL, 2014; OIE, 2008). Além desse o MAPA assim como a USDA (United States Department of Agriculture) dos Estados Unidos aprovou o uso de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), por apresentar maior sensibilidade, como método de triagem, logo, animais que obtiverem resultado positivo no ELISA deverão ter resultado confirmado através da IDGA (ISSEL & COOK, 1993; BRASIL, 2014).

3.1.5.1. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

Descrito pela primeira vez na década de 70 pelos pesquisadores Coggins e Norcross, o teste de IDGA utiliza a proteína p26 do core viral para o diagnóstico da AIE. O teste consiste em migração simultânea do antígeno e do anticorpo em sentido convergente em ágar gel formando complexos antígeno anticorpo insolúveis que precipitam formando uma linha visível (Figura 3).

A IDGA é considerada prova padrão-ouro para o diagnóstico da AIE pela OIE (PIZA et al, 2007), bem como pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo sua aplicação restrita a laboratórios credenciados pelo MAPA (BRASIL, 2008).



Figura 3 - IDGA demonstrando as linhas de precipitação formadas entre Ag p26 e anticorpos anti-EIAV. Fonte: Arquivo pessoal

O teste de IDGA possui uma alta especificidade, sendo o resultado positivo muito confiável e confirmatório de infecção pelo EIAV no equideo. O tempo para soroconversão em equinos é de, aproximadamente, 12 dias pós-infecção. Porém, apenas entre o 15º - 25º dia pós-infecção que a titulação de anticorpos atinge o limiar mínimo de detecção do teste de IDGA (COOK et al., 2013).

Essa técnica possui algumas limitações como, por exemplo, uma alta subjetividade, devido a análise dos resultados depender da interpretação visual de uma linha de precipitação formada pelo complexo antígeno (p26)-anticorpo que nem sempre é de fácil visualização, pois a baixa sensibilidade desse teste faz com que amostras com baixos títulos de anticorpos apresentem linhas de precipitações fracas, favorecendo a ocorrência de falsos negativos. Na região Nordeste do Brasil o número de asininos é expressivo, o controle da AIE baseado no diagnóstico pela IDGA pode ser

comprometido, visto que esses animais apresentam viremia baixa consequentemente o título de anticorpos também.

3.1.5.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA é um teste sorológico que já é usado como teste auxiliar para o diagnóstico da AIE em alguns países, como o Brasil. Ele apresenta uma boa correlação com o teste de IDGA e uma maior sensibilidade, sendo utilizado como teste de triagem, pois detecta um maior número de animais positivos em fase inicial da infecção (Susuki et al., 1982; Shane et al., 1984; Shen et al., 1984; Lew et al., 1993; Soutullo et al., 2001; citados por: OLIVEIRA, 2011). O ELISA apresenta a vantagem de ter uma menor subjetividade na leitura dos resultados, pois utiliza espectrofotômetro. Sua limitação está na maior ocorrência de falsos positivos, sendo necessário a confirmação do diagnóstico através da IDGA (OIE, 2008).

3.1.5.3. Imunoblot (WESTERN BLOT)

É uma técnica sorológica sensível e detecta, simultaneamente, reação de anticorpos anti- p26, anti- gp90 e anti- gp45 com as respectivas proteínas virais (ISSEL et al., 1999). Não é uma técnica disponível comercialmente, porém é utilizada em estudos para elucidar resultados conflitantes entre o ELISA e a IDGA.

3.1.5.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O ELISA e a IDGA são os testes preconizados pelas autoridades competentes para o diagnóstico da AIE, porém os resultados conflitantes entre eles são comuns, desta forma, para confirmação do resultado, faz - se uso de técnicas mais específicas e sensíveis, como a PCR.

Diferente das provas sorológicas a PCR é capaz de identificar equídeos em estágio subclínico, e potros com anticorpos colostrais anti-EIAV, pois identifica a presença do patógeno (SANTOS et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve aprovação do CEUA-UFERSA (COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS), sob o número 23091.004349/2014-58, validade dezembro de 2016, para sua realização.

4.1. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS TESTES LABORATORIAIS

- ✓ Laboratório Interdisciplinar do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).
- ✓ Laboratório de Retrovíruses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

4.2. COLETA DE MATERIAL

4.2.1. Local de obtenção das amostras

O trabalho foi conduzido em uma propriedade rural no município de Apodi-RN, no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015. Os animais submetidos a este estudo foram equídeos errantes, recolhidos pela Polícia Rodoviária Federal das estradas e interiores do Rio Grande do Norte. Um total de 386 asininos e 23 equinos foram submetidos a este estudo, nenhum desses animais possuía histórico clínico. Foram coletadas amostras de sangue de cada animal em tubos vacutainer com e sem anticoagulante.

4.2.2. Técnica de coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas, após antissepsia com álcool 70% na região da jugular dos equídeos, por punção venosa em tubos com EDTA para a obtenção de plasma e leucócitos e em tubos sem anticoagulante para a obtenção de soro. A separação foi feita por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, em seguida alíquotas do soro foram armazenadas em freezer -20° C para serem utilizadas nos testes sorológicos, assim como o plasma sanguíneo foi armazenado a -80°C para a pesquisa de RNA viral.

