



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA NA BAHIA-  
BRASIL**

**Dellane Martins Tigre**

Salvador  
2017

**DELLANE MARTINS TIGRE**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA NA BAHIA- BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia/Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Dr.Gubio Soares Campos  
Co-orientadora: Dra.Silvia Inês Sardi

Salvador  
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Tigre, Dellane Martins  
Diagnóstico e caracterização molecular do vírus da Anemia  
Infecciosa Equina na Bahia, Brasil. / Dellane Martins Tigre. --  
Salvador, 2017.  
75 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Gubio Soares Campos.  
Coorientadora: Profa. Dra. Sílvia Ines Sardi.  
Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia)  
-- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da  
Saúde, 2017.

1. vírus da Anemia Infecciosa Equina. 2. diagnóstico. 3.  
filogenia. I. Campos, Prof. Dr. Gubio Soares. II. Sardi,  
Profa. Dra. Sílvia Ines. III. Título.



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela  
40100-000, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921/3247-6269 - E-mail: [renorbioba@hotmail.com](mailto:renorbioba@hotmail.com)

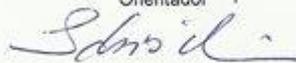
### ATA - DEFESA DE TESE

Aos vinte e sete dias do mês de janeiro do ano de dois mil e dezessete, às quatorze horas, no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, Vale do Canela, S/N, Salvador- BA, reúne-se, em sessão pública, a Banca Examinadora da Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores: Gúbio Soares Campos, orientador, Lília Ferreira de Moura Costa, Josilene Borges Torres Lima Matos, Fabio Alexandre Chinalia e Ana Paula de Oliveira Menezes, perante a qual a Doutoranda Dellane Martins Tigre, aluno regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal Bahia, defendeu, para preenchimento do requisito de Doutor em Biotecnologia, sua tese intitulada: "Diagnóstico e caracterização molecular do Virus da Anemia Infecciosa Equina na Bahia- Brasil". A defesa da referida tese ocorreu, das 14:00 horas às 15:50, tendo o Dellane Martins Tigre sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da Banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o Doutorando APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito APROVADA.

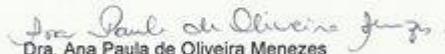
Eu, Gúbio Soares Campos, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Salvador, vinte e sete de janeiro do ano de dois mil e dezessete

  
Dr. Gúbio Soares Campos  
Orientador

  
Dra. Lília Ferreira de Moura Costa  
Banca Examinadora

  
Dr. Fabio Alexandre Chinalia  
Banca Examinadora

  
Dra. Josilene Borges Torres Lima Matos  
Banca Examinadora

  
Dra. Ana Paula de Oliveira Menezes  
Banca Examinadora

  
Dellane Martins Tigre  
Doutorando

Dedico este trabalho a meu pai Decio Sodré Tigre (*in memorium*).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de força e esperança, em muitos momentos O único a quem recorrer, e hoje a agradecer.

A meu marido, Antonio e filhos, Decio e Arthur obrigada pelo companheirismo, pela paciência e por compreender minha ausência.

A minha mãe, Maria das Graças obrigada por ser também mãe de meus filhos e cuidar deles por mim.

A minha co-orientadora, Dra. Silvia Ines Sardi, por estar sempre ao meu lado, no sucesso e no fracasso de cada resultado. Obrigada por cada momento que me fez ver, que eu podia fazer melhor!

A Dr. Gubio Soares Campos pelo total apoio na execução da pesquisa.

A todos os amigos do LabViro, Dra. Fabiana L. de Paula, Ms. Julianna Torres e Ms. André Mendes meus companheiros de todas as horas; aos estudantes de iniciação científica, em especial Ítalo Uzêda, obrigada por trazerem alegria, esperança e muita diversão aos nossos dias no Labviro!

Aos amigos que fiz durante estes muitos anos de ICS: Fulvia, Neila, Maria Clara, Marinho, Anáide, obrigada pelo “Bom dia!” de todos estes anos, pelos sorrisos, pela disponibilidade sem limites.

A Dr. Davi Freitas e toda a equipe da ADAB pelo apoio na coleta de sangue e soro dos animais positivos para AIE.

A Dr. Gustavo Góes e Dra. Andréa Salvador do CCZ-Salvador pelo apoio na coleta de sangue e soro de animais positivos para AIE.

Aos colegas da UESB, professoras Dra. Ana Paula Menezes, Dra. Virginia Góes, Ms. Camila Tolomey e professor Paulo Velasco, pelo apoio e compreensão todos estes anos da pesquisa.

Aos animais, em especial aos equídeos, verdadeiro objetivo desta pesquisa. Obrigada por cooperarem na realização dos experimentos.

TIGRE, Dellane Martins. **Diagnóstico e caracterização genética do vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) na Bahia, Brasil**. 75 f. 2017. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências da Saúde, RENORBIO/Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## RESUMO

O vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, causa uma doença de curso crônico e latente em equídeos. A infecção é limitada a equinos, asininos e muare e caracteriza-se por episódios febris, perda de peso, debilidade progressiva, mucosas ictéricas, edemas subcutâneos e anemia. A AIE não tem tratamento nem vacina eficaz. O diagnóstico clínico é difícil pelo fato que os sinais da doença não são específicos, além disso, após a fase aguda da infecção a maioria dos animais se torna portador assintomático do vírus. Neste estudo nós detectamos e caracterizamos filogeneticamente o vírus isolado na Bahia, Brasil. A partir de amostras de sangue e soro de animais de diferentes municípios do estado utilizamos a técnica de referência pela Organização Mundial para Sanidade Animal (OIE), a prova sorológica de IDGA, e as técnicas moleculares de *nested*-PCR e *nested*-RT-PCR. No total 82 animais foram examinados neste estudo por IDGA e PCR. Primers para o gene gag foram utilizados para amplificar o DNA proviral/RNA do EIAV, nos ensaios de *nested*-PCR e *nested*-RT-PCR respectivamente. Amplicons de 15 amostras positivas por *nested*-PCR foram submetidas ao sequenciamento e análise filogenética. As sequencias de EIAV analisadas neste estudo formam um clado com as cepas WSU5, EIAV<sub>UK</sub> e EIAV<sub>wyoming</sub>, todas dos EUA. 51 amostras (62,2%) foram positivas por *nested*-PCR, enquanto apenas 31 amostras (37,8%) foram positivas por IDGA. No presente estudo utilizando técnicas moleculares foi possível demonstrar que animais portadores assintomáticos do EIAV, com diferentes status sorológico apresentam vírus e/ou DNA proviral detectável por PCR, em PBMC e plasma, demonstrando que o vírus se replica mesmo na presença de mecanismos de defesa imunológicos do hospedeiro, sendo o animal portador assintomático e sorologicamente negativo, importante reservatório do vírus no plantel, e sugerindo que o controle da AIE baseado apenas no IDGA precisa ser revisto pelos órgãos fiscalizadores no Brasil.

**Palavras-chave:** EIAV. PCR. Análise filogenética.

TIGRE, Dellane Martins. **Diagnosis and genetic characterization of the equine infectious anemia virus (EIAV) in Bahia, Brazil.** 75 f. 2017. Thesis (Doctorate degree) Instituto de Ciências da Saúde, RENORBIO/Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

### ABSTRACT

The Equine Infectious Anemia Virus (EIAV), a member of the family *Retroviridae*, genus *Lentivirus*, causes a disease of chronic and latent course in equidae. Infection is limited to horses, asinines and mules and is characterized by febrile episodes, weight loss, progressive weakness, icteric mucous, subcutaneous edema and anemia. The equine infectious anemia (EIA) has no effective treatment or vaccine. The clinical diagnosis is difficult due to the fact that the signs of the disease are not specific; moreover, after the acute phase of infection, most animals become asymptomatic carriers of the virus. In this study we detected and characterized phylogenetically the virus isolated in Bahia, Brazil. We used the reference technique from the World Organization for Animal Health (OIE), the serological test of AGID, and the molecular techniques of *nested*-PCR and *nested*-RT-PCR from blood and serum samples from different municipalities of the state. In total, 82 animals were examined in this study by AGID and PCR. Primers for the *gag* gene were used to amplify the EIAV proviral DNA/RNA in the *nested*-PCR and *nested*-RT-PCR assays, respectively. Amplicons of 15 samples positive by *nested*-PCR were submitted to sequencing and phylogenetic analysis. The EIAV sequences analyzed in this study form a clade with strains WSU5, EIAV<sub>UK</sub> and EIAV<sub>wyoming</sub>, all from the USA. 51 samples (62.2%) were positive by *nested*-PCR, whereas only 31 samples (37.8%) were positive by AGID. In the present study using molecular techniques, it was possible to demonstrate that asymptomatic carriers of EIAV, with different serological status, have virus and/or DNA proviral detectable by PCR, in PBMC and plasma, demonstrating that the virus replicates even in the presence of immunological defense mechanisms of the host, being the asymptomatic and serologically negative carrier animal, an important reservoir of the virus in the establishment, and suggesting that the control of the EIA based only on the AGID test needs to be reviewed by the inspection agencies in Brazil.

**Keywords:** EIAV. PCR. Phylogenetic analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Filogenia dos Lentivirus mostrando cinco grupos filogenéticos.....	17
<b>Figura 2.</b>	Desenho esquemático da estrutura do EIAV mostrando a identificação e a localização das proteínas estruturais.....	18
<b>Figura 3.</b>	Organização genômica do EIAV. (A) Regiões codificadoras do genoma viral. (B) Produtos proteicos e suas respectivas ORFs no genoma viral.....	21
<b>Figura 4.</b>	Visão esquemática do ciclo de replicação dos retrovírus.....	23
<b>Figura 5.</b>	Cinética da infecção por EIAV em animais experimentalmente infectados.....	29
<b>MANUSCRITO 2</b>		
<b>Figure 1.</b>	Phylogenetic tree based on a partial fragment of the <i>gag</i> gene. GenBank accession numbers and strain designations are shown.....	72

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO 1

<b>Table 1.</b>	Comparison of results obtained using the nested-RT-PCR and AGIDT in serum samples.....	65
<b>Table 2.</b>	Comparison of results obtained by virus detected in PBMC and serology.....	66

### MANUSCRITO 2

<b>Table 1.</b>	Comparison of agar gel immunodiffusion (AGID) and nested PCR test results for the detection of EIAV-infected equids.....	70
<b>Table 2.</b>	Results of nested PCR performed on MDM and AGID from 15 animals infected with EIAV.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAB	Agencia de Defesa Agropecuária da Bahia
AIE	<i>Equine Infectious Anemia</i> (Anemia Infecciosa Equina)
APO $\beta$ EC-3	Apopoliproteína beta
CA	Proteína da cápside
CAEV	<i>Caprine Arthritis-encephalitis virus</i> (Vírus da Artrite encefalite caprina)
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> (Linfócitos T Citotóxicos)
DU	Gene dUTPase
EIAV	<i>Equine Infectious Anemia Virus</i> (Vírus da Anemia Infecciosa Equina)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Teste de imunoabsorbância ligado à enzima)
ELR-1	<i>Equine Lentivirus Receptor-1</i> (Receptor de Lentivirus Equino-1)
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i> (Virus da Imunodeficiência Humana)
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IN	Proteína Integrase
IP	<i>Interferon gamma induced protein</i> (proteína indutora de interferon gama)
LTR	<i>Long terminal repeat</i> (regiões terminais repetitivas)
MA	Proteína da matriz
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (proteína quimiotática de monócitos)
MDM	Macrófagos derivados de monócitos
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein 1</i> (Proteínas inflamatórias de macrófagos)
MVV	<i>Maedi-Visna Virus</i> (Virus Maedi-Visna)
NU	Proteína do Nucleocapsídeo
OIE	World Organization for Animal Health (Organização Mundial para Sanidade Animal)
ORF	<i>Open Reading Frames</i> (Região Aberta de Leitura)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PNSE	Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
PR	Protease
rp	<i>Recombinant protein</i> (proteína recombinante)
RT	<i>Reverse transcriptase</i> (Transcriptase reversa)
RT-PCR	<i>Reverse transcription-PCR</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência símia)
SU	Proteína da Superfície
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TM	Proteína Transmembrana
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
WB	<i>Western-blotting</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	HISTÓRICO.....	15
2.2	VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA.....	15
2.2.1	<b>Classificação</b> .....	15
2.2.2	<b>Características morfológicas</b> .....	17
2.2.3	<b>Genoma do EIAV</b> .....	18
2.2.4	<b>Ciclo de replicação viral</b> .....	21
2.2.5	<b>Células hospedeiras do vírus</b> .....	23
2.2.6	<b>Restrição da replicação</b> .....	24
2.2.7	<b>Variação genética e antigênica</b> .....	24
2.2.8	<b>Estudo filodinâmico</b> .....	26
2.2.9	<b>Patogênese</b> .....	27
2.2.10	<b>Aspectos clínicos e patológicos</b> .....	27
2.2.11	<b>Transmissão</b> .....	29
2.2.12	<b>Aspectos imunológicos</b> .....	31
2.3	<b>DIAGNÓSTICO</b> .....	33
2.3.1	<b>Clínico</b> .....	33
2.3.2	<b>Laboratorial</b> .....	33
2.3.2.1	Isolamento viral.....	33
2.3.2.2	Detecção sorológica do vírus.....	34
	A) Imunodifusão em gel de Agarose (IDGA).....	34
	B) <i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> .....	35
	C) Sistema de tripla-triagem ( <i>Three-tired diagnostic system</i> ).....	36
2.3.2.3	Detecção molecular do EIAV.....	36
	A) Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	36
2.4	<b>CONTROLE E PROFILAXIA</b> .....	38
2.5	<b>EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA NO BRASIL E NO MUNDO</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	52
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	52
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	52
4	<b>MANUSCRITO 1</b> The use of agar gel immunodiffusion test to diagnosis of equine infectious anemia virus (EIAV) and its effectiveness for controlling the disease in Brazil.....	54
5	<b>MANUSCRITO 2</b> Characterization of isolates of Equine infectious anemia virus in Brazil.....	68
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	74

# 1 INTRODUÇÃO

A Anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença infecciosa grave que acomete os animais da Família *Equidae*. A doença é causada pelo vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. Neste gênero estão classificados outros importantes patógenos dos animais e do homem causadores de doenças crônicas e persistentes; entre eles o vírus da Artrite-encefalite caprina (CAEV), o vírus Maedi-Visna, o vírus da Imunodeficiência bovina (BIV), o vírus da Imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da Imunodeficiência humana (HIV) (LEROUX *et al.*, 2004).

A infecção é limitada a equinos, asininos e muare e caracteriza-se por episódios febris recorrentes, trombocitopenia, anemia, perda de peso e edemas subcutâneos. A doença apresenta três estágios clínicos distintos, a fase aguda (primeiro episódio da doença), a fase crônica (múltiplos e sequenciais episódios da doença) e a fase inaparente, quando o animal se torna portador assintomático da infecção (ISSEL *et al.*, 2014).

O EIAV é transmitido principalmente através do sangue de animais infectados e uma das vias de penetração do vírus é através da picada de insetos hematófagos, como os tabanídeos (*Tabanus sp*; *Hybomitra spp*) e as moscas do estabulo (*Stomoxys spp*) que servem de vetores mecânicos, devido a permanência do vírus no aparelho bucal dos insetos (Hawkins *et al.*, 1976; Williams *et al.*, 1981; Foil *et al.*, 1983).

A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é o teste oficial indicado pela Organização mundial para sanidade animal (OIE) para o diagnóstico sorológico da AIE em todo o mundo (OIE, 2013). A IDGA ou teste de Coggins (COGGINS & NORCROSS, 1970) é um teste relativamente rápido, de baixo custo, simples e altamente específico para identificar animais infectados, entretanto o teste tem baixa sensibilidade e a interpretação dos resultados é subjetiva pela leitura visual das curvaturas das linhas de precipitação (REIS *et al.*, 1994; REIS, 1997; SCICLUNA *et al.*, 2013).

A AIE é, ainda hoje, um obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, uma doença transmissível e incurável, que gera prejuízos econômicos importantes ao produtor rural que utiliza esses animais como ferramenta de trabalho; aos criadores de elite interessados na melhoria das raças, e/ou por interferir nas negociações do mercado internacional (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Desde seu reporte no Brasil, em 1968, a AIE é umas das principais preocupações da equideocultura nacional, e foi incluída na lista de doenças passíveis de aplicação de medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal (BRASIL, 2004) que estabelece a obrigatoriedade da eutanásia ou isolamento dos equídeos soropositivos.

A Bahia é o primeiro estado do Brasil em relação ao quantitativo de equídeos (IBGE-Censo Agropecuário, 2006), entretanto os dados epidemiológicos a cerca da prevalência da AIE no estado são insuficientes, alguns levantamentos demonstraram valores entre 5,9% até 35% de soropositividade (ARAÚJO *et al.*, 2007; GUIMARAES *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2012a; ROSA *et al.*, 2012b).