4.3. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

4.3.1. ELISA Pgp45

O ELISA indireto foi realizado segundo protocolo estabelecido pelo laboratório de retrovirose da UFMG (RETROLAB). Resumidamente, o antígeno pg45 é um peptídeo sintético produzido através das sequências de aminoácidos env do EIAV, sintetizadas numa membrana de celulose utilizando o equipamento Abimed Spot Synthesis - ASP222, Langenfeld - Alemanha. O plano de distribuição de aminoácidos, bem como a determinação de protocolos para síntese de peptídeos nas membranas, foi estabelecido através de bioinformática utilizando o programa Multipeps (Intavis, Alemanha). Posteriormente, diluiu-se o antígeno sintético para uma concentração final de 0,5 µg/100µL em tampão carbonato de sódio 0,05 mol/L, pH 9,6, com distribuição de 100 µL/poço dessa solução em placas de 96 poços (NUNC Maxisorp™, Thermo Scientific, EUA) seguindo-se de incubação por 18 h à 4°C. Após a etapa de adsorção, as placas foram lavadas duas vezes com salina tampão fosfato (pH 7,2) contendo 0.05% de Tween 20 (PBST), incubado por 1h à temperatura ambiente (ta) com PBST, contendo 5% de leite em pó desnatado como proteína inibidora de reações inespecíficas e lavado em seguida mais duas vezes com PBST antes do uso. As amostras de soro de jumentos foram diluídas 1:50 em PBST contendo 1% de leite em pó desnatado foram adicionadas (100 µL/poço) nas placas sensibilizadas com o antígeno pgp45 e incubadas por 1h a (ta) antes de serem lavadas três vezes com PBST e, subsequente adição de conjugado de coelho anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:5.000 em PBST contendo 1% de leite em pó desnatado. Após 1 h de incubação à (ta), as placas foram lavadas três vezes em PBST e a ligação de anticorpos foi detectada pela adição (100 µL/poço) de substrato que consistia na solução de o-phenylenediamine (0.5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (concentração final 0.02%) em tampão fosfato-citrato (pH 5). A reação ocorreu por 10 minutos até que a mesma foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 3 N (40 µL/poço). A densidade ótica à 492 nm (OD_{492nm}) foi avaliada no espectrofotômetro TP-Reader (Thermo Plate, China). OD acima de 0,251 foi considerado positivo.

4.3.2. IDGA

Todas as amostras de soro dos equídeos foram submetidas ao teste oficial para diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina, a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), segundo Coggins e Norcross (1970). Seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante.

A solução de ágar Noble 1% em Tampão Borato foi preparada em microondas e distribuída (4,5ml) em lâmina de microscopia (25x75mm), quando esta atingia a

temperatura de 45°C. Após sua solidificação o ágar foi perfurado com um furador que contém um orifício central e seis periféricos medindo 4mm de diâmetro e 3mm de distância entre os mesmos. As lâminas prontas foram armazenadas em câmaras úmidas com solução de azida sódica 1% e mantidas a temperatura ambiente. Os soros a serem testados foram colocados (25µL) intervalados com soros controles positivos nos orifícios periféricos. O antígeno foi colocado no orifício central (Figura 4). As lâminas foram incubadas em câmara úmida, em temperatura entre 20 e 15°C, por 48 horas e lidas a olho nu 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. Foi utilizada uma fonte de luz indireta ajustável para verificar a intensidade e posição sob o fundo escuro.

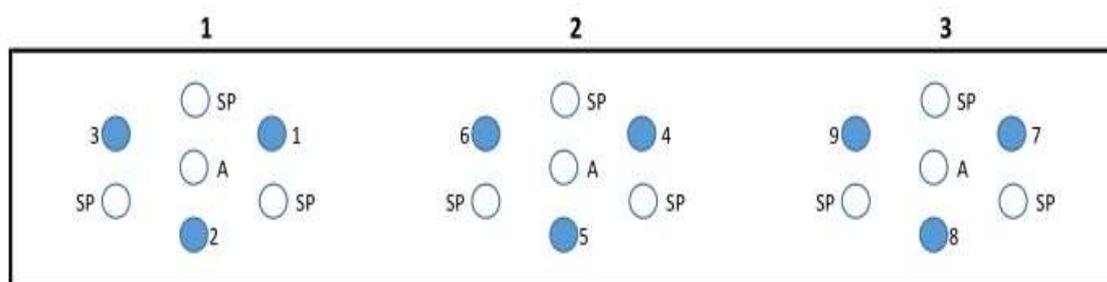


Figura 4 -- Representação da lâmina de IDGA demonstrando orifício central para o antígeno (A) e orifícios periféricos alternando entre amostras e o soro padrão. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.2.1. Critérios para interpretação da IDGA

O sistema de leitura recomendado pelo NVSL (National Veterinary Services Laboratories) (2008) foi adotado para leitura e interpretação das linhas de precipitação na prova de IDGA.

Os resultados foram registrados na ficha de leitura, segundo Figura 5, utilizaram-se as seguintes notações: “+” = reação positiva, “-” = reação negativa, “I” = resultados inconclusivos e “NSL” = linhas não específicas, do inglês nonspecific line. Os resultados positivos foram reportados de acordo com a intensidade da linha de precipitação formada utilizando uma escala numérica: “+5” = reação muito forte positiva, “+4” = reação forte positiva; “+3” = reação positiva, “+2” = reação positiva, “+1” = reação fraca positiva e, “vw” = reação muito fraca positiva, do inglês very weak positive (NVSL, 2008).

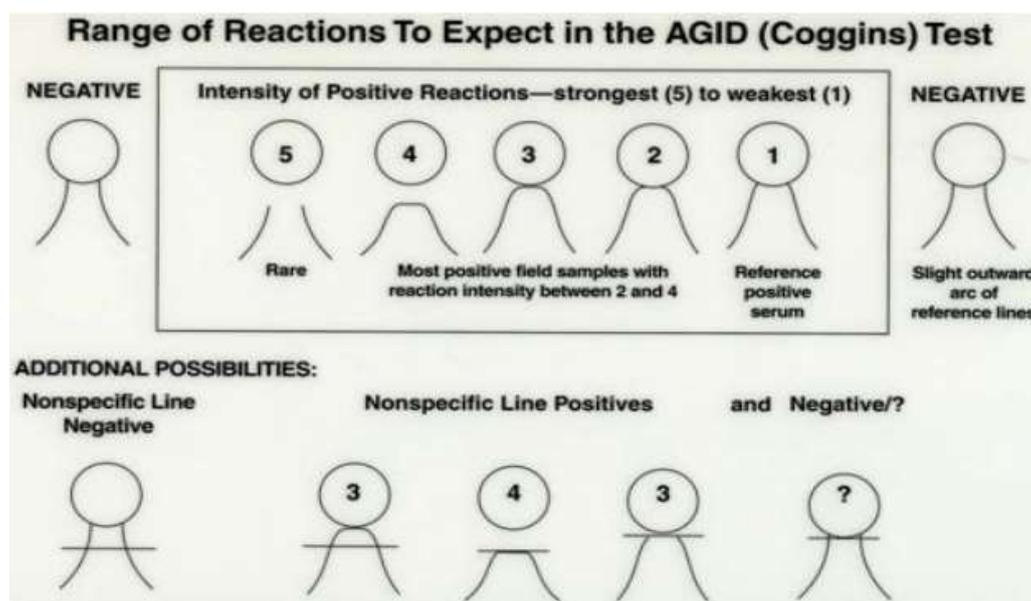


Figura 5 - Série de reações esperadas na IDGA e exemplos de linhas inespecíficas. Fonte: (disponível em <http://dept.ca.uky.edu/eia/documents/160.pdf>).

4.3.3. IMUNOBLOT

As membranas de imunoblot foram gentilmente cedidas pelo professor Chales J. Issel (Gluck Center, Universty of Kentucky, KY, EUA), sendo preparadas conforme descrito previamente (Issel, et al., 1993). O protocolo usado para o IB também foi seguido conforme descrito previamente (Issel et al., 2012), com exceção de que todas as amostras de soro testadas foram diluídas 1:20 e o conjugado de coelho anti- IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA) foi usado na diluição de 1:5000, ambos com volume final de 1 mL. Resumidamente, as membranas de imunoblot foram bloqueadas em tampão salina fosfato (PBS) (pH 7.2) contendo 5% de leite desnatado, por 1 h à ta e sob agitação. Então a membrana foi cortada em tiras de 4 mm de largura, para serem utilizadas individualmente por amostra e controle, sendo incubadas com as amostras de soro diluídos 1:20, por 1 h à ta, sob agitação, seguido por 4 lavagens com PBS saturado com 0.85 M de NaCl e acrescido de 0,05% de Tween 20 e subsequente adição de conjugado de coelho anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:1500 em PBS contendo 1% de leite em pó desnatado. Após 1h de incubação à ta, sob agitação, as membranas foram lavadas em PBS saturado com 0.85 M de NaCl acrescido de 0,05% de Tween 20, por 10 minutos, sob agitação, seguido de 10 minutos de lavagem com PBS saturado com 0.85 M NaCl, sob agitação e última lavagem com PBS por 10 minutos, à ta sob agitação. A ligação de anticorpos foi

detectada pela adição de substrato 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine – TMB (Promega Corporation, EUA), por 5 minutos, parando a reação com água destilada, após retirar o substrato. As amostras foram consideradas positivas no imunoblot quando os anticorpos se ligaram em pelo menos duas das três principais proteínas do EIAV (p26, gp45 e/ou 29 gp90) (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013).

4.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Amostras de PBMC foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando o kit QIAmp DNA (Qiagen) conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA foram submetidas a quantificação, realizada por comparação com o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose a 1%.

Durante o período de coletas o equino C4 FAS foi eutanasiado, sendo realizada coleta de fragmentos de tecidos dos seguintes órgãos, baço, fígado, pulmão, rim e testículo. Dos tecidos foi realizada a extração de RNA utilizando o kit QIAmp RNA (Qiagen), o RNA obtido foi transcrito em cDNA utilizando o kit QIAGEN OneStep RT-PCR segundo recomendações do fabricante.

4.4.1. Nested PCR

Os três asininos com sorologia positiva para AIE tiveram seu sangue total colhido em EDTA para separação da camada leucocitária (*buffy coat*) para detecção de DNA proviral do EIAV por nested PCR, usando os iniciadores para regiões LTR e *gag*, conforme relacionado no Tabela 2. As amostras de DNA extraídas foram estocadas em tubos plásticos de 1,5 mL, livres de RNases e DNases, identificados e congelados a -20°C até os procedimentos.

Tabela 2 Sequência de iniciadores para as regiões genicas utilizados neste estudo de acordo com o marcador e condições de ciclo utilizados

Marcador	Sequência	Ciclos	Referência
Gag 1ª reação	5' GACATGGAGCAAAGCGCTCA ^{3'} 5' CTGCCAGGCACCACATCTA ^{3'}	94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C, 20s; 62°C, 30s; 72°C, 30s, finalizando com 72°C, 10 min.	Cappelli et al., 2011
Gag 2ª reação	5' TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG ^{3'} 5' TTTCTGTTTCCAGCCCCATC ^{3'}	94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C, 20s; 62°C, 30s; 72°C, 30s, finalizando com 72°C, 10 min.	Cappelli et al., 2011
LTR-Tat 1ª reação	5' GACAGTTGGGCACTCAGATT ^{3'} 5' CAGGAACACCTCCAGAAGAC ^{3'}	94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C, 20s; 62°C, 30s; 72°C, 30s, finalizando com 72°C, 10 min.	Dong et al., 2012
LTR-Tat 2ª reação	5' ATTCTGCGGTCTGAGTCCCT ^{3'} 5' TAAGTTCTCCTCTGCTGTCC ^{3'}	94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C, 20s; 62°C, 30s; 72°C, 30s, finalizando com 72°C, 10 min.	Dong et al., 2012

4.4.2. Visualização do produto das ampliações

Os produtos da PCR foram visualizados após separação eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (40mM de Tris, 20mM de ácido acético e 1mM de EDTA) corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

Os produtos amplificados foram migrados juntamente com um marcador indicativo do número de pares de base (Low DNA Mass - 100 bp ladder, Invitrogen), e controles negativo (CN) e positivo (CP) de extração durante aproximadamente 30 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 100V e 400mA, respectivamente. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de 313 pb (*gag* Cappelli) e 200 pb (LTR- Dong).

4.5. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

A reação de sequenciamento de DNA foi composta de 4 µl de *BigDye 3.1*® (Applied Biosystems®), 4 µl de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems®), 4 pmol de cada iniciador senso e antiseno referente a cada produto de PCR em reações separadas e 20 ng de DNA alvo para uma reação final de 20 µl, seguindo para o termociclador PTC-200 (MJ Research™) para 35 ciclos de 96° C/30 seg., 50°C/15 seg e 60°C/4 min, com rampa de 0,7°C/seg entre cada temperatura.