No Brasil os dados de prevalência da AIE se reportam aos animais que precisam transitar no país, sendo assim nem todos os animais são testados, apenas animais de elite, reprodutores ou atletas, que periodicamente participam de eventos equestres no país. A depender da região estudada a morbidade pode variar amplamente, devido a fatores como a população de hospedeiros e de insetos, vetores mecânicos da infecção e ainda da aplicação de práticas de manejo adequadas (FRANCO & PAES, 2011).

O controle da AIE é possível, mas para tal, um levantamento da distribuição e prevalência da doença, utilizando testes de diagnóstico mais sensíveis, que permitam identificar animais portadores assintomáticos e animais na fase inicial da infecção, são elementos fundamentais para uma vigilância sanitária eficaz.

Desta forma a motivação para a realização deste trabalho foi poder contribuir com os estudos sobre EIAV no Brasil, caracterizando filogeneticamente o vírus que circula nos equídeos da Bahia, e por outro lado questionar o diagnóstico da AIE baseado apenas em IDGA; principalmente porque animais soropositivos são eutanasiados em prol do controle da enfermidade, enquanto animais falsos-negativos continuam transmitindo o vírus no plantel.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

A AIE é uma doença infectocontagiosa crônica de etiologia viral, descrita pela primeira vez na França, em 1843 por Ligné como a Febre dos Pântanos. A identificação do agente etiológico foi realizada por Carré e colaboradores em 1904, e foi a primeira doença comprovadamente causada por um "agente filtrável".

Nos primórdios do século vinte a pesquisa da AIE desacelerou-se devido à incapacidade de se propagar o vírus *in vitro*, até a década de 60, quando pesquisadores japoneses desenvolveram sistemas bem sucedidos de cultura *in vitro* de leucócitos (KONO *et al.*, 1970; CLEMENTS & ZINK, 1996). No início de 1970, Dr. Leroy Coggins desenvolveu o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para detectar especificamente anticorpos no soro de animais infectados (COGGINS & NORCROSS, 1970; COGGINS *et al.*, 1972).

No Brasil a doença foi constatada em 1968, nos estados do Rio de Janeiro (DUPONT *et al.*, 1968; SILVA *et al.*, 1968) e no Rio Grande do Sul (GUERREIRO *et al.*, 1968).

A AIE gera embargos ao trânsito de equídeos, além de interferir nos eventos esportivos equestres, assumindo assim uma relevância econômica considerável. Desde 1981 a AIE foi incluída entre as doenças passíveis de medidas de controle pelo Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Segundo o Regulamento de Defesa Sanitária (BRASIL, 2004) é obrigatória a eutanásia de equídeos soropositivos. Em 2004, foi implantado o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), o qual tem como umas das metas o controle das AIE através da identificação, segregação e/ou eutanásia dos animais positivos no teste de IDGA (BRASIL, 2004).

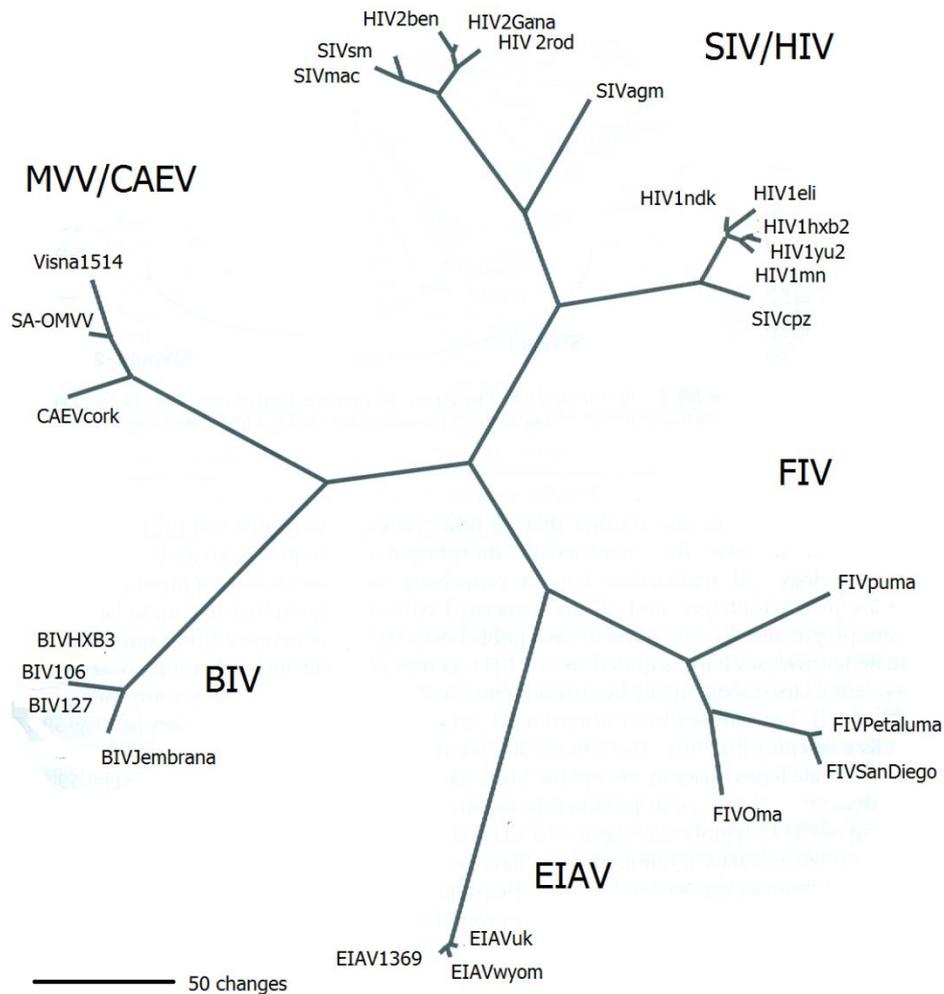
### 2.2 VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

#### 2.2.1 Classificação

A doença é causada pelo vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. A família *Retroviridae* está dividida em subfamílias; esta subdivisão baseia-se predominantemente nas propriedades patogênicas do que nos critérios moleculares. A maioria dos retrovírus de importância na medicina veterinária pertence à subfamília *Orthoretrovirinae* (GOFF, 2007; RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

No gênero *Lentivirus* estão importantes patógenos dos animais domésticos e do homem; o vírus da Artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus Maedi-Visna de ovinos estão intimamente relacionados e forma um complexo denominado, Lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR), o vírus da Imunodeficiência bovina (BIV) e felina (FIV), o vírus da Imunodeficiência símia (SIV) e humana (HIV). Todos os Lentivirus são conhecidos por causar doenças crônicas e persistentes em seus hospedeiros (LEROUX *et al.*, 2004).

Lentivirus têm sido isolados de ovelhas, cabras, cavalos, bois, gatos, macacos e homem. Cinco grupos evolucionários de lentivirus são geneticamente reconhecidos (Figura 1), a partir do alinhamento de sequências da transcriptase reversa (RT) com 427 aminoácidos, sendo relevante perceber que mesmo dentro de um único grupo, distintos subgrupos podem ser definidos de acordo com diferentes espécies hospedeiras, áreas geográficas e distâncias genéticas (DESROSIERS, 2007).



**Figura 1:** Filogenia dos Lentivírus mostrando cinco grupos filogenéticos (DESROSIERS, 2007).

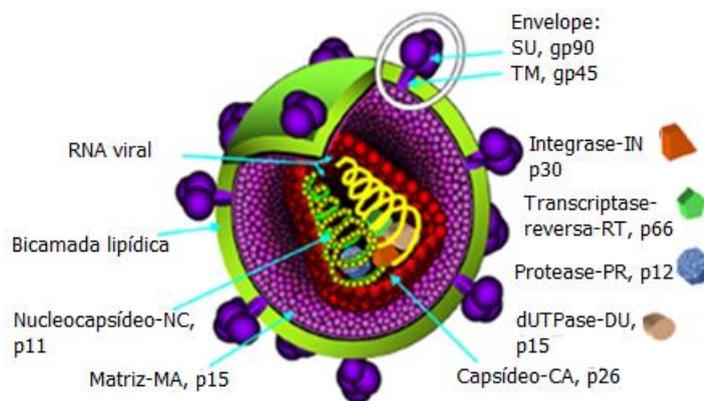
### 2.2.2 Características morfológicas

O vírus da AIE apresenta aproximadamente de 115nm de diâmetro, com estrutura única de tripla camada: a mais interna é o complexo de nucleoproteínas genômicas, que inclui por volta de 30 moléculas de RT, com simetria circular ou oval; a segunda camada é o capsídeo icosaédrico de aproximadamente 60nm de diâmetro; que por sua vez é recoberto por envelope derivado da membrana da célula hospedeira, no qual se projetam peplômeros glicoproteicos de 6-8 nm. O genoma viral é diploide, composto por um dímero invertido de moléculas de RNA fita simples em sentido positivo, e cada monômero tem 7-11kb. O genoma compreende três genes principais que codificam proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*), três regiões abertas de leitura (ORFs) que codificam proteínas regulatórias (*tat*, *rev* e *S2*) e por

duas regiões não codificantes, únicas, situadas nas extremidades 5` (RU5) e 3` (RU3) que apresentam elementos promotores da transcrição (MURPHY *et al.*, 1999; COUTINHO *et al.*, 2013; ISSEL *et al.*, 2014).

O envelope viral é constituído por lipídeos e glicoproteínas codificadas pelo gene *env*, as quais são denominadas de glicoproteínas de superfície (SU) e transmembrana (TM), que atuam como receptores virais durante a interação do vírus com a célula hospedeira. O gene *gag* origina as proteínas da matriz (MA), cápside (CA) e nucleocapsídeo (NU), enquanto o gene *pol* é responsável pela síntese de proteínas com funções enzimáticas envolvidas no processo de replicação viral como as proteases (PR), a RT e a integrase (IN) (Figura 2) (GOFF, 2007; RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

Os retrovírus são inativados por solventes lipídicos, detergentes e pelo aquecimento a 56°C por 30 minutos. Porém, são mais resistentes à radiação UV e X do que outros vírus, provavelmente devido ao seu genoma diploide (MURPHY *et al.*, 1999).



**Figura 2:** Desenho esquemático da estrutura do EIAV mostrando a identificação e a localização das proteínas estruturais (Adaptado de ISSEL *et al.*, 2014).

### 2.2.3 Genoma do EIAV

O genoma de EIAV consiste em duas fitas de RNA idênticas não complementares com aproximadamente 8,2kb, o menor genoma entre os lentivírus, compreendendo três genes

principais que codificam proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e não estruturais (*tat*, *rev* e *S2*) ligadas nas extremidades finais por duas regiões terminais não codificantes (“*long terminal repeats*” ou LTR) (Figura 3).

As proteínas de *gag*, *pol* e *env* são produzidas como poliproteínas precursoras e são clivadas somente na fase final do ciclo, durante o egresso e mesmo após, dando origem às proteínas individuais (RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

A poliproteína precursora codificada pelo gene *gag* contem 55kd (Pr55gag) é clivada pela PR viral, sendo essencial no ciclo de replicação pois está associada a formação da partícula viral na célula hospedeira. Esta poliproteína é clivada em quatro proteínas estruturais que compõem o virion maduro: a proteína MA (p15), a proteína CA (p26) e duas NC (p11 e p9) (COUTINHO *et al.*, 2013). Estas proteínas formam o *core* viral, com a p11 ligando-se ao RNA genômico (RNAg), a p26 compreendendo a estrutura cônica do *core* e a p15 formando a matriz ao redor do *core*. Desta forma, p15 e p26 são essenciais na formação da partícula viral enquanto p9 é crítica para a liberação da progênie viral a partir da célula hospedeira (ISSEL *et al.*, 2014). Estudos também sugerem a participação da p9 nos eventos de infecção e replicação viral (CHEN *et al.*, 2001) assim como o papel desta proteína nos estágios iniciais da replicação que levam a geração do DNA proviral e sua estável integração, fundamental para uma infecção produtiva na célula alvo (JIN *et al.*, 2005).

As proteínas do gene *pol* também são produzidas pela clivagem proteolítica do precursor Pr180gag/pol, novamente pelas PR virais, produzindo importantes proteínas com função enzimática a PR, a IN e RT (ISSEL *et al.*, 2014). A PR é responsável pelo processamento das poliproteínas Pr55gag e Pr180gag/pol, a RT faz a conversão do RNAg viral em DNA proviral e a IN facilita a integração do DNA proviral ao DNA cromossômico da célula hospedeira (DONG *et al.*, 2014).

Os lentivírus não-primatas codificam uma enzima importante para a síntese de DNA, a deoxiuridina trifosfatase (dUTPase; DU) a partir de uma ORF distinta dentro do gene *pol* (Figura 3), esta enzima catalisa a conversão de dUTP em mUTP e PPi, e tem sido reportada como importante fator para a eficiente replicação do EIAV em macrófagos, *in vitro* e *in vivo*; variações na sequência de DU podem alterar propriedades biológicas e patogênicas do vírus. A presença, portanto da DU em lentivírus não primatas pode estar relacionado em parte à replicação predominante destes vírus em células com baixo potencial de divisão (macrófagos) em contraste com os lentivírus de primatas que se replicam em células com alto potencial de divisão (linfócitos), assim a presença da DU reduz a frequência de mutação nos produtos da transcrição reversa (DESROSIERS, 2007; LICHTENSTEIN *et al.*, 1995).

O envelope viral é constituído pelo produto do gene *env*, uma poliproteína clivada por endoproteínases celulares em duas glicoproteínas: SU (gp90) e TM (gp45); que estão envolvidas na ligação do vírus ao receptor celular, recentemente identificado como receptor de lentivírus equino-1 (ELR-1), membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (ZHANG *et al.*, 2005). A TM é uma proteína integral de membrana; a SU está localizada externamente no virion, associada de forma não-covalente com a região externa da TM (GOFF, 2007; RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

Os genes *gag* e *pol* mostram-se os mais conservados, enquanto o gene *env* é heterogêneo, em razão das mutações pontuais estabelecidas durante a replicação dos ácidos nucleicos dos retrovírus (NARAYAN & CLEMENTS, 1989). As regiões *gag*, *pol* e ORF1 (codifica o exon 2 de *tat*) e a ORF2 (codifica *S2*) são conservadas entre as cepas de EIAV, enquanto *env* e ORF3 (codifica o segundo exon de *rev*) são altamente variáveis (CHONG *et al.*, 2014).

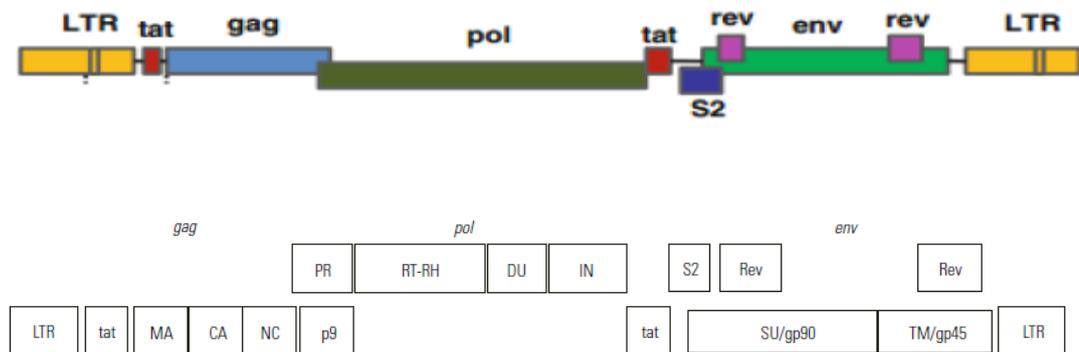
As LTRs são formadas na fase de síntese do DNA pelas sequências RU3 e RU5 presentes no genoma do vírus, as quais contêm o sítio de iniciação da transcrição para a RNA polimerase II. São regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5` (RU5) e 3` (RU3) que flanqueiam o DNA proviral. As regiões LTRs regulam a expressão do genoma viral, servindo como ponto de convergência de fatores de transcrição e elementos do maquinário transcricional da célula, também são responsáveis pela poliadenilação do RNA viral, além de estarem relacionadas com o tropismo celular (MAURY, 1998). A função de LTR tem impacto direto sobre (i) a infecção produtiva da célula hospedeira, (ii) a expressão viral e montagem suficiente para elevar a carga viral a níveis associados à progressão da doença e patogênese, (iii) transição entre os níveis de expressão viral da latência para a infecção altamente produtiva e (iv) a produção de proteínas virais citotóxicas (KREBS *et al.*, 2001).

O genoma do EIAV apresenta três ORF`s, além dos três genes estruturais, as quais codificam proteínas acessórias (*tat*, *rev* e *S2*) que podem ter funções regulatórias na replicação viral, na defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro e/ou promovem a patogenicidade. Embora duas destas proteínas (*tat* e *rev*) sejam comuns a todos os retrovírus, a terceira, *S2* está presente apenas no genoma do EIAV (COUTINHO *et al.*, 2013; ISSEL *et al.*, 2014).