A precipitação foi realizada a temperatura ambiente com 80 µl de propanol a 75%, incubando-se durante 30 min, seguido de centrifugação a 20.000 x g por 25 min, removeu-se o sobrenadante e foram adicionados 300 µl de etanol a 70%, centrifugou-se

a 20.000 x g por 15 min e o precipitado foi seco a 95° C por 5 min, as amostras foram levadas ao sequenciador ABI-377® (Applied Biosystems).

O sequenciamento ocorreu através da eletroforese por capilaridade no sequenciador automático. Os fragmentos de DNA marcados foram separados de acordo com seus tamanhos e detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda. A interpretação foi feita pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao terem passado pela região de leitura ótica do sequenciador.

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo *Phred* online (EMBRAPA, 2006) para avaliação da qualidade, sendo utilizadas as posições que apresentaram nt com índice *Phred* maior que 20. Os Cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa Finch TV © (Geospiza) para a busca de erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas.

A sequência consenso final de cada amostra foi obtida a partir das sequências senso e o reverso-complemento da antisenso de cada amostra alinhadas pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), submetida ao BLASTn em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> para confirmação do sequenciamento juntamente com as sequências homólogas referentes aos genes *gag* e LTR do EIAV obtidas no GenBank. A árvore filogenética foi obtida utilizando o critério de otimização de distâncias, com o algoritmo Neighbor-Joining com modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood 1000 repetições de bootstrap com o programa MEGA 6. Os números de acesso ao Genbank encontram-se na figura da árvore filogenética.

4.6. ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir dos testes diagnósticos aplicados foram comparados através do teste do índice Kappa, utilizando-se o programa SPSS, que estabelece o índice de concordância entre as técnicas. A concordância é classificada e denominada de acordo com Landis e Koch (1977): valores do índice Kappa < 0 = nenhuma concordância; valores entre 0 – 0.19 = baixa concordância; valores entre 0.20 – 0.39 = regular concordância; valores entre 0.40 – 0.59 = moderada concordância; valores entre 0.60 – 0.79 = substancial concordância; valores entre 0.80 – 1.00 = alta concordância.

5. RESULTADOS

Foram coletadas 386 amostras de soro e *buffy coat* de asininos e 23 amostras de soro e *buffy coat* de equinos que viviam livres próximos a rodovias da região Semiárida do Rio Grande do Norte (RN). Com exceção de um equino, os animais não apresentavam sinais clínicos evidentes de doença. Todas as amostras foram submetidas aos testes de ELISA pgp45 e IDGA para a pesquisa de anticorpos anti-EIAV, sendo que, dessas amostras, apenas uma foi positiva em ambos os testes.

Depois dos primeiros testes, as amostras que apresentaram resultados conflitantes entre o IDGA e o ELISA pgp45, foram também testadas na técnica de nPCR para as regiões *gag* e LTR do EIAV. Das três amostras com sorologia conflitante duas apresentaram resultado positivo para a presença de vírus na técnica de nPCR. A Tabela 3 mostra os resultados dos testes aos quais foram submetidas as amostras que obtiveram pelo menos um resultado positivo em um dos testes sorológicos.

Tabela 3 - Resultados dos testes sorológicos e molecular.

Espécie	Identificação do animal	IDGA	ELISA pgp45	Nested PCR gag	Nested PCR LTR	Imunoblot
<i>Equus asinus</i>	7	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
<i>Equus asinus</i>	122B	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
<i>Equus asinus</i>	156R	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
<i>Equus caballus</i>	C4 FAZ	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

A partir da comparação entre os resultados gerados na IDGA e no ELISA Pgp45 pode-se considerar uma concordância razoável (Kappa de 0,396) entre as técnicas sorológicas. Quando comparadas a técnica de nPCR com as técnicas de IDGA e ELISA Pgp45 observamos índices Kappas iguais a 0,799 e 0,664, respectivamente, o que significa que as concordâncias entre a técnica molecular e as técnicas sorológicas são substanciais.

A amostra 156R foi positiva no ELISA, porém não foi detectado o EIAV na prova molecular e foi IDGA negativo, sendo considerada amostra negativa.

O equino C4 FAS veio a óbito no período das coletas, sendo possível a realização de necropsia, onde coletamos tecido do baço, pulmão, fígado, rim e

testículos. Todas as amostras de tecidos foram positivas para os genes gag e LTR, porém só conseguimos matéria viável para sequenciar do baço e do pulmão.

Os amplicons gerados por nPCR a partir das amostras dos asininos 07 e 122b e do equino C4FAS foram submetidos ao sequenciamento. Não obtivemos sequências viáveis das amostras de LTR dos asininos positivos. Utilizando o BLAST, foi confirmado que as amostras de gag e LTR do cavalo C4 FAS apresentavam identidade significativa com as sequências publicadas anteriormente no GenBank. No BLAST feito com as amostras de gag dos asininos positivos não encontramos identidade com outras estirpes de EIAV, mas ambas alinharam com sequências de hospedeiros, incluindo genoma de equino.

Uma sequência parcial de gag medindo 313 nucleotídeos de comprimento (incluindo lacunas e excluindo as regiões do iniciador), foi comparada com sequências de EIAV publicadas no GenBank. Os números de acessos das estirpes utilizadas são os seguintes: L06609.1, AF172127.1, AY742243.1 (WSU5); M87581.1, AF170360.1, AF170363.1 (WY); AF170895.1, AF170898.1, AF170900.1, AF170364.1 (TX); AF172101.1, AF172099.1 (ID); AB008197.1, AB008196.1 (Japão); EF418581.1 (Argentina); EF418583.1, EF418575.1, EF418578.1, AF330039.1 (Canadá); GU385359.1, GU385355.1, AF327877.1 (Ásia); HM177436.1, GU060664.1, GQ229581.1, HM177435.1, GQ265785.1, HM177437.1, EU375543.1, GQ927487.1 (Europa).