Por outro lado EIAV é o único do gênero que não codifica a proteína do gene regulatório *vif*; esta proteína tem ação direta sobre a apolipoproteína  $\beta$  (APO $\beta$ EC-3)

importante na defesa do hospedeiro contra os retrovírus (DESROSIERS, 2007; ISSEL *et al.*, 2014).

*Tat* (*trans*-ativador protein) tem a função de recrutar proteínas da célula hospedeira essenciais para o alongamento do RNA viral nascente, enquanto *Rev* (proteína reguladora viral) promove o *splicing* e a exportação nuclear do RNAm viral para o citoplasma. Embora a função de *S2* não esteja completamente definida a deleção desta proteína acessória resulta na atenuação do vírus (BACCAM *et al.*, 2003; ISSEL *et al.*, 2014). Estudos sugerem que *S2* participa da regulação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, induzindo potencialmente o quadro de trombocitopenia observado na fase aguda da doença (COVALEDA *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Organização genômica do EIAV. (A) Regiões codificadoras do genoma viral. (B) Produtos proteicos e suas respectivas ORF's no genoma viral (DESROSIERS, 2007; ISSEL & FOIL, 2015).

## 2.2.4 Ciclo de Replicação Viral

A infecção inicia-se pela ligação sequencial das proteínas do envelope do vírus à receptores primários na superfície das células, e então co-receptores vão mediar a fusão entre o vírus e a membrana celular (CLAPHAM & MCKNIGHT, 2002). Zhang e col. (2005) identificaram e clonaram um receptor funcional para EIAV, denominado *Equine Lentivirus receptor-1* (ELR-1), uma proteína semelhante às da família do receptor do TNF. Demonstrou-se que ERL-1 é expressa em células permissivas à replicação de EIAV, incluindo

monócitos/macrófagos, estando ausente em linhagens de células humanas, símias e de roedores.

A subunidade SU de *env* tem o papel principal de contato com o receptor, e a subunidade TM parece ser mais importante na fusão com a membrana celular (GOFF, 2007). O rearranjo das proteínas do envelope é especialmente requerido nesta fase, tais rearranjos acontecem nas pontes dissulfeto que existem dentro ou entre TM e SU. Em condições favoráveis de temperatura, a fusão inicia-se rapidamente (dentro de 5 minutos) e estará completamente concluída em 3 horas (GOFF, 2007; COFFIN *et al.*, 1997).

O processo de desnudação ou abertura do capsídeo, o qual permite o início da transcrição reversa, é pobremente conhecido, provavelmente fatores celulares são importantes nos estágios iniciais. Por exemplo, no caso do HIV a proteína Ciclofilina A interage com CA, isto é necessário para o início da transcrição reversa. Possivelmente esta proteína facilite o desnudamento do virion (GOFF, 2007).

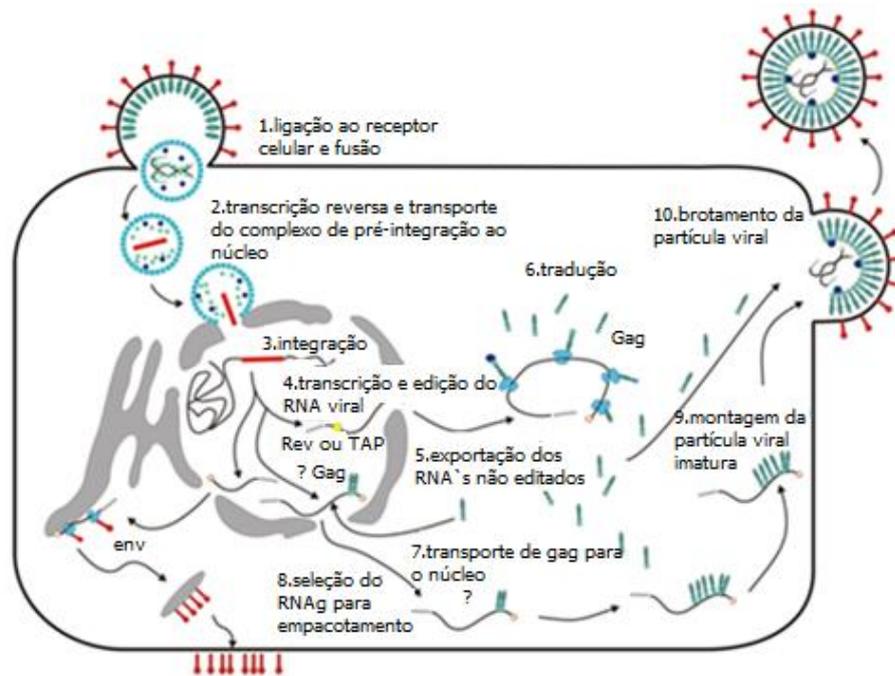
Os retrovírus diferem de outros vírus, pois cada virion contém duas cópias completas do genoma de RNA de cadeia simples. Tem se proposto que os retrovírus carreguem estes dois RNAs para aumentar a probabilidade de sucesso da síntese de DNA, ou seja, se um dos dois RNAs for degradado, a RT pode mudar o modelo e copiar o RNA viral garantindo assim a síntese de DNAc.

A transcrição reversa e a integração iniciam-se a partir da formação de um complexo ribonucleoproteico que inclui não só a RT e o RNA viral, mas outras proteínas virais, como a IN e proteínas do gene *gag* como NC, que parece facilitar a síntese do DNAc (COFFIN *et al.*, 1997).

A integração é uma etapa crucial no ciclo de replicação dos retrovírus. Complexos de pré-integração compostos pela enzima IN, proteínas celulares e outras proteínas virais atuam na incorporação do DNAc viral no genoma da célula hospedeira. Como resultado, os retrovírus na forma de provírus tornam-se parte integrante do cromossomo da célula persistindo durante toda a vida do hospedeiro, estabelecendo infecções latentes (SAXENA & CHITTI, 2016). Liu e col. (2015) demonstraram em cultivo de células de derme fetal equina (FED) que cepas de EIAV tendem a integrar em regiões do DNA ricas em adenina e timina, e evitar os locais de início de transcrição (TSS), o que também é observado com HIV-1.

O RNAg é produzido pela transcrição do provírus integrado ao DNA da célula hospedeira, reação que é catalisada pelo maquinário celular de transcrição na fase tardia do ciclo de replicação viral, nesta fase enzimas da célula hospedeira vão realizar o processo normal de transcrição e tradução (RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

O próximo passo é a montagem, no qual as proteínas da cápside dos retrovírus são organizadas e agrupadas em uma forma imatura. Por fim a fase de brotamento, na qual a partícula viral imatura adquire a membrana plasmática da célula hospedeira; sobrevém a maturação e liberação, na qual as poliproteínas *gag* e *pol* dos retrovírus são clivadas pela PR retroviral, formando assim a forma madura e infecciosa do vírus (Figura 4) (SAXENA & CHITTI, 2016).



**Figura 4:** Visão esquemática do ciclo de replicação dos retrovírus (Adaptado de STAKE *et al.*, 2013).

### 2.2.5 Células hospedeiras do vírus

O EIAV tem tropismo *in vivo* por células da linhagem monócito/macrófago e são as células predominantemente infectadas pelo vírus. A penetração do vírus nos monócitos resulta em uma infecção não produtiva e a sua diferenciação em macrófagos ativa a replicação viral, este evento próprio dos Lentivírus é denominado restrição da replicação (MAURY *et al.*, 1994; CLEMENT *et al.*, 1996). O vírus se replica ativamente durante os

episódios febris nos macrófagos detectados no baço, fígado, linfonodos, pulmões, rins, glândula adrenal e medula óssea. Portanto os monócitos e macrófagos infectados são os grandes disseminadores da doença no animal (MAURY, 1994; SELTON *et al.*, 1996).

O baço parece ser o local predominante da replicação e persistência, entretanto outros tecidos também podem servir como sitio da replicação viral como a medula óssea (OAKS *et al.*, 1998).

Algumas outras células mostraram também ser susceptíveis ao vírus como células endoteliais (MAURY *et al.*, 1998; OAKS *et al.*, 1999) e células dendríticas derivadas de monócitos *in vitro* (RIVERA & MCGUIRE, 2005), entretanto estas células parecem não servir como reservatório do EIAV.

Em condições laboratoriais, isolados de campo de EIAV podem ser adaptados à replicação em culturas de fibroblastos equinos e caninos, resultando na atenuação do vírus (ISSEL *et al.*, 2014).

## 2.2.6 Restrição da Replicação Viral

A expressão do EIAV *in vivo* é controlada por mecanismos transcricionais, os quais envolvem a maturação e diferenciação dos monócitos. Regiões específicas ou *motifs* dentro da LTR viral interagem com fatores de transcrição específicos dos macrófagos que controlam a expressão no monócito/macrófago. Sendo assim, o vírus é capaz de infectar monócitos no sangue periférico, entretanto a replicação só ocorre após a diferenciação do macrófago no órgão alvo. Desta forma o mecanismo de escape do vírus dentro do hospedeiro se assemelha à estratégia do histórico “cavalo de Tróia”, uma vez que o vírus entra no órgão alvo clandestinamente, migrando dentro dos monócitos sem ser percebido pelo sistema imunológico (MAURY, 1994).

A restrição da replicação viral, a nível celular, ocorre quando o animal não apresenta sinais clínicos da infecção. Durante a infecção subclínica a carga viral diminui, assim como a expressão de RNAm viral. Estudos revelam que o nível de RNA viral no plasma durante a fase aguda da infecção pode atingir de  $10^5$  a  $10^8$  cópias por mL, enquanto em portadores assintomáticos, durante a fase de infecção persistente, o numero de cópias de RNAm no plasma pode ser menor que 100 cópias por mL, consequência da supressão efetiva da

replicação viral (HAMMOND *et al.*, 2000). Apenas na fase aguda da doença ocorre replicação viral intensa nos macrófagos e viremia detectável. Assim o EIAV se comporta de forma semelhante ao HIV, onde a replicação inicial do vírus é ostensiva seguida pela redução da carga viral e remissão dos sinais clínicos (OAKS *et al.*, 1998).

### 2.2.7 Variação genética e antigênica

A RT dos retrovírus é propensa a erros, estima-se que ocorra a substituição de um (1) nucleotídeo a cada ciclo de replicação; além disso esta enzima não possui mecanismos corretores intrínsecos sendo incapaz de corrigir tais substituições, o que resulta no aparecimento de partículas virais distintas, mas que compartilham características genéticas, morfológicas e patológicas. Estas partículas virais são denominadas de *quasispécies* virais (EIGEN, 1993; DOMINGO *et al.*, 1996; ISSEL *et al.*, 2014).

A estrutura populacional das *quasiespécies* é caracterizada por um complexo sistema adaptativo e contribui para a notável evolução dos lentivírus que dificultam os esforços para o desenvolvimento de vacinas e terapias antivirais. Subpopulações virais distintas com diferentes fenótipos proporcionam grande adaptabilidade às mudanças imunológicas, fisiológicas e/ou biológicas do hospedeiro infectado (BACCAM *et al.*, 2003).

O EIAV é um vírus altamente mutável; as mutações podem ser observadas na replicação e/ou na readaptação do vírus ao hospedeiro e durante a passagem horizontal do vírus entre hospedeiros. Entretanto a evidente estabilidade do vírus em cultura de células sugere que a pressão imunológica do hospedeiro pode ser a principal força seletiva para a emergência de variantes antigênicas (PAYNE *et al.*, 1984).

Variações genômicas levam ao quadro de persistência viral, o qual permite que o vírus escape da resposta imune do hospedeiro, ocasionando períodos de recrudescência da doença, comuns no primeiro ano da infecção (KONO *et al.*, 1973; MONTELARO *et al.*, 1984). Na AIE o aparecimento destas *quasispecies* está associado a novos episódios clínicos da doença, e esta nova população viral pode ser completamente substituída entre os episódios febris (KIM & CASEY, 1992; LICHTENSTEIN *et al.*, 1996; LEROUX *et al.*, 1997; HOWE *et al.*, 2002; LEROUX *et al.*, 2004).

Variantes antigênicas do EIAV surgem a cada ciclo da doença no hospedeiro, sendo que estas variantes podem ser completamente substituídas dentro de duas semanas (PAYNE *et al.*, 1987). Além disso, diversos autores relatam a existência de variantes geográficas isolados em diferentes regiões do mundo (NAGARAJAN & SIMARD, 2007; CAPELLI *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2013; BOLDBAATAR *et al.*, 2013; KUHAR & MALOVRH, 2015).

### 2.2.8 Estudo filodinâmico

O conceito de filogenia surgiu com Darwin, sendo um corolário do próprio conceito de que todas as espécies se originaram de um ancestral comum. Assim as filogenias como diagramas indicam hipóteses de relações de ancestralidade para um conjunto de espécies (MIYAKI *et al.*, 2012).

Estudos filogenéticos fornecem valiosas informações sobre a diversidade genética e a distribuição geográfica do EIAV. Embora a AIE seja uma infecção endêmica na maior parte do mundo, a diversidade e a distribuição dos isolados estão pobremente caracterizados, e relativamente pouco se conhece sobre a origem e a transmissão pandêmica do vírus (CAPOMACCIO *et al.*, 2012)

Quatro isolados de campos do EIAV tiveram seu genoma completamente sequenciados e as sequências publicadas em bancos de dados, a cepa de referência Wyoming (EIAV<sub>WYO</sub>) nos Estados Unidos, Liaoning (EIAV<sub>LIA</sub>) na China, Miyazaki2011-A (EIAV<sub>MIY</sub>) no Japão e Ireland (EIAV<sub>IRE</sub>) na Irlanda. Estes isolados apresentam 80% ou mais dos nucleotídeos idênticos. Na análise filogenética destes isolados cada vírus compreende um *clade* separado dos outros, sugerindo que todos evoluíram independentemente divergindo de um ancestral comum (ISSEL *et al.*, 2014).

A relação entre o EIAV e os equídeos provavelmente aconteceu há milhares ou milhões de anos atrás. No processo de evolução o vírus se adaptou ao hospedeiro o que pode explicar a evolução clínica da maioria dos animais infectados para o estado de portador assintomático do vírus, sugerindo uma relação ancestral entre o vírus e seu hospedeiro (WOROBAY *et al.*, 2010).

### 2.2.9 Patogênese

A AIE é considerada uma doença viral infectocontagiosa limitada a equinos, asininos e muares; o curso clínico é variável e está relacionada à susceptibilidade do hospedeiro, dose e virulência da cepa do vírus envolvida (GOFF, 2007; RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

Os sinais clínicos da doença têm início a partir da liberação de citocinas pró-inflamatórias, quando a carga viral atinge um limiar crítico. Interleucina (IL)-6 e o Fator de necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  induzem febre através da ativação da via do ácido aracídico, aumentando a produção de prostaglandina E<sub>2</sub>, enquanto TNF $\alpha$ /fator $\beta$  de transformação do crescimento (TGF)- $\beta$  contribuem para o desenvolvimento do quadro de trombocitopenia através da supressão dos megacariócitos equinos; a anemia decorre de uma hemólise de natureza imunológica, destacando a eritrofagocitose associada à fração C3 do complemento, e também à inibição da eritropoiese por citocinas (TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) liberadas por macrófagos infectados (LIM *et al.*, 2005; TORNQUIST *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2012; ISSEL *et al.*, 2014).

### 2.2.10 Aspectos clínicos e patológicos

A AIE é uma doença caracterizada por dois estágios clínicos que vão desde uma infecção aguda (com elevada mortalidade) a formas subagudas, com episódios de febre moderada e recuperação, ambas seguidas de uma infecção crônica e persistente por toda a vida (MONTELARO *et al.*, 1984).

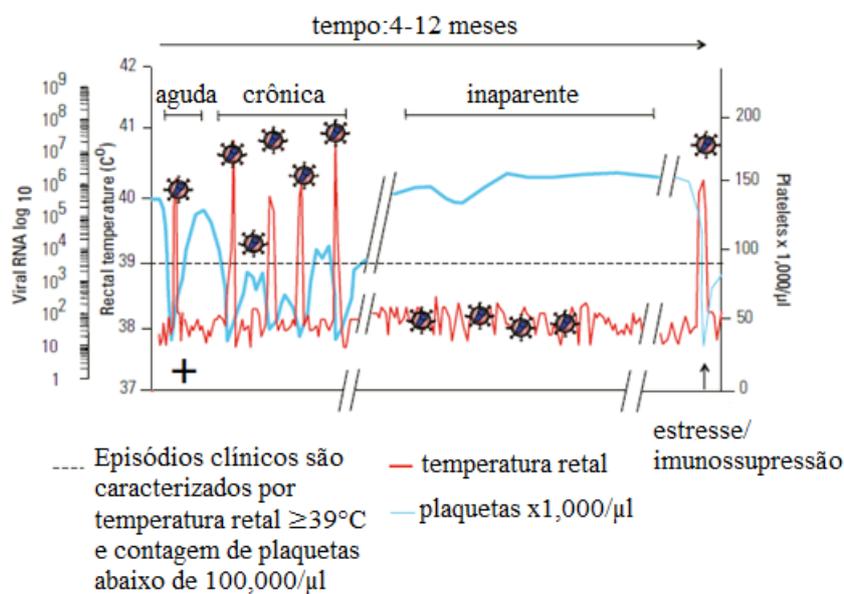
O período de incubação tem geralmente duração de 1 a 3 semanas, mas pode chegar a 3 meses. Cavalos infectados naturalmente ou experimentalmente tipicamente desenvolvem dentro do primeiro mês de infecção a doença aguda, apresentando febre, diarreia, letargia, anemia e trombocitopenia, associado à elevada viremia resultante da replicação viral intensa nos macrófagos teciduais e periféricos. Os sintomas da fase aguda podem variar de moderados a severos e fatais dependendo da virulência da cepa de EIAV e do estado imunológico do hospedeiro (ISSEL & COGGINS, 1979).

A trombocitopenia é o achado clínico mais comum durante os episódios febris, e contribui para o surgimento das hemorragias petequiais durante as fases aguda e crônica da AIE (SANTOS *et al.* 2012).

Após a fase aguda da infecção, que pode durar de 3 a 5 dias, a maioria dos animais apresenta episódios recorrentes da doença associado a picos de viremia com intervalos irregulares. Cada episódio febril viremico está associado à emergência de uma variante viral nova predominante (KONO *et al.*, 1973). Esta doença cíclica é denominada de fase crônica.

Aproximadamente 90% dos animais infectados sobrevive a fase crônica e se torna clinicamente normal. A frequência e a severidade dos sinais clínicos tipicamente diminuem com o tempo, e usualmente se resolve completamente no final de um (1) ano pós-infecção. Desta forma, animais infectados persistentemente tornam-se clinicamente assintomáticos e apresentam viremia negativa no plasma, indicando um controle altamente eficiente da doença e da replicação viral (HAMMOND *et al.*, 2000).

Subsequentes episódios clínicos podem ser provocados nestes animais por estresse ambiental ou drogas imunossupressoras (Figura 5) (CHEEVERS & MCGUIRE, 1985).



**Figura 5:** Cinética da infecção por EIAV em animais experimentalmente infectados (Adaptado de ISSEL & FOIL, 2015).

Durante os episódios febris lesões patológicas incluem linfadenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia, hemorragias viscerais e nas mucosas, edema ventral subcutâneo e trombose. No exame histopatológico há acúmulo de linfócitos e macrófagos em áreas periportais do fígado e nos gânglios linfáticos, baço, meninges e pulmão (SELLON *et al.*, 1994).

Semelhante a outros retrovírus, a infecção pelo EIAV é persistente, ou seja, os animais infectados tornam-se portadores do vírus por toda a vida; entretanto a diferença da AIE das outras infecções causadas por CAEV, MVV e FIV é que o EIAV causa picos de viremia e a recidiva da infecção (RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

Bolfa e col. (2013) avaliaram o potencial do EIAV para causar lesões pulmonares, assim como já foi relatado em outros lentivírus, tais como CAEV e MVV em caprinos e ovinos, FIV em felinos e HIV-1 em crianças, e demonstraram a presença de inflamação em torno dos bronquíolos, em animais naturalmente infectados com EIAV. Também observaram hiperplasia bronquiolar em 22% dos casos, destruição do epitélio bronquiolar e acúmulo de células musculares no parênquima pulmonar em 6,5% dos animais doentes. Neste estudo a expressão da cápside do EIAV foi evidenciado em macrófagos, células endoteliais e epiteliais alveolares e bronquiolares, sugerindo que o EIAV é responsável pelos danos bronco-intersticiais observados.

### **2.2.11 Transmissão**

A transmissão do vírus esta relacionada com a transferência de sangue de um cavalo infectado a um receptor sadio; por via vertical (intrauterina) ou horizontal, por meio de utensílios (esporas, agulhas, freios e outros), leite materno ou sêmen (GONÇALVES & RIBEIRO, 2005).

Por via transplacentária, a transmissão pode ocorrer se durante a gestação a fêmea apresentar um episódio febril com altos títulos viremicos. Experimentalmente, menos de 10% dos potros nascidos de éguas portadoras do vírus nascem soropositivos (SELLON *et al.*, 1994).

Já a transmissão mecânica é uma das mais controversas vias de transmissão do vírus; ocorre através da picada de insetos hematófagos da ordem *Diptera*, como a mosca do estabulo (*Stomoxys calcitrans*) e os tabanídeos (*Tabanus sp*), vetores mecânicos da infecção, devido a permanência do vírus no aparelho bucal dos insetos (ISSEL & FOIL, 1984).

Embora a transmissão da AIE por insetos hematófagos seja considerada relativamente eficiente entre animais na fase aguda e viremica, o homem representa um potencial de transmissão superior pela quantidade de sangue que pode veicular por meios de fômites (SANTOS *et al.*, 2012).

Nos vetores, o EIAV pode permanecer infeccioso por um período de 30 minutos a 4 horas, de modo que o inseto deve completar o repasto sanguíneo, que foi interrompido no animal contaminado, rapidamente em um animal susceptível para que haja transmissão (HAWKINS *et al.*, 1976; WILLIAMS *et al.*, 1981; FOIL *et al.*, 1983). Fatores que controlam a transmissão por vetores incluem o volume de sangue retido nas peças bucais do inseto, o tempo requerido para o contato com um segundo hospedeiro susceptível e a carga viral presente no sangue (ISSEL *et al.*, 2014).

A incidência maior da AIE ocorre com frequência em áreas ou habitats preferidos dos tabanídeos. Regiões de áreas alagadas, presença de rios, lagos assim como meses de alta pluviosidade formam o ecossistema ideal para aumentar o risco de transmissão de EIAV através desta via. Por outro lado os muares e asininos também constituem importantes fontes de infecção ao suportar melhor as picadas dos insetos hematófagos (SPYROU *et al.*, 2003).

Entretanto a via de transmissão que envolve uma maior carga viral do que aquela transportada no aparelho bucal dos insetos é a via iatrogênica. Objetos de uso individual, tais como arreios, esporas, freios, agulhas ou material cirúrgico, se compartilhados podem transmitir o vírus entre animais infectados e susceptíveis. Desta forma, em muitas ocasiões o homem torna-se o principal componente da cadeia de transmissão do vírus em função do manejo inadequado dos animais (TASHJIAN, 1984; GONÇALVES & RIBEIRO, 2005). Estudos demonstraram que o EIAV mantém sua capacidade infecciosa por até 96 horas em agulhas contaminadas com sangue (WILLIAMS *et al.*, 1981).

A importância do proprietário, veterinários e das pessoas que lidam diariamente com os animais, que podem indiretamente transmitir a infecção através de agulhas contaminadas e instrumentos cirúrgicos, deve ser enfatizada, pois o uso de materiais sem prévia desinfecção e/ou esterilização tem sido responsável por surtos da doença em todo o mundo (SANTOS *et al.*, 2012).

A transmissão do EIAV por meio de aerossóis foi relatada por Bolfa e col. (2013), que descreveram uma doença pulmonar intersticial em cavalos infectados por EIAV, demonstrando a expressão das proteínas da cápside em macrófagos, células endoteliais e epiteliais do pulmão.

A detecção de infecção pulmonar e de lesões consistentes com aquelas induzidas por outros lentivírus podem sugerir a possibilidade da transmissão do EIAV através de partículas em aerossol como relatado para outros retrovírus, tais como os LVPR ou o Retrovírus de ovelhas Jaagsiekte (JSRV), segundo os autores esta via de transmissão precisa ser mais explorada (BOLFA *et al.*, 2013).

### 2.2.12 Aspectos Imunológicos

A resposta imune humoral ao EIAV se detecta entre 7 a 10 dias pós-infecção com a presença de anticorpos anti-gp90 e contra a principal proteína do capsídeo viral a p26 (MONTELARO *et al.*, 1993; HAMMOND *et al.*, 2000). A resposta imune humoral requer de 6 a 8 meses pós-infecção para se tornar completamente madura. Durante este tempo os anticorpos específicos contra EIAV evoluem gradualmente, a partir de uma população que apresenta baixa avidéz e são não-neutralizantes (MONTELARO *et al.*, 1993; HAMMOND *et al.*, 2000).

Alguns estudos sugerem que o término da viremia inicial coincide com a presença de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL) e ocorre antes do aparecimento de anticorpos neutralizantes (PERRYMAN *et al.*, 1988; MCGUIRE *et al.*, 1994).

Animais infectados pelo EIAV desenvolvem forte resposta imune contra as glicoproteínas de superfície, SU e TM, e contra a principal proteína do core viral a p26. Apesar de a p26 ser a mais abundante proteína do vírus, a resposta humoral anti-p26 é de 10 a 100 vezes mais baixa do que a reatividade contra SU e TM (HAMMOND *et al.*, 1999).

Estudos sobre a resposta de CTL contra HIV-1 e EIAV demonstraram que as proteínas codificadas pelo gene *gag* são preferencialmente reconhecidas pelos CTL. E as proteínas da MA (p15) e da CA (p26) são as mais frequentes. As proteínas MA e CA foram

reconhecidas por CTL em 100% e 86% de sete animais infectados, respectivamente (CHUNG *et al.*, 2004).

Entretanto não há expectativas que os CTL possam prevenir a infecção por qualquer lentivírus, inclusive EIAV. Variação antigênica e polimorfismo do MHC de classe I do hospedeiro são as principais barreiras para induzir uma resposta imune protetora por CTL contra lentivírus humano e de outros animais (CHUNG *et al.*, 2004; MACGUIRE *et al.*, 2004).

Citocinas são responsáveis por modular a progressão da doença assim como a persistência viral. EIAV induz uma forte resposta pro-inflamatória em cultivo de macrófagos derivados de monócitos (MDM) e o gene *S2* é responsável por promover esta resposta. Um aumento significativo na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-34, proteína indutora de interferon gama (IP)-10, proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, MCP-2, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  foi observado em MDM infectadas com EIAV em comparação com células não infectadas.

Entretanto a dinâmica da resposta de citocinas durante o curso da replicação de EIAV é desconhecido. Mudanças nos níveis de citocinas e quimiocinas podem ter impacto na resposta imune, influenciando a patogênese pela promoção ou supressão da replicação do vírus, assim como favorecer a formação de células reservatórias infectadas (LIM *et al.*, 2005; COVALEDA *et al.*, 2010).

Durante a fase aguda, a atividade de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e interferon (IFN)- $\alpha$  estão aumentadas no soro, antecedendo o quadro de trombocitopenia, além disso, o nível de IFN- $\alpha$  também está fortemente relacionado à replicação viral/viremia (TORNQUIST *et al.*, 1997).

A resposta imune é duradoura no equídeo mantendo a replicação viral abaixo do limiar e evoluindo para infecções crônicas e inaparentes, porém as variantes virais emergentes durante a replicação no hospedeiro escapam à resposta imune e levam a recrudescência da doença (MONTELARO *et al.*, 1984; CARPENTER *et al.*, 1987; LEROUX *et al.*, 1997; LEROUX *et al.*, 2001; MEALY *et al.*, 2003).

## 2.3 DIAGNÓSTICO

### 2.3.1 Clínico

O diagnóstico clínico é difícil, pois os sinais da doença não são específicos e muitos dos equídeos entram no estado portador assintomático entre 12 e 24 meses pós-infecção, sendo imprescindível o diagnóstico laboratorial (LEROUX *et al.*, 1997).

### 2.3.2 Laboratorial

Até 1960 as pesquisas sobre o EIAV eram restritas pela falta de sistemas *in vitro* confiáveis para o isolamento, propagação e quantificação do vírus (MONTELARO *et al.*, 1993). Devido á dificuldade do cultivo e isolamento viral , o diagnóstico da AIE era realizado através da inoculação do sangue de um animal suspeito em um animal susceptível, até 1968, quando Kobayash e Kono conseguiram replicar o vírus em cultura de leucócitos e depois adapta-lo a linhagens celulares contínuas. A partir disso vários testes sorológicos foram desenvolvidos, dentre eles a IDGA, por Coggins em 1972 (COGGINS *et al.*,1972; KONO *et al.*, 1973).

Em 1974, o teste de Coggins ou IDGA foi aprovado como exame oficial para AIE, e desde então tem sido empregado em todo o mundo (COGGINS & NORCROSS, 1970).

#### 2.3.2.1 Isolamento viral

A maioria das cepas virulentas do EIAV não se propaga em linhagens celulares, mas apenas em cultura primaria de macrófagos equinos (SELLON *et al.*, 1994).

Infelizmente o cultivo de macrófagos para isolamento viral não é prático, pois consome tempo, é laborioso e requerem técnicas especializadas para se manter viáveis as culturas primárias de macrófagos equinos (NAGARAJAN & SIMARD, 2007).

A infecção *in vitro* de cultivo primário de macrófagos com EIAV induz efeito citopático o qual não se pode distinguir facilmente dos efeitos normais da senescência celular (KONO *et al.*, 1970; SELTON *et al.*, 1994).

Também é possível infectar *in vitro* linhagens de células endoteliais e fibroblásticas felinas (FEA) e caninas (Cf2Th), assim como rim e derme equina (BENTO *et al.*, 1981).

### 2.3.2.2 Detecção sorológica do vírus

#### A) Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

O teste de IDGA também conhecido como “teste de Coggins” baseia-se na migração do antígeno e do anticorpo presente no soro animal, em um meio semissólido (ágar-gel), com a formação de uma linha de precipitação visível a olho nu (COGGINS *et al.*, 1972; ISSEL & COGGINS, 1979).

A IDGA é o teste oficial indicado pela OIE para o diagnóstico sorológico da AIE em todo o mundo (OIE, 2013). Este teste utiliza como antígeno a proteína da CA, a p26, e constitui o teste padrão-ouro para o diagnóstico da AIE (COGGINS & NORCROSS, 1970; COGGINS *et al.*, 1972).

O teste de Coggins recebeu rápida aceitação internacional e permanece como teste confirmatório em laboratórios em todas as partes do mundo, onde o teste tem sido adotado pelos órgãos regulatórios (ISSEL & FOIL, 2015).

Apesar de ser utilizado em larga escala, é um teste relativamente rápido, de baixo custo, simples e específico para identificar animais infectados, a IDGA apresenta algumas limitações: é um teste pouco sensível e sua interpretação é subjetiva pela leitura visual das curvaturas das linhas de precipitação. Estudos relatam a baixa sensibilidade da IDGA, animais com baixos níveis de anticorpos não são detectados por esta técnica, o que permite a circulação de animais falsos negativos (REIS *et al.*, 1994; REIS, 1997; SCICLUNA *et al.*, 2013).

De acordo com Issel e Foil (2015) o único teste sorológico que provou estar correlacionado com a presença do vírus no animal é o teste de IDGA; desta forma, no IDGA a presença de anticorpos está relacionada à presença do vírus sendo um bom indicador de

infecção para os equídeos com AIE, pois uma vez infectados os animais soropositivos irão carregar o vírus por toda a vida.

#### B) *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Desde 1980 vários testes de ELISA tem sido padronizados e validados para um diagnóstico sorológico mais rápido e mais sensível quando comparados ao clássico teste de IDGA (REIS & LEITE, 1994; SOUTULLO *et al.*, 2001).

É uma técnica de grande sensibilidade, especificidade, e permite o processamento e automação de um grande número de amostras. Este teste se baseia no uso de um antígeno, anticorpos e de anti-imunoglobulinas marcadas com uma enzima. (ISSEL & COOK, 1993).

As características do ELISA levaram alguns países a adota-la como primeira estratégia na triagem sorológica combinando seu uso com a oficialmente reconhecida, IDGA. Países de América do Norte e Europa que aprovaram kits de ELISA de uso comercial mostraram a eficácia do uso combinado com a IDGA, nos programas de vigilância sanitária (PARE & SIMARD, 2004; SCICLUNA *et al.*, 2013).

Diversos trabalhos têm descrito a produção de testes de ELISA utilizando como antígeno a proteína p26 devido à estabilidade antigênica da mesma, apresentando grande correlação com os resultados obtidos por IDGA (MATSUSHITA *et al.*, 1989; PIZA *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2013); entretanto, embora os resultados do ELISA apresentem uma boa correlação com o IDGA, um problema comum observado nos testes sorológicos, incluindo o ELISA, são os falsos resultados negativos oriundos de animais com baixos títulos de anticorpos, sendo assim o ensaio não é capaz de detectar animais fracamente positivos nos estágios iniciais da infecção (ISSEL & COOK, 1993); ou reações inespecíficas que podem dificultar a interpretação dos resultados positivos (ALVAREZ *et al.*, 2007).

Testes de ELISA também foram produzidos utilizando as glicoproteínas do envelope viral, gp45 e gp90. Entretanto as reações positivas para a gp45 recombinante (rp) não puderam comprovar se o antígeno continha epitopos conservados, o que pode ter resultado em falso-positivos no teste (LEW *et al.*, 1993).

Por outro lado kits de ELISA produzidos com a rpGp90 apresentaram vantagens frente ao IDGA devido a capacidade de detectar precocemente anticorpos anti-gp90, que são os

primeiros a aparecerem no sangue e os mais abundantes, diminuindo o número de resultados falsos-negativos (REIS, 1997).