Ao realizarmos a análise filogenética, levando em consideração as amostras estudadas obtivemos a seguinte árvore filogenética:

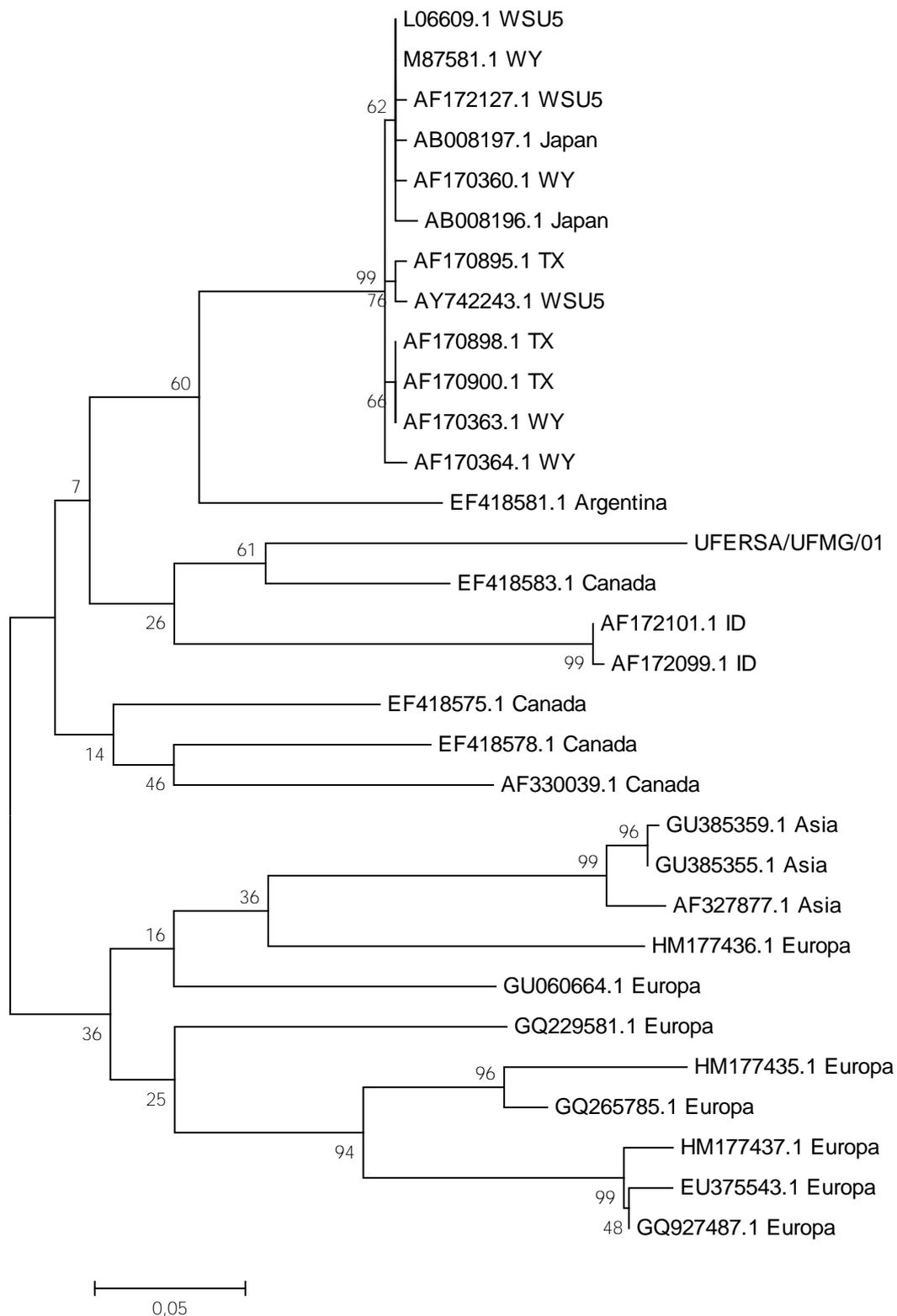


Figura 6 - Árvore filogenética baseada em fragmentos parciais do gene gag da amostra de campo UFERSA/UFMG/01 (equino C4 FAS) e sequencias registradas no GenBank.

6. DISCUSSÃO

Um total de 90% de toda a população de asininos presentes no Brasil estão localizados na região nordeste (MAPA, 2015). Esses animais exerciam grande papel como meios de transporte no estado, porém sua força de trabalho já não é mais requerida como antes, sendo comum sua substituição por máquinas agrícolas e meios de transportes mecanizados. Ante isso, são abandonados por seus tutores e passam a viver e se reproduzir livremente nas encostas das rodovias nordestinas. Por esta razão, foi feita uma pesquisa em buscando a presença do Vírus de Anemia Infecciosa Equina (EIAV) no rebanho de equinos do estado do Rio Grande do Norte.

A maioria dos inquéritos sorológicos para AIE realizados no Brasil, fazem uso apenas do teste de IDGA (BORGES, et al., 2013; FREITAS, et al., 2015), provavelmente pelo fato do uso de ELISAs para o diagnóstico e controle da AIE só terem sido aprovados pelo MAPA em dezembro de 2014 (BRASIL, 2014), e os testes ainda estarem em fase de validação pelos laboratórios oficiais. Em estudo conduzido recentemente por pesquisadores da UFMG em parceria com nosso laboratório, 367 amostras de soro de asininos foram testadas fazendo uso dos testes de IDGA e ELISA rpg90. Foram observadas as taxas de soropositivos de 1,63% no teste de IDGA, e de 3,27% no teste de ELISA rpg90 (OLIVEIRA, 2016). Esses resultados corroboram com estudos realizados na Itália (ISSEL et al., 2012; SCICLUNA et al., 2013), onde o teste de ELISA se mostrou mais sensível.

Devido ao pequeno número de amostras positivas, os dados gerados a partir do teste dos índices Kappa devem ser analisados com parcimônia. Os resultados permitiram sugerir que existe uma concordância razoável entre os testes de ELISA e IDGA, apontando uma maior sensibilidade do ELISA, corroborando com outros relatos encontrados na literatura (ISSEL et al., 2012; REIS et al., 1994). As análises dos resultados obtidos nos testes sorológicos com a nPCR determinaram uma substancial concordância entre os testes, provavelmente, por causa do baixo número de animais infectados. Em outros trabalhos similares com equinos, a nPCR mostrou-se um teste mais sensível e específico do que os sorológicos, pois permitiu a detecção da infecção em equídeos “saudáveis”, nos quais as cargas virais são, geralmente, baixas (NAGARAJAN, 2001; CAPPELLI et al., 2011; SANTOS et al., 2011; DONG et al., 2012; TIGRE et al., 2016).