Métodos de ELISA indiretos usando peptídeos sintéticos, proteínas do capsídeo purificadas ou recombinantes têm sido amplamente explorados e descritos na literatura (ARCHAMBAULT *et al.*, 1989; ISSEL & COOK, 1993; SOUTULLO *et al.*, 2001 PARE & SIMARD, 2004; SCICLUNA *et al.*, 2013; ALVAREZ *et al.* 2015).

### C) Sistema de tripla-triagem (*three-tiered diagnostic system*)

O sistema de tripla-triagem utiliza o ELISA como primeira escolha e o IDGA como confirmatório. Embora o IDGA seja altamente específico, ele é relativamente insensível, estudos recentes demonstraram um aumento de 17% nos casos de EIAV positivos quando o soro era testado por ELISA (SCICLUNA *et al.*, 2013; ISSEL *et al.*, 2014). Estes resultados levaram a adoção do sistema de tripla-triagem. Neste caso todas as amostras positivas por ELISA são confirmadas por IDGA. Quando estes testes discordam, o terceiro teste sorológico utilizado é o *Western-blotting* (WB), que deve ser utilizado a fim de se esclarecer o resultado final. O WB detecta anticorpos direcionados contra os três principais antígenos de EIAV (p26, gp90 e gp45) e tem provado ser altamente sensível (ISSEL *et al.*, 2014).

### 2.3.2.3 Detecção molecular

#### A) Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Uma alternativa ao uso dos testes sorológicos é o diagnóstico molecular por PCR. Um método sensível e específico, que tem sido proposto como método de diagnóstico confirmatório para a AIE e outras retrovirose (KIM & CASEY, 1994; LANGEMEIER *et al.*, 1996).

Diversos trabalhos demonstram resultados promissores com protocolos de PCR altamente específico e sensível em amplificar sequências específicas do genoma do EIAV; a

especificidade do teste é geralmente satisfatória quando são usados iniciadores dirigidos a uma região conservada do genoma do EIAV, tais vantagens da PCR permitem considerar o seu futuro uso como teste confirmatório para a AIE (KIM & CASEY, 1994; LANGEMEIER *et al.*, 1996; OAKS *et al.*, 1998; NAGARAJAN *et al.*, 2001; CAPELLI *et al.*, 2011).

A PCR pode ser utilizada para detecção de RNA viral no soro (RT-PCR) ou DNA proviral nas células do sangue, identificando animais recentemente infectados ou em estágios subclínicos (MCCONNELL *et al.*, 1983; ISSEL & COOK, 1993; LANGEMEIER *et al.*, 1996; OAKS *et al.*, 1998).

Pesquisas utilizando PCR para detectar o DNA proviral de EIAV mostraram que a técnica é sensível e específica não só para identificar animais em estágio subclínico, como também animais recentemente infectados e potros com anticorpos colostrais que interferem na correta interpretação dos testes sorológicos (ISSEL & COGGINS, 1979; ISSEL & COOK, 1993).

Entretanto alguns trabalhos contestam a sensibilidade da técnica devido à ocorrência de resultados falsos negativos por PCR, proveniente de animais positivos sorologicamente, demonstrando a baixa concordância entre os testes sorológicos e a PCR, ou até mesmo a baixa reprodutibilidade da técnica (BIENZLE *et al.*, 2004; HIRSCH, 2005; ISSEL & FOIL, 2015). Resultados falsos negativos por PCR podem acontecer na fase final de viremia, devido a insuficiente número de células infectadas ou baixo número de cópias de DNA proviral por célula (SANTOS *et al.*, 2010). De acordo com Issel e Foil (2015) a PCR é uma técnica de difícil implantação como rotina de diagnóstico devido principalmente às altas taxas de mutação e diversidade do genoma do EIAV na natureza. Outros fatores que também influenciam na aplicabilidade da PCR são (i) os *primers* (e sondas) utilizadas que estão baseadas em regiões altamente conservadas do genoma viral, variações nestas sequências podem inibir ou mesmo reduzir significativamente a detecção e (ii) técnicas baseadas em PCR precisam ser sensíveis o suficiente para detectar o ácido nucleico específico de EIAV em baixíssimas concentrações presente em alguns animais portadores assintomáticos. Infelizmente até o momento nenhum ensaio baseado em PCR apresentou estes critérios (ISSEL *et al.*, 2014).

Protocolos de diagnóstico baseados em PCR são importantes ferramentas para detecção precoce de ácidos nucleicos do vírus tendo alta sensibilidade de diagnóstico; para o sucesso do PCR é necessário o conhecimento da sequência genética do EIAV. Recentemente, um aumento do número de sequências do EIAV isoladas de campo, de diferentes partes do

mundo, foram publicadas em bases de dados públicas, facilitando o desenho de iniciadores das reações de PCR (CAPPELLI, *et al.*, 2011).

## 2.4 CONTROLE E PROFILAXIA

A AIE não tem cura nem tratamento eficaz; devido à ausência de vacinas com comprovada eficácia o controle da doença nos equídeos se baseia em práticas de manejo adequadas, identificação sorológica dos animais infectados, segregação ou eutanásia dos mesmos (MONTELARO *et al.*, 1993).

No Brasil, o controle e a profilaxia da AIE seguem as medidas previstas no Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), e atualmente está em vigor a Instrução Normativa número 45, de 15 de junho de 2004, que contem as normas para o controle da AIE no país (BRASIL, 2004).

Quando se detecta um foco de AIE as seguintes medidas são preconizadas pelo MAPA: interdição da propriedade, cumprimento do termo de interdição, notificação ao proprietário da proibição de trânsito dos equídeos da propriedade e da movimentação de fômites passíveis de veiculação do vírus; investigação epidemiológica de todos os animais que reagiram ao teste de diagnóstico da AIE, incluindo histórico de trânsito; marcação permanente dos equídeos portadores da AIE, através da aplicação de ferro candente, na paleta do lado esquerdo com um “A”, contido em um círculo de oito centímetros de diâmetro, seguido da sigla da unidade federativa (UF), conforme modelo do MAPA; eutanásia, que deverá ser rápido e indolor, sob responsabilidade do serviço veterinário oficial, de acordo com a Instrução Normativa Nº 45, ou isolamento dos equídeos portadores; realização de exame laboratorial, para o diagnóstico da AIE, de todos os equídeos existentes na propriedade; desinterdição da propriedade foco após realização de 2 (dois) exames com resultados negativos para AIE, consecutivos e com intervalo de 30 (trinta) a 60 (sessenta) dias, nos equídeos existentes; orientação aos proprietários das propriedades que se encontrarem na área perifocal, pelo serviço veterinário oficial, para que submetam seus animais a exames laboratoriais para diagnóstico de AIE (BRASIL, 2004).

Segundo a legislação a doença é de notificação obrigatória, sendo que animais destinados ao comércio, trânsito, participação em exposições, feiras e competições devem ser

necessariamente testados e, apresentar resultado negativo por IDGA (FRANCO & PAES, 2011).

As principais medidas de controle são: isolamento ou eutanásia dos animais positivos; uso individual de seringas e outros utensílios que possam transmitir o vírus; controle de vetores em áreas endêmicas; e evitar o contato entre animais de “status” sanitário desconhecido (SILVA *et al.*, 2001; RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

Regiões com alta prevalência da AIE, como o Pantanal brasileiro, adotam como prática para o controle da doença a segregação dos animais soropositivos, já que a eutanásia de grande número de animais comprometeria ou mesmo inviabilizaria a pecuária extensiva praticada como principal atividade econômica da região (SILVA *et al.*, 2001).

Para Issel e Foil (2015) a transmissão da AIE pode ser controlada através da identificação e segregação dos animais positivos a uma distância de pelo menos 200 metros de outros equídeos; esta distancia deve ser considerada como segura para evitar a transmissão pelo inseto vetor.

Nas últimas décadas, os ensaios para o desenvolvimento de uma vacina contra o EIAV produziram um amplo espectro de resultados, que vão desde a reprodução da doença até a imunidade potencial após desafio com vírus homólogos. No entanto, a associação entre proteção contra a doença "versus" infecção não foi ainda claramente esclarecida, e podem variar dependendo do tipo de vacina empregada (COOK *et al.*, 2013).

Como com outras doenças infecciosas, as vacinas atenuadas parecem oferecer o mais alto nível de eficácia possivelmente porque a replicação contínua é necessária para estimular a maturação da resposta imune equina. Como demonstrado pelo programa maciço de vacinação com o EIAV<sub>FDDV1</sub> atenuado, implementado na China, a proteção contra a doença em grandes populações de equídeos pode ser uma meta atingível (MA *et al.*, 2014).

Ma e col. (2014) relatam que a vacina atenuada Chinesa foi capaz de proteger milhares de animais nas últimas décadas. Tal vacina surgiu a partir de cultura de macrófagos pré-infectados com a cepa atenuada EIAV<sub>FDDV1</sub>. Tais cultivos apresentaram forte resistência à infecção, *in vitro*, pela cepa virulenta EIAV<sub>UK3</sub>. Estes achados estão de acordo com prévios estudos realizados por Maury e col. (2003) que demonstram que provavelmente ocorre um “disfarce” do receptor ELR-1 quando este se liga a SU de uma primo-infecção, não permitindo uma segunda infecção, este fenômeno é denominado de resistência a superinfecção.

No entanto, estudos subsequentes com esta vacina atenuada mostraram que a mesma não é capaz de induzir imunidade contra cepas heterólogas. Além disso, o risco de reversão

não deve ser negligenciado no caso de vacinas virais atenuadas, especialmente quando consideramos a notável plasticidade do genoma do lentivírus (COOK *et al.*, 2013).

Finalmente, o fato destas vacinas atenuadas provocarem respostas humorais que são indistinguíveis das induzidas por infecções naturais, a vacinação é incompatível com todos os programas de controle da AIE baseados em testes serológicos. Portanto, o uso generalizado de vacinas atenuadas não é, neste momento, aplicável como uma estratégia de gestão de EIAV a médio-longo prazo (COOK *et al.*, 2013; ISSEL *et al.*, 2014).

Até o momento nenhuma vacina está aprovada para uso no Brasil (BRASIL, 2004).

Assim como na China, em Cuba também se preconiza a vacinação dos equídeos com cepas atenuadas, entretanto a proteção também parece ser apenas contra amostras homólogas àquelas usadas como antígeno (MONTELARO *et al.*, 1993).

## 2.5 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA NO BRASIL E NO MUNDO

A AIE é uma doença de distribuição mundial, e tem considerável importância na equideocultura. Com exceção do continente Antártico, a doença é endêmica em várias partes do mundo e a prevalência pode atingir 70% dos animais adultos (RAVAZOLLO & COSTA, 2007).

Recentes surtos reportados na Bélgica, Bósnia, Croácia, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Irlanda, Itália, Letônia, Romênia, Sérvia e Reino Unido, entre os anos de 2007 e 2014 ocasionaram importantes impactos financeiros ao setor equino. Sendo que apenas na Itália e na Romênia a doença é relatada como endêmica (BOLFA *et al.*, 2016).

A prevalência da AIE é bastante variável, na Índia, pesquisa utilizando 67.042 amostras de soro, coletadas entre 1999 e 2012 demonstraram soropositividade para AIE apenas em duas amostras (MALIK *et al.*, 2013) e no Sudão a prevalência do vírus foi de 5,58% para o período de 2008 a 2013 (WEGDAN *et al.*, 2017).

Na Espanha a doença não é reportada desde 1983, mesmo com a re-emergência da doença em alguns países da Europa (CRUZ *et al.*, 2015)

O Brasil ocupa a terceira posição mundial em relação ao número de equídeos após o México e a China (OIE, 2012). Sendo a Bahia, o primeiro estado do Brasil em relação ao quantitativo destes animais (IBGE, 2006), com 3.864.42 equídeos.

Devido a grande extensão territorial e características geo-climáticas diferentes em cada unidade federativa, a prevalência da AIE no Brasil varia imensamente. No Norte do país, na ilha de Marajó, a prevalência da AIE é de 46,26% (FREITAS *et al.*, 2015), em Uruará, município do estado do Pará relatou-se 17,71% (HEINEMMAN *et al.*, 2002) entretanto Pena e col (2006) relataram uma prevalência de 1,34% nos equídeos do Sul do Pará. Estudos de prevalência no estado de Mato Grosso do Sul, no município de Poconé relatam 52,2% de prevalência entre as propriedades testadas e 31,5% dos animais soropositivos para AIE (BORGES *et al.*, 2013). Minas gerais é o segundo estado em quantitativo de equídeos no Brasil, sendo o primeiro no rebanho equino (IBGE, 2006), de acordo com Bicout e col. (2006) no período de 2002 a 2004 a prevalência da AIE no estado foi de 2,8%. Devido a grande extensão territorial dados de prevalência da AIE variam desde 0.07% até 5.1% (ALMEIDA *et al.*, 2006; NOCITI *et al.*, 2007).

Os dados epidemiológicos a cerca da prevalência da AIE na Bahia são insuficientes e estão defasados em relação ao tempo, alguns levantamentos sorológicos demonstram valores entre 5,9% até 35% de soropositividade (GUIMARAES *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2012a; ROSA *et al.*, 2012b). Enquanto dados não divulgados da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) aponte alguns municípios como os principais focos de AIE na Bahia (Serra do Ramalho, Barreiras e Bom Jesus da Lapa), em números absolutos, foram diagnosticados mais de 400 casos no ano de 2009.

A Bahia tem a maior população de equídeos do Brasil (IBGE, 2006) mas a AIE ainda é uma doença negligenciada na região, outros estados já realizaram estudos sobre as condições locais que determinam a distribuição da doença, fatores de risco ou pontos críticos do programa elaborando inclusive planos regionais específicos (BORGES *et al.*, 2013).

## REFERENCIAS

- ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. ; HADDAD, J. P. A.; DIAS, R. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 141-148, 2006.
- ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; OSTUND, E.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Western blot assay using recombinant p26 antigen for detection of equine infectious anemia virus-specific antibodies. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.14, p.1616-1648, 2007.
- ALVAREZ, I.; CIPOLINI, F.; WIGDOROVITZ, A.; TRONO, K.; BARRANDEGUY, M.E. The efficacy of ELISA comercial kits for the screening of equine infectious anemia vírus infection. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.47, n.1, p.25-28, 2015.
- ARAÚJO J.M.; FERRÃO I.D.; FREITAS, D.C. Prevalência da Anemia Infecciosa Equina (AIE) nos municípios de Itapé e Barro Preto, Estado da Bahia, 2007. Disponível em:< [www.adab.ba.gov.br/comunicacao/artigos](http://www.adab.ba.gov.br/comunicacao/artigos)> Acesso: 17 dez.2006.
- ARCHAMBAULT, D.; WANG, Z.; LACAL, J.C.; GAZIT, A.; YANIV, A.; DAHLBERG, J.E.; TRONIK, S.R. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent assay for equine infectious anemia virus detection using recombinant Pr55<sup>gag</sup>. **J. Clin. Microbio.**, v.7, p.1167-1173, 1989.
- BACCAM, P.; THOPSON, R.J.; LI, Y.; SPARKS, W.O.; BELSHAN, M.; DORMAN, K.S.; WANNEMUEHLER, Y.; OAKS, L.; CORNETTE, J.L.; CARPENTER, S. Subpopulations of equine infectious anemia virus Rev coexist in vivo and differ in phenotype. **J. Virol.**, v.77, p.12122-12131, 2003.
- BENTON, C.V.; BROWN, B.L.; HARSHMAN, J.S.; GILDEN, R.V. In vitro host range of equine infectious anemia virus. **Intervirology**, n.16, p.225-232, 1981.
- BICOUT, D.J.; REGGETU, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The Distribution of equine infectious anemia in horses in the north of Minas Gerais State, Brazil. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, p.479-482, 2006.
- BIENZLE, D.; REGGETU, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus. **Can.Vet.J.**, v.45, p.753-757, 2004.
- BOLDBAATAR, B.; BAZARTSEREN, T.; KOBAYASHI, R.; MURAKAMI, H.; OGUMA, K.; MURAKAMI, K.; SENTSU, H. Amplification of complete gag gene sequences from geographically distinct equine infectious anemia virus isolates. **J. Virological Methods**, v.189, p.41-46, 2013.
- BOLFA, P.; NOLF, M.; CADORÉ, J-L.; CATOIS, C.; ARCHER, F.; DOLMAZON, C.; MORNEX, J-F.; LEROUX, C. Interstitial lung disease associated with Equine infectious anemia vírus infection in horses. **Vet. Res.**, n.44, v.113, 2013.
- BOLFA, P.; BARBUCEANU, F.; LEAU, S.-E.; LEROUX, C. Equine infectious anemia in Europe: time to re-examine the efficacy of monitoring and control protocols? **Equine veterinary Journal**, v.48, p.140-142, 2016.

BORGES, A.M.C.M.; SILVA, L.G.; NOGUEIRA, M.F.; OLIVEIRA, A.C.S.; SEGRI, N. J.; FERREIRA, F.; WITTER, R.; AGUIAR, D.M. Prevalence and risk factors for the equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.76-81, 2013.

BRASIL. 2004. Normas para a prevenção e controle da Anemia Infecciosa Equina- **Instrução normativa 45**, 15 de junho de 2004. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil.

CAPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COOK, F.R.; FELICETTI, M.; MARENZONI, M.L.; COPPOLA, G.; VERINI-SUPPLIZI, A.; COLETTI, M.; PASSAMONTI, F. Molecular detection, epidemiology and genetic characterization of novel european fields isolates of equine infectious anemia virus. **J.Cli.Microbio.**, v.49, p.27-33, 2011.

CAPOMACCIO, S.; CAPELLI, K.; COOK, R.F.; NARDI, F.; GIFFORD, R.; MARENZONI, M.L.; PASSAMONTI, F. Geographic structuring of global EIAV isolates: a single origin for New World strains? **Virus Res.**, v.163, p.656-659, 2012.

CARPENTER, S.; EVANS, L.H.; SEVOIAN, M.; CHESEBRO, B. Role of the host immune response in selection of equine infectious anemia virus variants. **J. Virol.**, v.61, p.3783–3789, 1987.

CHEEVERS, W.P.; MCGUIRE, T.C. Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. **Rev. Infect. Dis.**, v.7, p.83-88, 1985.

CHEN, C.; LI, F.; MONTELARO, R.C. Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in budding and infection. **J. Virology**, v.75, n.20, p.9762-9770, 2001.

CHONG, L.; COOK, S.J.; CRAIGO, J.K.; COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C.; HOROHOV, D.W. Epitope shifting of gp90-specific cellular immune responses in EIAV-infected ponies. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.161, p.161-169, 2014.

CHUNG, C.; MEALEY, R.H.; MACGUIRE, T.C. CTL from EIAV carrier horses with diverse MHC class I alleles recognize epitope clusters in Gag matrix and capsid proteins. **Virology**, v.327, p.144-154, 2004.

CLAPHAM, P.R.; MCKNIGHT, A. Cell surface receptor virus entry and tropism of primate lentivirus. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.1809-1829, 2002.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infectious. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996.

COFFIN, J.M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E. **Retroviruses**. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19376> > acesso: 06 de março de 2016.

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

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

COOK, R.F.; LEROUX, C.J.; ISSEL, C.J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. **Vet. Microbiol.** (2013) doi:10.1016/j.vetmic.2013.09.031

- COUTINHO, L.C.; JESUS, A.L.S.; FONTES, K.F.L.P.; COIMBRA, E.C.; NARIZ, F.C.; FREITAS, A.C.; MAIA, R.C.C.; CASTRO, R.S. Production of equine infectious anemia virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. **J.Virology Methods**, v.191, p.95-100, 2013.
- COVALEDA, L.; FULLER, F.J.; PAYNE, S.L. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. **Virology**, v.397, p.217-223, 2010.
- CRUZ, F.; FORES, P.; IRELAND, J.; MORENO, M.A.; NEWTON, R. Freedom from equine infectious anaemia virus infection in Spanish purebred horses. **Vet. Rec. Open**, (2015) doi:10.1136/vetreco-2014-000074.
- DESROSIERS, R.C. Nonhuman Lentiviruses. In: **Fields Virology**. Knipe, D.M.; Howley, P.M (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Fifth ed. pp. 2215-2241, 2007.
- DOMINGO, E.; ESCARMIS, C.; SEVILLA, N.; MOYA, A.; ELENA, S. F.; QUER, J.; NOVELLA, I. S. AND HOLLAND, J. J. Basic concepts in RNA virus evolution. **FASEB J.**, v.10, p.859–864. 1996.
- DONG, J.; ZHU, W.; COOK, F.R.; GOTO, Y.; HORII, Y.; HAGA, T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern japan. **J.Gen.Virol.**, v.94, p.360-365, 2013.
- DONG, J.; COOK, F.R.; HAGA, T.; HORII, Y.; NORIMINE, J.; MISAWA, N.; GOTO, Y.; ZHU, W. Comparative analysis of LTR and structural genes in an equine infectious anemia virus strain isolated from a feral horse in Japan. **Arch. Virol.**, v.159, p.3413-3420, 2014.
- DUPONT, O. Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 11. Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, 1968, Niterói. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 160-161, 1968.
- EIGEN, M. Viral quasispecies. **Sci. Am.**, v.269, p.42–49, 1993.
- FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. Y.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 155-156, 1983.
- FRANCO, M.M.J.; PAES, A.C. Anemia Infecciosa Equina. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.2, p.197-207, 2011.
- FREITAS, N.F.Q.R.; OLIVEIRA, C.M.C.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, F.G.; BOMJARDIM, H.A.; SALVARANI, F.M.; BARBOSA, J.D. Equine infectious anemia on Marajó Island at the mouth of the Amazon river. **Pesq. Vet. Bras.**, v.35, p.947-950, 2015.
- GOFF, S.P. Retroviridae: the Retroviruses and their replication. In: **Fields Virology**. Knipe, D.M., Howley, P.M (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Fifth ed. pp. 1999-2069, 2007.
- GONÇALVES, C.M.; RIBEIRO, R.M.G. Anemia Infecciosa Equina: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.4, 2005.
- GUERREIRO, M.G.; BAUER, A.G.; GLOSS, R.M. **Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor**, n.1/2, p.3-4, 1968.

GUIMARÃES, L.; BEZERRA, R.A.; MENDONÇA, D.; D'AFONSECA O.; ALBUQUERQUE, R. Prevalência do vírus da anemia infecciosa equina na mesorregião do sul baiano, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, p.79-82, 2011.

HAMMOND, S.A.; RAABE, M.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Evaluation of antibody parameters as potencial correlates of protection or enhancement by experimental vaccines to equine infectious anemia virus. **Virology**, v.262, p.416-430, 1999.

HAMMOND, S.A.; LI, F.; MCKEON, B.M.S.; COOK S.J.; ISSEL C.J.; MONTELARO R.C. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. **J. Virol.**, v.74, p.5968–5981, 2000.

HAWKINS J.A.; ADAMS W.V.; WILSON B.H.; ISSEL C.J.; ROTH E. E. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.168, p.63-64, 1976.

HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; SOUZA, M.C.C.; GOTTI, T.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; CUNHA, E.M.S.; RICHTZENHAIN, L.J. Seroprevalence of equine infection anemia, equine viral arteritis and equine viral abortion in Uruará municipality, Pará state, Brazil. **Braz. J.vet. Res. anim.Sci.**, v.39, n.1, p.50-53, 2002.

HIRSCH, C. **Caracterização molecular do vírus da leucose enzootica bovina: análise filogenética das regiões gênicas 5`LTR e pol de amostras brasileiras**, 2005. Tese (doutorado), Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HOWE, L.; LEROUX, C.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. **J. Virol.**, v.76, p.10588–10597, 2002.

IBGE. *Banco de dados agregados*. 2006. Disponível em:< <http://www.sidra.ibge.gov.br> >Acesso em: 04 jul 2015.

ISSEL, C.J.; COGGING, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.174, p.737-733, 1979.

ISSEL, C.J.; COOK, R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 5, 137–141. 1993.

ISSEL, C.J.; FOIL, L.D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. **J.Am. Vet. Med. Assoc.**, v.184, p.293-297, 1984.

ISSEL, C.J.; FOIL, L.D. Equine infectious anaemia mechanical transmission: man and the wee beasties. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.34, n.2, p.513-523, 2015.

ISSEL, C.J.; COOK, R.F.; MEALEY, R.H.; HOROHOV, D.W. Equine infectious anemia in 2014: Live with or eradicate it? **Vet. Clin. Equine**, v.30, p.561-577, 2014.

- JIN, S.; CHEN, C.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus gag p9 function in early steps of virus infection and provirus production. **J. Virol.**, v.79, n.14, p.8793-8801, 2005.
- KIM, C.H.; CASEY, J.W. Genomic variation and segregation of infectious anemia virus during acute infection. **J. Virol.**, v.66, p.3879-3882, 1992.
- KIM, C.H.; CASEY, J.W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. **J. Virology**, v. 66, p. 3879-3882, 1994.
- KONO, Y.; YOSHINO, T.; FUKANAGA, Y. Growth characteristics of equine infectious anemia virus in horse leukocytes cultures. **Arch. Virol.**, v.30, p252-256, 1970.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. **Arch. Virol.**, 41:1-10, 1973.
- KREBS, F.C.; HOGEN, T.H.; QUITERIO, S.; GARTNER, S.; WIGDAHL, B. **Lentiviral LTR-directed expression, sequence, variation and disease pathogenesis**, 2001. Disponível em: <[www.hmc.psu.edu/wigdahl](http://www.hmc.psu.edu/wigdahl)> Acesso: 28 jul. 2016.
- KUHAR, U.; MALOVRH, T. High genetic diversity of equine infectious anemia virus strains from Slovenia revealed upon phylogenetic analysis of the p15 gag gene region. **Equine Vet. J.**, v.48, n.2, p.205-210, 2015.
- LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. **J. Clin. Microbio.**, v.34, p.1481-1487, 1996.
- LEROUX C.; ISSEL C.J.; MONTELARO R.C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic *quasispecies* associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. **J. Virol.**, v.71, p.9627–9639. 1997.
- LEROUX, C.; CRAIGO, J.K.; ISSE, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. **J. Virol.**, v.75, p.4570–4583. 2001.
- LEROUX, C.; CADORÉ J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Vet. Res.**, v. 35, p. 485-512, 2004.
- LEW, A.M.; THOMAS, L.M.; HUNTINGTON, P.J. A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion test for detecting antibody to equine infectious anemia virus. **Vet. Microb.**, v. 34, p.1-5, 1993.
- LICHTENSTEIN, D.L.; RUSHLOW, K.E.; COOK, R.F.; RAABE, M.L.; SWARDSON, C.J.; KOCIBA, G.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. **J. Virol.**, v.69, n.5, p.2881-2888, 1995.
- LICHTENSTEIN, D.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Genomic quasispecies associated with the initiation of infection and disease in ponies experimentally infected with equine infectious anemia virus. **J. Virol.** v.70, p.3346–3354. 1996.

- LIM, W.; PAYNE, S.L.; EDWARDS, J.F.; KIM, I.; BALL, J.M. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. **Virology**, v.332, p.295-306, 2005.
- LIU, Q.; WANG, X.; MA, J.; HE, X.; WANG, X.; ZHOU, J. Characterization of equine infectious anemia virus integration in the horse genome. *Viruses*, v.7, p. 3241-3260, 2015.
- MA, J.; WANG, S.; LIN, Y.; LIU, H.; LIU, Q.; WEI, H.; WANG, X.; WANG, Y.; DU, C.; KONG, X.; ZHOU, J.; WANG, X. Infection of equine monocyte-derived macrophages with an attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) strain induces a strong resistance to the infection by a virulent EIAV strain. **Vet. Res.**, v.45, n.82, 2014.
- MALMQUIST, W.A.; BARNETT, D.; BECVAR, C.S. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. **Arch. Virol.**, n.42, p.361-370, 1973.
- MCCONNELL, S.; KATADA, M.; DARNTON, S. M. Occult equine infectious anemia in an immunosuppressed serologically negative mare. **Equine Practice**, v.5, p.32-39, 1983.
- MCGUIRE T.C.; TUMAS D.B.; BYRNE K.M.; HINES M.T.; LEIB S.R.; BRASSFIELD A.L.; O'ROURKE K.I.; PERRYMAN L.E. Major histocompatibility complex- restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins. **J. Virol.**, v.68, p.1459–1467, 1994.
- MACGUIRE, T.C.; FRASER, D.G.; MEALEY, R.H. Cytotoxic T lymphocytes in protection against equine infectious anemia virus. **Animal Health Research Reviews**, v.5, n.2, p.271-276, 2004.
- MALIK, P.; SINGHA, H.; GOYAL, S.K.; KHURANA, S.K.; KUMAR, R.; VIRMANI, N.; SHAMUGASUNDARAM, K.; PANDEY, S.B.; KANT, R.; SINGH, B.K.; SINGH, R.K. Sero-surveillance of equine infectious anemia virus in equines in India during more than a decade (1999-2012). *Indian J. Virol.*, v.24, p.386-390, 2013.
- MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. **J. Virol.**, v.68, p.6270–6279, 1994.
- MAURY, W. Regulation of equine infectious anemia virus expression. **J. Biomed Sci.**, v5, p.11-23, 1998.
- MAURY, W.; OAKS J.L.; BRADLEY S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. **J. Virol.**, v.72, p.9291–9297, 1998.
- MAURY, W.; WRIGHT, P.J.; BRADLEY, S. Characterization of a cytolytic strain of EIAV. **J. Virol.**, v.77, p.2385-2399, 2003.
- MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.K.; PORTER, J.P. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p.50-52, 1989.
- MEALEY, R.H.; ZHANG, B.; LEIB, S.R.; LITTKE, M.H.; MCGUIRE, T.C. Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus. **Virology**, v.313, p.537–552, 2003.

- MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método de máxima parcimônia. In: **Biologia molecular e de evolução**. Fernandes, F.M.C.; Matioli, S.R. (Eds). 2ed., Ed. Holos, 257p., 2012.
- MONTELARO, R.C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia, a retrovirus. **J. Biol. Chem.**, v.16, p.10539–10544, 1984.
- MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.) **The retroviridae**. New York: Plenum Press, v. 2, cap. 5, p. 257-359, 1993.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary virology**. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press; 1999.
- NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **J. Viro. Methods**, v.34, p.97-109, 2001.
- NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. **Virus Research**, v.129, p. 228-235, 2007.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.1617-1639, 1989.
- NOCITI, D.L.P.; SENNA, D.; REGO, C.L.P. Anemia Infecciosa Equina em Equídeos de tração no município de Cuiabá, MT, Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.29, p.165-167, 2007.
- OAKS, J. L.; MCGUIRE, T.C.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T.B. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **J. Virol.**, p.7263–7269, 1998.
- OAKS, J.L.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T.B. Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anemia virus. **J. Virol.**, v. 80, p.2393-2397, 1999.
- OIE – Organização mundial de saúde animal. **Manual of standards diagnostic tests and vaccines**. 2013 Disponível em: <[www.oie.int](http://www.oie.int)> Acesso: 21 mar.2014
- PARE, J.; SIMARD, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. **The Can. J. Vet. Res.**, v.68, p.254-258, 2004.
- PAYNE, S.; PAREKH, B.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Genomic alterations associated with persistent infections by equine infectious anemia virus, a Retrovirus. **J. Gen. Virol.**, v.65, p.1395-1399, 1984.
- PAYNE, S.L.; FANG, F.D.; LIU, C.P.; DHARVA, B.R.; RWAMBO, P.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. **Virology**, v.161, p.321-334, 1987.
- PENA, L.J.; PENA, D.A.; BARRIOS, P.R.; DALE, R.; LAMÊGO, M.R.A.; MORAES, M.P. Levantamento soro-epidemiológico da infecção pelo vírus da Anemia Infecciosa Equina, da

Influenza Equina-2 e do Herpesvírus Equino-1 em rebanhos do sul do Estado do Pará, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.43, p.537-542, 2006.

PERRYMAN, L.E.; O'ROURKE, K.I.; MCGUIRE, T.C. Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. **J. Virol.**, v.62, p. 3073–3076, 1988.

PIZA, A.S.T.; PEREIRA, A.R.; TERRERAN, M.T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. **Preventive Vet. Medicine**, v.28, p239-245, 2007.

RAVAZOLLO, A.M.; COSTA, U.M. Retroviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007.

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

REIS, J.K.; LEITE, R.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v.20, p261-267, 1994.

REIS, J.K.; MELO, L.M.; REZENDE, M.R.; LEITE, R.C. Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.26, p.65-68, 1994.

RIVERA, J.A.; MCGUIRE, T.C. Equine infectious anemia virus-infected dendritic cells retain antigen presentation capability. **Virology**, v.335, p. 145-154, 2005.

ROSA, M. R. G.; LOPES, C. ; CURVELO, V. ; RIBEIRO, M. ; BITTENCOURT, D.; MASCARENHAS, M.T ; BAHIA, R.C . Levantamento soroepidemiológico da anemia infecciosa equina nos municípios baianos de Lage e Mutuípe no período de setembro a dezembro de 2009. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais** (PUCPR. Impresso), v. 10, p. 11, 2012a.

ROSA, M. R. G.; MOREIRA, T. B. M. B.; SILVA, A. A. R.; GRAÑA, J. C. S.; SANTOS, M. P. J. B.; RIBAS, J. R. L. Ocorrência da Anemia Infecciosa Equina na Bahia no período de janeiro 2009 a abril 2012. In: III Conferência Nacional sobre Defesa Agropecuária, 2012, Salvador. Resumos III CNDA, 2012b.

SANTOS, E.M.; MOTTA, P.M.C; HEINEMANN, M.B.; LEITE, R.C.; PUERTO, H.L.D.; REIS, J.K.P. EIAV effectiveness detection by nested-PCR comparing two different samples: PBMCs and bronchoalveolar wash. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.5, n.13, p.180-182, 2010.