O estágio da doença não foi determinado no momento da coleta, por isso só podemos sugerir que a amostra do asinino 07 (tabela 3) por ter apresentado IDGA negativo e ELISA e nPCR positivos, pode levantar as seguintes hipóteses: primeiro, o animal se apresentava em estágios iniciais da AIE, com a concentração de anticorpos específicos abaixo do limiar de detecção da IDGA (COOK et al., 2001); segundo, o animal estava infectado com uma variante viral cuja proteína p26 tinha pouca identidade com a usada no teste diagnóstico; ou terceiro, o animal não estava no início da incubação do vírus, mas apresentava baixa viremia.

Dentre as hipóteses que este trabalho levanta, a segunda hipótese pode ser descartada, pois este mesmo animal apresentou resultado positivo ao teste de imunoblot onde foi reconhecida a proteína p26, a mesma proteína viral utilizada no teste de IDGA. Além disso, a região do gene gag responsável pela produção de p26 é uma das partes mais conservadas do genoma viral (ISSEL et al., 2014). Em estudo realizado por Cook e colaboradores (2001), foi constatado que asininos apresentam uma soroconversão tardia (40 dias) e níveis de viremia baixos, o que dificulta a identificação de animais positivos. Animais assim, por vezes apresentam-se como negativos no teste de IDGA, embora positivos em diagnósticos diretos como a PCR e indiretos como o ELISA (ensaio com menor limiar de detecção).

A amostra 156R apresentou apenas ELISA positivo, o que pode ter ocorrido devido a presença de anticorpos para gp45 pela exposição a epítomos de reatividade cruzada, visto que a gp45 é uma glicoproteína comum ao envelope de outros retrovírus, neste caso podendo representar um resultado falso positivo (LANGERMEIER, 1996). Este resultado chama a atenção para a necessidade de diagnóstico específico para pesquisa de AIE em amostras de asininos, pois os animais poderiam estar infectados com amostras tão diferentes que causariam resultados conflitantes mesmo à prova oficial (IDGA com antígeno p26).

A taxa de soropositivos encontrada para os testes adotados neste trabalho foram menores que 1%, isso significa uma baixa quando comparado ao estudo anteriormente realizado nessa mesma região de estudo (OLIVEIRA, 2016). Essa considerável redução deve-se, provavelmente, à seca que ocorreu nos últimos cinco anos, onde muitos animais vieram a óbito devido à escassez de água e comida, diminuindo o número de animais soropositivos do rebanho (FAPESP, 2016).

Diante desse levantamento, foi importante realizar um estudo filogenético para analisar os isolados do gene gag da estirpe caracterizada neste estudo. A análise

filogenética realizada demonstrou que o gene tem origem comum a estirpes provenientes da América do Norte, assim como os achados de Tigre e colaboradores (2016).

Ao compararmos as sequências de gag conseguidas a partir dos tecidos do equino C4FAS com outras sequências disponíveis no Genbank, utilizando a ferramenta BLAST, foi possível observar no isolado do baço do equino positivo para AIE, homologia de 85% e 82% entre as sequências nucleotídicas das estirpes do Canadá (EF418583.1) e de New Hampshire – USA (AB693825.1), respectivamente. Enquanto 82% de identidade nucleotídica foi obtida para o isolado do pulmão deste mesmo animal com o clone da estirpe de Idaho -USA (AF172113.1).

As sequências de LTR do cavalo positivo apresentaram 97% de identidade de nucleotídeo com estirpes caracterizadas na Irlanda. O que corrobora com estudos anteriores que sugeriram que as estirpes do “novo mundo” seriam oriundas da Europa (CAPOMACCIO et al., 2012).

Até a presente data são conhecidas apenas as sequências genômicas de quatro isolados de campo do EIAV: EIAV_{LIA} [China], EIAV_{IRE} [Irlanda], EIAV_{MIY} [Japão], EIAV_{WY} [Estados Unidos] (ISSEL et al., 2014). O Brasil ainda não possui uma sequência completa de um isolado de campo, entretanto no ano passado pesquisadores da Universidade Federal da Bahia registraram uma sequência parcial do gene gag, isolado de amostras de cavalos infectados naturalmente. Este trabalho comparou seus isolados do Estado da Bahia com sequências registradas no Genbank, sugerindo que o EIAV isolado teria origem comum às estirpes WSU5, EIAVUK e Wyoming dos Estados Unidos. De acordo com Capomaccio e colaboradores (2012), que analisaram a filogenia dos isolados do EIAV, o vírus que circula na América do Norte e na do Sul são oriundos da Europa, introduzidos na época que o continente americano foi colonizado.

Os asininos 122b e 07 apresentavam-se hígidos, sem nenhuma sintomatologia característica da doença. Ao analisarmos as sequências de gag obtidas a partir do PBMC, foi constatado que não apresentava homologia com amostras do EIAV caracterizada até o momento. Entretanto, esses dois amplificadores alinharam com sequências disponíveis no Genbank, apresentando similaridade, inclusive, com retrovírus endógenos de hospedeiros (incluindo o de equino). Este resultado sugere que encontramos um possível retrovírus endógeno, algo que poderia explicar o motivo da suposta resistência desses animais ao EIAV, e ressalta a necessidade da

elaboração de um teste diagnóstico específico para os asininos, visto que esse retrovírus endógeno supostamente é capaz de expressar p26 e gp45 fazendo com que esses animais se tornem falsos positivos nos testes adotados atualmente.