SANTOS, E.M.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; Anemia Infecciosa Equina. In. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. **Retrovíroses dos Animais Domésticos**, v.64, Belo Horizonte, editora: FEPMVZ:2012, p.73-84.

SAXENA, S.K; CHITTI, S.V. Molecular biology and pathogenesis of retroviruses. In: **Advances in molecular retrovirology**. Ed. InTech, p.1-18, 2016. Disponível em:<<http://www.intechopen.com/books/advances-in-molecular-retrovirology>> Acesso: 06 mar.2016

- SCICLUNA, M.T.; ISSEL, C.; COOK, F.R.; MANNA, G.; CERSINI, A.; ROSONE, F.; FRONTOSO, R.; CAPRIOLI, A.; ANTONETTI, V.; AUTORINO, G.L. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anemia? **Vet. Microb.**, v.165, p.123-134, 2013.
- SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus Res.**, v.32, p.111-138, 1994.
- SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSEL, K. E. Equine Infectious Anemia Virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. **J. Virol.**, v. 70, p.590-594, 1996.
- SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; FREITAS, W.M. Ocorrência da anemia infecciosa no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. **Anais.** Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.173-182.
- SILVA, R.A.M.S.; ABREU, U.G.P.; BARROS, A.T.M. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2001. **Circular técnica**, 29.
- SOUTULO, A.; VERWIMP, V.; RIVEROS, M.; PAULI, R.; TONARELLI, G. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. **Vet. Mic.**, v. 79, p. 111-121, 2001.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. **Vet. Mic.**, v. 95, p. 49-59, 2003.
- STAKE, M.S.; BANN, D.V.; KADDIS, R.J.; PARENT, L.J. Nuclear trafficking of retroviral RNAs and gag proteins during late steps of replication. **Viruses**, v.5, p.2767-2795, 2013.
- TASHJIAN, R.J. Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.184, p.282-288, 1984.
- TORNQUIST, S.J.; OAKS, J.L.; CRAWFORD, T.B. Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anemia. **J. Gen. Virol.**, v.78, p.2541-2548, 1997.
- WEGDAN, H.A.; SAHAR, M.E.; BALLAL, A.; INTISAR, K.S.; SHAZA, M.M.; ALGEZOLI, O.A.; IHSAN, H.A.; BARAA, A.M.; TAHA, K.M.; NADA, E.M.; MANAN, A.A; ALI, Y.H.; NOURI, Y.M. Sero prevalence of equine infectious anemia (EIA) virus in selected regions in Sudan. **Microbiology Research Journal International**, v.18, p.1-6, 2017.
- WILLIAMS, D.L.; ISSEL, C.J.; STEELMAN, C.D.; ADAMS, W.V.; BENTON, C.V. Studies with equine infectious anemia virus: Transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. **Am. J. Vet. Res.**, v.42, n.9, p.1469-1473, 1981.
- ZHANG, W.; AUYONG, D.B.; OAKS, J.L.; MCGUIRE, T.C. Natural variation of equine infectious anemia virus gag protein cytotoxic T lymphocytes epitopes. **Virology**, v.261, p.242-252, 1999.

ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J.; LI, F.; MONTELARO, R.C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophages-tropic equine lentivirus. **Pnas**, v. 102, n.28, p.9918-9923, 2005.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar a interação entre a resposta imunológica humoral e a infecção viral em animais portadores assintomáticos do EIAV.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar técnicas de diagnóstico ao padrão ouro e a concordância entre as mesmas;
- Detectar a presença do vírus através de técnicas moleculares;
- Analisar as sequências genéticas do EIAV para um estudo filogenético;
- Estudar as variações genéticas em associação com o relatado em outras regiões do país.

## **MANUSCRITO 1**

**Submetido a Veterinary Microbiology**

### **THE USE OF AGAR GEL IMMUNODIFFUSION TEST TO DIAGNOSIS OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (EIAV) AND ITS EFFECTIVENESS FOR CONTROLLING THE DISEASE IN BRAZIL.**

Dellane Martins Tigre<sup>1</sup>, Silvia Ines Sardi<sup>2</sup>, Camila Fonseca Lopes Brandão<sup>3</sup>, Gubio Soares Campos<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

<sup>3</sup> Instituto Federal Baiano (IFBA), Santa Inês, Brazil

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	VETMIC_2017_59
<b>Title</b>	The use of agar gel immunodiffusion test to diagnosis of equine infectious anemia virus (EIAV) and its effectiveness for controlling the disease in Brazil.
<b>Article type</b>	Short Communication

### Abstract

Equine infectious anemia (EIA) is an infectious disease of viral etiology limited to animals of the Equidae family. Infected animals, after the acute period of the disease, with moderate to severe symptomatology recover and become asymptomatic carriers of the virus throughout life. The EIA does not have effective treatment or vaccine. Clinical diagnosis is difficult because clinical signs are not specific and most animals become asymptomatic carriers of the virus. Therefore laboratory diagnosis becomes essential for the identification of infected animals. The aim of this work was, thus, to demonstrate that asymptomatic EIAV carrier animals present detectable virus and/or proviral DNA when molecular techniques are used. In this study, 82 serum and PBMC samples from EIAV asymptomatic carriers were analyzed by agar gel immunodiffusion test (AGIDT), nested-RT-PCR and nested-PCR. Of the total 51 samples (62.2%) were positive by nested-PCR, whereas only 34 samples (41.5%) were positive by AGIDT. By nested-RT-PCR it was possible to detect the presence of viral RNA in the plasma of serologically negative animals by AGIDT. Thus, using molecular techniques, it was possible to demonstrate that asymptomatic carriers of the EIAV, with different serological status, have virus and /or proviral DNA detectable by PCR, remaining as reservoir of the virus in the establishment, such results demonstrate that EIA control based only on AGIDT needs to be reviewed in Brazil.

<b>Keywords</b>	Equine infectious anemia virus; asymptomatic carriers; AGIDT; PCR.
<b>Manuscript category</b>	Viruses
<b>Corresponding Author</b>	Dellane Martins Tigre
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
<b>Order of Authors</b>	Dellane Martins Tigre, Sílvia Sardi, Camila Fonseca Lopes Brandão, Gubio Campos
<b>Suggested reviewers</b>	Fabio Alexandre Chinalis, Ana Paula de Oliveira Menezes, Lilia Ferreira de Moura Costa, Jenner Reis

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

manuscript 2 re-submit.docx [Manuscript File]

table 1 re-submit.docx [Table]

table 2 re-submit.docx [Table]

highlights 2 re-submit.docx [Highlights]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

## 1. Introduction

Equine infectious anemia (EIA) is an infectious viral disease affecting equids characterized by recurrent fever, thrombocytopenia, edema, anemia and rapid weight loss (Leroux et al., 2004). EIA is caused by equine infectious anemia virus (EIAV) which belongs to the subfamily *Orthoretroviridae* and genus *Lentivirus* in the family *Retroviridae* (Goff, 2007).

In Brazil, works on prevalence of EIA are scarce. As a result of the large territorial extension of the country and lack of rigorous surveillance policy, not all animals undergo testing, what leads to underdiagnosing. Serum-positive teste does not reflect, therefore, the real morbidity rate. In addition, this morbidity may even present variable rate among different regions of the county, mainly due to differences in the vector population, host population and prophylactic practice (Franco and Paes, 2011).

Since EIA is a great problem for national horse breeding, The National Program for Equine Health (Programa Nacional de Sanidade Equina) at Ministry of Agriculture was created in 2004, and one of the objectives is to prevent transmission of EIA by identifying and segregating positive animals (Brasil, 2004). Animal diagnostic is performed by agar gel immunodiffusion test (AGIDT), following recommendation of the World Organization for Animal Health (OIE) (OIE, 2012). Although AGIDT presents excellent specificity, the test has also several shortcomings, such as low sensibility in detecting the infection in its initial stages with low antibodies' levels (Reis et al., 1994; Scicluna et al., 2013).

EIA is a disease that can be kept under control. For this, however, early diagnostic with more advanced techniques should become a key element, providing, consequently, a more efficient health surveillance.

The aim of this work was, thus, to demonstrate that asymptomatic EIAV carrier animals, with different serological status, present detectable virus and/or proviral DNA when

molecular techniques are used. Suggesting, therefore, that regulation of EIA surveillance program based solely in the AGIDT should be revised in Brazil.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Field samples**

The study covered 82 clinically healthy horses (n=70) and mules (n=12), males and females of different ages, coming from diverse properties in the state of Bahia, Brazil. Samples were collected by jugular venipuncture into sterile glass tube for serum, and with EDTA for peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

### **2.2 Agar gel immunodiffusion test (AGIDT)**

Serum samples were tested by AGIDT following the manufacturer's instructions (Biovetech, Brazil) in order to detect EIAV anti-p26 antibodies.

### **2.3 Monocyte-derived macrophage cell culture**

Blood samples were subjected to peripheral blood monocyte cells (PBMC) isolation by Ficoll gradient (Ficoll Plaque-Plus™, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The PBMC were suspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO-BRL) and antibiotics (100UI penicillin G sodium and 100mg of streptomycin sulfate per ml). The suspended PBMC (at least  $10^6$  cells/well) were plated in 24-well microplates and incubated for 2h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>. After this time, the plates were washed so that only monocytes would remain due to adherence, and DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics was added. The monocyte-derived macrophage (MDM) cultures were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> for 14 days. After this period, cultures were stored at -20°C until DNA extraction.

## 2.4 Nucleic acid extraction

Viral RNA was extracted from serum samples according to Trizol® LS Reagent protocol (GIBCO BRL) for further use in amplification by *nested*-RT-PCR. While, for *nested*-PCR amplification, proviral DNA was extracted from MDMs using a QIAamp kit (QIAGEN, Germany).

## 2.5 Molecular analysis

Both *nested*-RT-PCR and *nested*-PCR followed the protocol described by Oaks et al., (1998). A partial sequence of the gene *gag* was amplified, and the PCR product (427bp) were separated by agar gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and detected using a UV transilluminator. To confirm the analytical specificity a total of 15 amplicons sequences was determined by sequencing.

## 2.6 Statistical analysis

The AGIDT was considered as the standard for comparison. The degree of agreement between each pair of test was determined by a *Kappa* (k) test ([www.openepi.com](http://www.openepi.com)).

# 3. Results

## 3.1 Detection of antibodies and viral RNA

Of the 82 serum samples analyzed by AGIDT, 34 (41.5%) were seropositive and 48 (58.5%) were seronegative. The extracted serum viral RNA was detected in 23 (28%) samples, whereas 59 (72%) were negative by *nested*-RT-PCR (Table1). Statistical analysis showed that the *nested*-RT-PCR and AGIDT tests had poor agreement ( $k = 0.108$ ).

When comparing the results, it was observed that 12 samples were positive and 36 samples were negative in both AGIDT and *nested*-RT-PCR. By *nested*-RT-PCR it was

possible to detect the virus in 12 serologically negative samples by AGIDT; however in 22 samples there was no viral detection, although the animals were serologically positive. Interestingly, of these 22 negative samples by *nested*-RT-PCR, proviral DNA extracted from MDM was detected in 20 samples.

### 3.2 Detection of proviral DNA

Of the 82 samples which *nested*-PCR was performed, there was the detection of proviral DNA in 51 (62.2%) and 31 (37.8%) there was no detection (Table 2). Statistical analysis showed that the *nested*-PCR and AGIDT had a moderate agreement ( $k = 0.461$ ).

When comparing the results, 31 samples were positive and 28 samples were negative in both AGIDT and *nested*-PCR. The *nested*-PCR technique was able to detect the virus in 20 samples that had negative serology. However in 3 samples there was no proviral DNA detection, although the animals were serologically positive; of these 3 negative results by *nested*-PCR, it was possible to detect viral RNA in the serum of 2 animals. The sequences, of 15 amplicons were, sequenced and aligned for confirm the specificity of PCR. These sequences were deposited under GenBank accession numbers KC213776-KC213790 and are the first sequences of the gene *gag* isolated from Brazil (Tigre et al., 2016).

## 4. Discussion

The EIAV is responsible for a chronic disease of challenging diagnosis. The adversity in the diagnosis is related to the absence of clinic symptoms, associated to a diagnostic test with low sensitivity. Studies report the low sensitivity of the AGIDT in detecting low levels of antibodies in equids during early stages of the infection (Reis et al., 1994; Scicluna et al., 2013). Ricotti et al., (2016) showed that EIAV nucleic acid can be detected by more the one

PCR protocol, though the animals remained serological negative, tested by AGIDT and/or ELISA<sub>gp45/gp90.</sub>, for up to 24 month.

Some authors call attention for the need to combine the specificity of AGIDT and the sensibility of other diagnostic methods, such as ELISA and/or *Western blotting*, in order to promote diagnostic accuracy for this type of infection (Scicluna et al., 2013).

In this case, molecular assays, such as PCR, may be a great potential test to work as a complementary tool for the serological diagnosis of EIAV (Nagarajan and Simard, 2001; Scicluna et al., 2013; Ricotti et al., 2016).

In the work presented in this article, the molecular test used detected the presence of the EIAV proviral DNA in 24,4 % of the serological negative infected animals, indicating that the molecular assay has greater sensitivity than the AGIDT. Considering the shortcoming of AGIDT, United States and Italy adopted a three-tiered diagnostic system, avoiding false-negative results derived from low sensitivity (Reis et al., 1994; Scicluna et al., 2013).

An essential step to ensure the sensitivity of the molecular test is the *in vitro* differentiation of monocytes into macrophages, which activates viral replication, allowing a successful amplification of the proviral DNA. For each sample to be diagnosed by the molecular test *nested-PCR*, a culture of PBMC was performed, and monocytes were selected by adherence (Maury, 1994; Raabe, 1998).

Some considerations should be taken in account when detecting EIAV proviral DNA in PBMC using molecular assay: (i) 85% of the proviral DNA is concentrated in the spleen and liver tissues (Oaks et al., 1998; Harrold et al., 2000); (ii) the amount of proviral DNA in PBMC of asymptomatic animals is very low (150-350 copies per  $10^5$  cells), while in the acute phase it can reach 16.000 copies (Harrold et al., 2000). Additionally, monocytes infected by EIAV appear cyclically in the blood, and its presence is associated to viremic episodes

(O'Rourke et al., 1991). Any of the above conditions may be the reason for the 3 negative results found by *nested-PCR*.

The absence of clinical signs, undetectable levels of viral RNA in plasma and low frequency of infected cells are all indication of the strong control that the immune system exert on the viral replication during this stage of the infection, restraining the virus to organs of the lymphopoietic system (Maury, 1998; Hammond et al., 2000; Harrold et al., 2000; Leroux et al., 2001).

Another finding of this work was the detection of free virus in plasma of asymptomatic and serum-positive animals. This suggests that the event of viral replication suppression occur during the latent phase of the infection, even when antibodies are present (Spyrou et al., 2003). Nevertheless, other authors propose that the detection of free virus in the presence of antibodies is a consequence of the viral variants or quasispecies that appear in each cycle of the viral replication. Those variants may scape the immune response, causing new viral spikes and the recrudescence of the disease (Leroux et al., 1997; Leroux et al., 2001; Mealy et al., 2003).

This study has demonstrated that equids clinically healthy, though serologically positive, are carriers of the virus, in both: free form and integrated proviral DNA. This finding may indicate that the viral replication occur while still in the presence of antibodies. The animals that are serological negative and asymptomatic, but carriers, such as found in this work, constitute, however, the great source of EIAV transmission within the stud.

## **5. Conclusion**

The course of control of EIA in Brazil are based mainly on a routine serological test, separation of positive animals of the squad or humane euthanasia, besides the restriction of

the animals' movement, testing of new individuals to be placed on the troops, control of insects vectors, and not share anything object that can be vehicle of infected cells (Franco and Paes, 2011)

The test of reference approved by the OIE for the diagnosis of EIAV has limitations, as shown by the results here presented using PCR method; detecting animals positive for EIAV, which were negative for AGIDT. It is, therefore, necessary to rethink the current diagnostic strategy and devise new ones that improve the detection of positive animals in order to promote better and proper methods for the control of EIA in Brazil.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank the Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) for their cooperation in obtaining the samples and to Rejane Hughes Carvalho for language support.

### **Conflict of interest statement**

The authors of this paper do not have any personal or financial relationships with people or organizations that could inappropriately influence the content of the paper.

### **Ethical approval**

Not required by this journal: study based on samples collected from equids subjected to euthanasia due to their disease status.

### **Funding**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

- Brasil, 2004. Normas para a prevenção e controle da Anemia Infecciosa Equina- Instrução normativa 45, 15 de junho de 2004. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil.
- Franco, M.M.J., Paes, A.C., 2011. Anemia Infecciosa Equina. *Veterinária e Zootecnia*, 18, 197-207.
- Goff, S.P., 2007. Retroviridae: the Retroviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M (Eds), *Fields Virology*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1999-2069.
- Hammond, S.A., Li, F., Mckeon, B.M.S., Cook, S.J., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2000. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 74, 5968–5981.
- Harrold, S.M., Cook, S.J., Cook, R.F., Rushlow, K.E., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2000. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J. Virol.* 74, 3112-3121.
- Issel, C.J., Cook, R.F., Mealey, R.H., Horohov, D.W., 2014. Equine infectious anemia in 2014: Live with or eradicate it? *Vet. Clin. Equine.* 30, 561-577.
- Leroux, C., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 1997. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic *quasispecies* associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J. Virol.* 71, 9627–9639.
- Leroux, C., Craigo, J.K., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2001. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J. Virol.* 75, 4570–4583.