Os retrovírus são uma família grande e diversificada de vírus de cadeia simples de sentido positivo de RNA (LAMERE et al., 2009; WANG et al., 2013). A transcrição reversa do genoma retroviral de RNA em DNA é um passo chave no ciclo de replicação retroviral. O DNA resultante é, em seguida, integrado ao genoma do organismo infectado na forma de um pró-vírus (LAMERE et al., 2009). Ocasionalmente, os retrovírus exógenos infectam células germinativas e se integram ao DNA dessas células de tal modo que há mudanças de transmissão viral de horizontal (via infecção) para vertical como uma característica mendeliana (KATZOURAKIS et al., 2005). Retrovírus transmitidos verticalmente são designados retrovírus endógenos (ERVs) (MAYER et al., 2013).

Os ERVs podem representar também infecções retrovirais exógenas antigas, que ocorreram há milhões de anos com o seu homólogo exógeno, sendo extintas na maioria dos casos (MAYER e MESSE, 2005; HEIDMANN et al., 2009; ELLEDER et al., 2012). A minoria de ERVs que permanecem ativos têm sido associados tanto a proteção do hospedeiro contra vírus exógenos quanto a uma variedade de doenças, tais como tumores, doenças neurodegenerativas e imunodeficiências (OLIVEIRA et al., 2006; ISHIDA et al., 2015).

7. CONCLUSÕES

Concluimos que o único equino (C4 FAS) entre os animais positivos estava infectado com o EIAV, apresentando a AIE clássica.

O teste de IDGA, preconizado como prova padrão-ouro classificou como positivo o asinino 122b pelas leis atuais, porém não foi detectado provírus com genoma semelhante aos já caracterizados até hoje para EIAV. Assim, na população estudada, as infecções do equino e dos asininos não têm origem em comum.

Os asininos 122b e 07 estão infectados com uma estirpe do EIAV distintas das já caracterizadas até o presente momento, ou são portadores de um vírus endógeno ainda ativo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ante nossos achados, concluímos que os asininos não são fontes de infecção para AIE nos equinos. Concluímos também que novas investigações são necessárias, principalmente com marcadores moleculares e sorológicos adicionais para elucidar se a IDGA estaria classificando animais não infectados com AIEV como falsos positivos. Outra possibilidade é a de que os animais negativos à IDGA estão infectados com EIAV tão divergente que não apresenta mais epítomos comuns na p26. Neste último caso, seria necessário a inclusão de medidas específicas voltadas para os asininos, essencialmente dos animais errantes, por esses terem pouco contato com equinos no programa de vigilância da AIE.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALMEIDA, G.L.G. Anemia infecciosa eqüina. Boletim de Defesa Sanitária Animal. 1. ed. Brasília: **Ministério da Agricultura**, 1974.v.8, p.61-71.

ALMEIDA, V. M. A. et al . Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 141-148, 2006.

BELSHAN, M. et al. Genetic and biological variation in equine infectious anemia virus Rev correlates with variable stages of clinical disease in an experimentally infected pony. **Virology**, v. 279, n. 1, p. 185-200, 2001.

BITTENCOURT, M. Churrasco, queijo nobre e até ‘jegueterapia’: Nordeste tenta resolver problema dos jumentos soltos nas estradas. **BBC, Brasil. 2016. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/brasil-37478910>. Acesso em: 15 de janeiro de 2017.**

BOLFA, P.F. et al. Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. **Veterinary research**, v. 44, n. 1, p. 113, 2013.

BORGES, A.M.C.M et al. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 76-81, 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 45, de 15 de junho de 2004.** Aprova as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina – AIE. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF 07 jul. 2004. Seção 1, p. 7-9.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 15, de 02 de abril de 2008.** Diário Oficial da União, nº 65, Seção 1, p. 2, 04.04.2008.

BRASIL. **Portaria Nº 378, de 17 de dezembro de 2014.** Anexo – Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de anemia infecciosa equina. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF 19 dez. 2014. Seção 1, p. 136.

CAPOMACCIO, S. et al. Geographic structuring of global EIAV isolates: A single origin for New World strains?. **Virus research**, v. 163, n. 2, p. 656-659, 2012.

CAPOMACCIO, S. et al. Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackelford Banks wild horses. **Veterinary microbiology**, v. 157, n. 3, p. 320-332, 2012.

CAPPELLI, K. et al. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 1, p. 27-33, 2011.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immuno-diffusion reaction in equine infectious anemia. **Cornell Veterinarian**, v. 60, p. 330-335, 1970.

- COOK, R.F.; COOK S.J.; ISSEL, C.J. Infectious diseases of the horse: Equine Infectious anemia. In: MAIR, T.S. and HUTCHINSON R.E. Eq. **Veterinary Journal**. Cambridgeshire, p. 56-70, 2009.
- COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia. In: Studdert, M.J. (Ed.), **Virus Infections of Equines**. Elsevier, Amsterdam, pp. 297–323. 1996.
- COOK, R. F.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. **Veterinary microbiology**, v. 167, n. 1, p. 181-204, 2013.
- COOK, S. J. COOK, R.F., R.C. MONTELARO, ISSEL, C.J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. **Veterinary microbiology**, v. 79, n. 2, p. 93-109, 2001
- CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus (Retroviridae). **Encyclopedia of virology**, v. 2, p. 167-74, 2008.
- DEL PIERO, F. Infectious diseases—part I and II. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians and Proceedings of the 14° Congress of the Società Italiana Veterinari per Equini and Veterinary European Equine Meeting**. 2008. p. 24-41
- DONG, J.B. et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. **Archives of virology**, v. 157, n. 11, p. 2105-2111, 2012.
- DONG, J.B. et al. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 2, p. 360-365, 2013.
- ELLEDER, D. et al. Polymorphic integrations of an endogenous gammaretrovirus in the mule deer genome. **Journal of virology**, v. 86, n. 5, p. 2787-2796, 2012.
- EMBRAPA. Eletroferogram quality analysis. Brasília: EMPRABA, 2006. Disponível em: < <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em: 16 de janeiro de 2017.
- FAPESP. 2016. **Seca no Nordeste já dura 5 anos e pode se tornar ainda mais severa**. Disponível em: < <https://noticias.uol.com.br/meio-ambiente/ultimas-noticias/redacao/2016/09/21/seca-no-nordeste-ja-dura-5-anos-e-podera-se-tornar-mais-severa.htm>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.
- FREITAS, N.F.Q.R. et al. Equine infectious anemia on Marajo Island at the mouth of the Amazon river. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 947-950, 2015.
- HALL, T. A. Bioedit 7.0.9.0: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41.p95-98.1999.
- HEIDMANN, O. et al. Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 107, 2009.

- ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of the American Veterinary Medical Association (USA)**, v.174, n.7, p. 727-733, 1979.
- ISHIDA, Y. et al. Proliferation of endogenous retroviruses in the early stages of a host germ line invasion. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 109-120, 2015.
- ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 1, p. 137-141, 1993.
- ISSEL, C. J. et al. Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it?. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 561-577, 2014.
- ISSEL, C. J. et al. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 11, p. 728-732, 1999.
- ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasties. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 2, p. 513-523, 2015.
- ISSEL, C. J. et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anemia. **Veterinary Record**, v. 172 n.8, p.210, 2012.
- KATZOURAKIS, A.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O.G. The evolutionary dynamics of endogenous retroviruses. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 10, p. 463-468, 2005.
- LANGEMEIER, John 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.
- LAMERE, Sarah A. et al. Molecular characterization of a novel gammaretrovirus in killer whales (*Orcinus orca*). **Journal of virology**, v. 83, n. 24, p. 12956-12967, 2009.
- LEROUX, Caroline; CADORÉ, Jean-Luc; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary Research**, v. 35, p.485-512, 2004.
- LEROUX C, Hammond SA, Singh M, et al. **Recurring nature of equine infectious anemia (EIA) is associated with dynamic evolution in the principal neutralizing domain (PND) of the EIAV surface glycoprotein**. Proceedings of the **8th International Conference on Equine Infectious Diseases**. Newmarket, United Kingdom: R&W Publications (Newmarket) Ltd; 1999. p. 404–5.
- LEW, A.M.; THOMAS, L.M.; HUNTINGTON, P.J. A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus. **Veterinary Microbiology**, v.34, p.1-5, 1993.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), Brasília. 2015. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 21 de novembro de 2016.

MATHEKA, H. D. et al. Purification and characterization of equine infectious anemia virus. **Archives of virology**, v. 51, n. 1-2, p. 107-114, 1976.

MAYER, J. et al. A novel endogenous betaretrovirus group characterized from polar bears (*Ursus maritimus*) and giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). **Virology**, v. 443, n. 1, p. 1-10, 2013.

MAYER, J.; MEESE, E. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. **Cytogenetic and genome research**, v. 110, n. 1-4, p. 448-456, 2005.

MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.). *The retroviridae*. **New York: Plenum Press**, v.2, Cap.5, p.257-359, 1993.

NAGARAJAN, M. M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **Journal of virological methods**, v. 94, n. 1, p. 97-109, 2001.

NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (NVSL). Agar Gel Immunodiffusion (Coggins) Test for Equine Infectious Anemia. Document Number. SOP-EO-0101.02. p.1-17. 2008

OLIVEIRA, F. G. **Validação da imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico da anemia infecciosa equina em equídeos e comparação com o ELISA rgp90 e imunoblot**. 55 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2011.

OLIVEIRA, F. G. **EIAV em asinino: sorologia e resposta celular**. 115 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2016.

OLIVEIRA, N.M.; FARRELL, K. B.; EIDEN, M.V. In vitro characterization of a koala retrovirus. **Journal of virology**, v. 80, n. 6, p. 3104-3107, 2006.

PIZA, A.S.T. et al. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. **Preventive veterinary medicine**, v. 78, n. 3, p. 239-245, 2007.

QUINLIVAN, M. et al. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 3, p. 612-622, 2013.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 2, ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2005. p.346-58.

REIS, J. KP 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.

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

- RICHETER, W. Anemia Infecciosa Equina. In: JOACHIM BEER. **Doença Infecciosa dos Animais Domésticos**. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 1999. p. 211-8.
- SANTOS, E. M. et al. Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p. 296-301, 2011.
- SCICLUNA, M.T. et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia?. **Veterinary microbiology**, v. 165, n. 1, p. 123-134, 2013.
- SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T. C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus research**, v. 32, n. 2, p. 111-138, 1994.
- SHANE, B.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, n.3, p.351-355, 1984.
- SILVA, R. A. M. S.; ABREU, U. G. P.; BARROS, A. T. M. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. **Embrapa Pantanal. Circular Técnica**, 2001.
- SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (SNA). 2014. **Sociedade nacional de agricultura, Ainda pouco valorizada, equideocultura movimenta R\$ 13 bi por ano no Brasil**. Disponível em: <<http://sna.agr.br/ainda-pouco-valorizada-equideocultura-movimenta-r-13-bi-por-ano-no-brasil/>>, Acesso em: 28 de novembro de 2016.
- 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. et al. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. **Veterinary microbiology**, v. 95, n. 1, p. 49-59, 2003.
- SUZUKI, T.; UEDA, S.; SAEJIMA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for 41 diagnosis of equine infectious anemia. **Veterinary Microbiology**, v.7, p. 307-315, 1982.
- TIGRE, D. M.; BRANDÃO, C. F. L.; PAULA, F. L. et al. Characterization of isolates of equine infectious anemia vírus in Brazil. **Archives of virology**, p. 1-5, 2016.
- VARGAS, R. O. (2008). **Anemia infecciosa equina**. Trabalho apresentado para o cumprimento de trabalho de conclusão de curso de especialização Latu sensu em Defesa e Vigilância Sanitária Animal UCB, 1:5–12.
- WANG, L. et al. Ancient invasion of an extinct gammaretrovirus in cetaceans. **Virology**, v. 441, n. 1, p. 66-69, 2013.
- WEILAND, F. et al. Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). **Archives of virology**, v. 55, n. 4, p. 335-340, 1977.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION DATABASE (WAHID). 2016. Glanders. Disponível em: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_immediate_summary&selected_year=2016>. Acesso em: 15 de novembro de 2016.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Equine Infectious Anaemia In: **Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**. Paris: OIE, 2008. Vol.2. Chapter 2.5.6, 866-870.

ZHENG, Y. et al. In vivo dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes: insertions/duplications at the principal neutralizing domain. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 5031-5039, 1997.