Leroux, C., Cadoré, J. L., Montelaro, R.C., 2004. Equine Infectious Anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35, 85-512.

Maury, W., 1994. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 68, 6270–6279.

Maury, W., Oaks, J.L., Bradley, S., 1998. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 72, 9291–9297.

Mealey, R.H., Zhang, G B., Leib, S.R., Littke, M.H., Mcguire, T.C., 2003. Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus. *Virology.* 313, 537–552.

Nagarajan, M.M., Simard, C., 2007. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. *Virus Res.* 129, 228-235.

Oaks, J. L., Mcguire, T.C., Ulibarri, B., Crawford, T.C., 1998. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J. Virol.* 72, 7263–7269.

OIE – World Organization for Animal Health. Manual of standards diagnostic tests and vaccines. 2012 Available in: [www.oie.int](http://www.oie.int). Access: 21/12/2016

O'Rourke, K.I., Besola, M.L., Mcguire, T.C., 1991. Proviral sequences detected by polymerase chain reaction in peripheral blood cells of horses with equine infectious anemia lentivirus. *Arch. Virol.* 117, 109-119.

Reis, J.K., Melo, L.M., Rezende, M.R., Leite, R., 1994. Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anemia focus. *Trop. Anim. Health Prod.* 26, 65-68.

Ricotti, S., Garcia, M.I., Veaute, C., Bailat, A., Lucca, E., Cook, R.F., Cook, S.J., Soutullo, A., 2016. Serologically silent, occult equine infectious anemia virus (EIAV) infections in horses. *Vet. Microbiol.* 187, 41-49.

Scicluna, M.T., Issel, C., Cook, F.R., Manna, G, Cersini, A., Rosone, F., Frontoso, R., Caprioli, A., Antonetti, V., Autorino, G.L., 2013. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anemia? *Vet. Microb.* 165,123-134.

Spyrou, V., Papanastassopoulou, M., Psychas, V., Billinis, C., Koumbati, M., Vlemmas, J., Koptopoulos, G., 2003. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Vet. Microbiol.* 95, 49-59.

Tigre, D.M., Brandão, C.F.L., de Paula, F.L., Chinalia, F.A., Campos, G.S.; Sardi, S.I., 2016. Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil. *Arch. Virol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-3172-5>

**Table 1**

Comparison of results obtained using the *nested*-RT-PCR and AGIDT in serum samples.

<i>nested</i> -RT-PCR	AGIDT		Total
	Positive	Negative	
Positive	12	12	24
Negative	22	36	58
Total	34	48	82

**Table 2**

Comparison of results obtained by virus detected in PBMC and serology.

<i>nested-PCR</i> *	AGIDT**		Total
	Positive	Negative	
Positive	31	20	51
Negative	03	28	31
Total	34	48	82

\*PBMC

\*\*serum samples

**Highlights**

- Asymptomatic carriers show absence of antibodies in the presence of virus in blood.
- The presence of false-negative animals on the fields impairs the control of EIA.
- To improve the diagnostic accuracy is essential a more sensitive test than AGID.

## **MANUSCRITO 2**

### **CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS IN BRAZIL.**

Dellane Martins Tigre<sup>1,3</sup>, Camila Fonseca Lopes Brandão<sup>1,4</sup>, Fabiana Lopes de Paula<sup>1,5</sup>, Fabio Alexandre Chinalia<sup>2</sup>, Gubio Soares Campos<sup>1</sup>, Silvia Ines Sardi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Virology, Institute of Health Science, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biointeraction, Institute of Health Science, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

<sup>3</sup> Department of Biologic Sciences, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié, Brazil

<sup>4</sup> Instituto Federal Baiano (IFBA), Santa Inês, Brazil

<sup>5</sup> Institute of Health Science, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Santo Antonio

## BRIEF REPORT

**Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil**Dellane Martins Tigre<sup>1,3</sup> · Camila Fonseca Lopes Brandão<sup>1,4</sup> · Fabiana Lopes de Paula<sup>1,5</sup> · Fabio Alexandre Chinalia<sup>2</sup> · Gubio Soares Campos<sup>1</sup> · Silvia Ines Sardi<sup>1,2</sup>Received: 19 August 2016 / Accepted: 25 October 2016  
© Springer-Verlag Wien 2016

**Abstract** Equine infectious anemia is an important infectious disease that affects equids worldwide. Control of the disease is currently based on detection of anti-p26 EIAV by Agar Gel Immunodiffusion (AGID). In this work, 62 animals were examined by AGID and nested-PCR using primers for the gag gene. Fifty-three samples (85.5%) were positive by nested-PCR, whereas only 33 samples (53%) were positive for AGID. Fifteen amplicons obtained by nested-PCR were sequenced and the aligned result subjected to phylogenetic analysis. The analysis suggests that the Brazilian EIAV forms cluster with WSU5, EIAVUK and Wyoming strains from United States.

Equine infectious anemia (EIA) is an infectious and persistent but noncontagious disease restricted to members of the family *Equidae* (horses, mules and donkeys) found almost worldwide. It is caused by equine infectious anemia virus (EIAV), which belongs to the subfamily *Orthoretrovirinae* and genus *Lentivirus* in the family *Retroviridae* [9, 11]. In Brazil, EIA was diagnosed for the first time in 1968, in the states of Rio Grande do Sul and

Rio de Janeiro [12]. Since 1981, Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) has included the EIA in the list of diseases subjected to control measures, such as euthanasia of animals diagnosed positive by AGID, to limit the spread of the virus [3]. EIA has a direct economic impact due to the loss of livestock when diseased animals are euthanized, and also an indirect effect, since MAPA imposes embargoes for transit of horses, with barriers being imposed for markets of live animals and animal products, consequently also affecting expositions and equestrian sports. Altogether, the economic effects have considerable importance [16, 29]. The clinical signs of the disease are highly variable. It varies from an acute febrile episode to a chronic or long-term unapparent course. The chronic form of EIA is characterized by recurring cycles of viremia with fever, pronounced thrombocytopenia, severe anemia, weight loss, jaundice, tachypnea and ventral edema [2, 9]. During febrile episodes, the virus replicates actively on macrophages present in spleen, liver, lymph nodes, lungs and kidneys [31], although research has shown that other cells, such as endothelial cells, may also be susceptible to the virus [23]. Animals that survive the cyclic episodes of anemia and fever become asymptomatic virus carriers [11]. The virus has tropism for monocytes, which results initially in a non-productive infection. The differentiation of monocytes into macrophages activates viral replication, an event called "replication restriction" [6, 21]. The blood is therefore an important source of transmission between infected and non-infected horses [23]. The virus can be transmitted mechanically, through the bite of bloodsucking insects, such as horseflies (*Tabanus* spp; *Hybomitra* spp) and stable flies (*Stomoxys* spp), which are mechanical vectors of the virus [10, 14, 35], by iatrogenic means through harnesses, spurs and needles or surgical instruments contaminated with blood, and also

✉ Dellane Martins Tigre  
dellanetigre@yahoo.com.br

- <sup>1</sup> Laboratory of Virology, Institute of Health Science, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil
- <sup>2</sup> Department of Biointeraction, Institute of Health Science, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil
- <sup>3</sup> Department of Biologic Science, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié, Brazil
- <sup>4</sup> Instituto Federal Baiano (IFBA), Santa Inês, Brazil
- <sup>5</sup> Institute of Health Science, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Santo Antonio de Jesus, Brazil

**Table 1** Comparison of agar gel immunodiffusion (AGID) and nested PCR test results for the detection of EIAV-infected equids

Nested PCR	AGID		Total
	Positive	Negative	
Positive	33	20	53
Negative	02	07	09
Total	35	27	62

nucleotide sequences possessed significant identity to those previously published for EIAV. The amplified 393-nt region (nucleotides 945-1337) of the viral genome corresponds to the amino-terminal region of the p26 protein (residue 141-271). Taking into consideration the studied sequence, the phylogenetic tree topology shows that the strains from Bahia form a cluster with the strains WSU5, EIAVUK and Wyoming (USA) (bootstrap value D 95). This is also confirmed by the genetic distances between sequences from this study and the WSU5 strain (0.003–0.005). The largest distance (0.209) was observed with the strain F2 (Ireland) (Fig. 1). As can be seen in the phylogenetic tree (Fig. 1), the KC213778.1 sequence was genetically more distant from the others determined in this work. This sequence was obtained from a foal (negative by AGID) born to a positive female (KC213790.1). Although the sequence from KC213778.1 contained a 43-nucleotide substitution, it still maintained enough similarity for it to group in the same cluster with other Brazilian strains.

The nested PCR methods showed reasonable concordance ( $\kappa = 0.21$ ) with the AGID test for identifying EIAV-infected animals. However, despite its excellent specificity,

the serological test has a number of deficiencies, including a lack of sensitivity and the fact that interpretation of results can be highly subjective [8, 30]. The sensitivity of nested PCR for detecting proviral DNA in blood cells allowed detection of infection in healthy equines, in which the viral loads are generally very low [27]. Similar results were obtained that showed a moderate agreement ( $\kappa = 0.441$ ) between the techniques of nested PCR and AGID [30]. Two samples, however, failed to yield detectable amounts of the expected amplicon upon EIAV-specific PCR. Other authors have had similar problems [8, 27]. The amount of proviral DNA in PBMCs is known to be very low, bordering on the undetectable for all but the most sensitive of PCR setups, which may be explained by the strong control exerted at this stage on viral replication by the host immune system, which restricts the virus to organs of the lymphopoietic system [18, 22]. In addition, the primers used may not be able to amplify EIAV strains with mismatches within the primer-binding sites. One or two mismatches near the 3' end of the primer do not fully inhibit primer binding, whereas three mismatches at the 3' end and more than two mismatches in both the reverse and forward primers hamper primer binding, preventing amplification [28]. The absence of contaminants in the non-template controls and the results of sequencing confirmed the specificity of the amplified products. According to Capomaccio *et al.* [4], who analyzed the phylogeny of EIAV isolates, the virus circulating in North and South America was introduced by European settlers, which may explain the homology of the isolated sequences in Brazil with USA strains. Because healthy animals carrying the virus may have inconspicuous or absent clinical signs, the

**Table 2** Results of nested PCR performed on MDM and AGID from 15 animals infected with EIAV

Animal number	Farm number	GenBank accession number	Results of nested PCR	AGID
LABVIRO/UFBA/02	1	KC213776.1	+	+
LABVIRO/UFBA/03	2	KC213789.1	+	+
LABVIRO/UFBA/04	2	KC213788.1	+	–
LABVIRO/UFBA/05	3	KC213787.1	+	+
LABVIRO/UFBA/06	4	KC213786.1	+	+
LABVIRO/UFBA/08	5	KC213785.1	+	+
LABVIRO/UFBA/15	5	KC213784.1	+	+
LABVIRO/UFBA/16	5	KC213783.1	+	+
LABVIRO/UFBA/21	5	KC213777.1	+	+
LABVIRO/UFBA/23	5	KC213782.1	+	–
LABVIRO/UFBA/31	5	KC213781.1	+	–
LABVIRO/UFBA/12	6	KC213790.1	+	+
LABVIRO/UFBA/44	6	KC213778.1	+	–
LABVIRO/UFBA/39	7	KC213780.1	+	–
LABVIRO/UFBA/52	8	KC213779.1	+	+

Sequence data for EIAV strains are available in the GenBank database

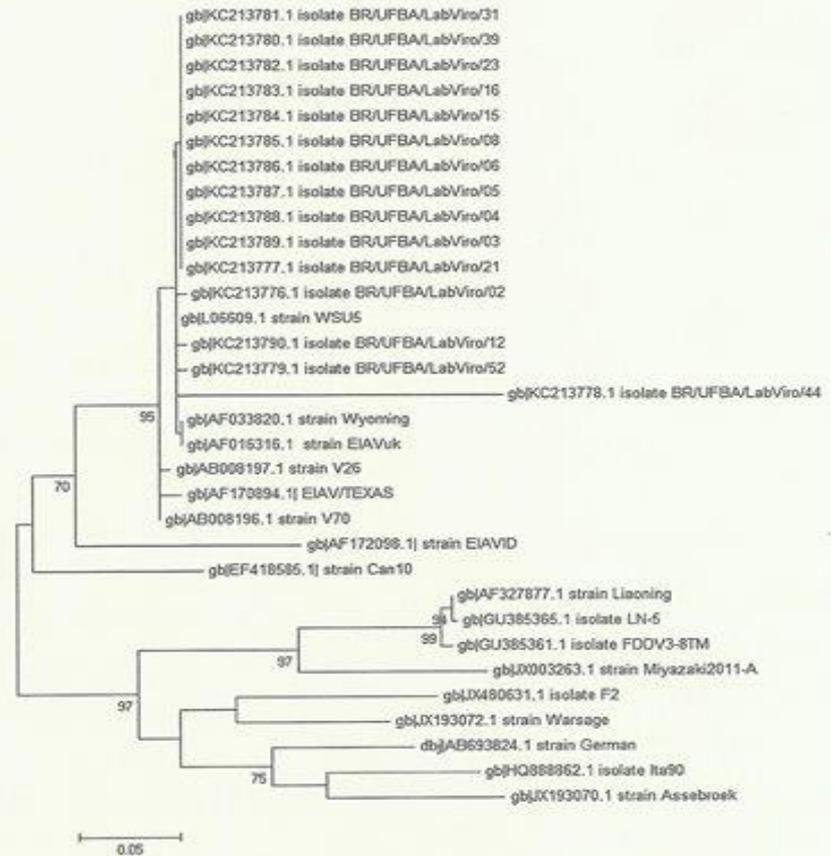
through nursing [33]. There is no treatment or effective vaccine for EIA, and the diagnostic is serological. The most widely used test for EIAV is an agar gel immunodiffusion (AGID) assay commonly referred to as the Coggins test [7]. The clinical diagnosis is difficult due to the absence of specific signs of the disease and because many animals become asymptomatic carriers between 12 and 24 months after infection [17]. Virological diagnosis is complicated, since virus isolation in cell culture depends on the viral load of the infected animal [15, 19]. The two single-stranded positive-sense RNAs of the EIAV genome are approximately 8.2 kb in length and contain three major coding regions: *gag*, encoding the viral capsid proteins; *pol*, encoding the enzymes protease, reverse transcriptase (RT), and integrase (IN); and *env*, encoding the two envelope glycoproteins: the surface glycoprotein (gp90) and the transmembrane glycoprotein (gp45) [18, 20]. The proviral genome also contains three additional ORFs, encoding *tat* and *rev*, which are present in all lentiviruses, and S2 [19]. The *gag* gene encodes a polyprotein that is cleaved by a virus-encoded protease to generate three major products: matrix (p15), capsid (p26) and nucleocapsid (p11), plus a low-molecular-weight protein (p9) that is responsible for recruiting components of the cellular endocytosis machinery for viral budding [5, 28]. The prevalence of EIA varies in different states of Brazil. Melo et al. [24] reported the prevalence in Pantanal to be 36%; in Minas Gerais it varied from 0.07% to 5.1% [1]; in Bahia, was reported to be 5.9% [13]; and in Mato Grosso, it was 5% [26]. The prevalence of EIAV and the genetic profile of the virus circulating in Bahia-Brazil needs to be further studied. The aim of this study was to detect EIAV by nested PCR and subsequently perform DNA sequencing of the proviral genome to characterize the Brazilian EIAV strain.

A total of 62 blood samples (57 from horses and 5 from mules) were subjected to peripheral blood monocyte cell (PBMC) isolation by Ficoll gradient (Ficoll Paque Plus™, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. All animals were tested for EIAV-specific antibodies using AGID (Biovetech, Brazil). The PBMCs were resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL) and antibiotics (100 UI penicillin G sodium and 100 mg of streptomycin sulfate per ml). The resuspended PBMCs (at least 600,000 cells/well) were placed in 24-well microplates and incubated for 24 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After this time, the plates were washed so that only monocytes would remain due to adherence, and DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics was added. The PBMC cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 8 days to obtain monocyte-derived macrophages (MDMs). After this period, cultures

were stored at -70 °C until nested PCR was performed. Proviral DNA (n = 62) was extracted from MDMs using a QIAamp Kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions. A partial sequence of the *gag* gene was amplified following the protocol described by Oaks et al. [27]. After amplification, PCR products (427 bp) were separated by agar gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and detected using a UV transilluminator. Nested PCR products were purified using QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions and then subjected to direct sequencing using a Big Dye Terminator® v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA). Sequencing was performed by ACTgene, Biotech Center of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Nucleotide sequences were aligned and edited with Clustal W software available in the Bio-Edit program (<http://mbio.ncsu.edu/bioedit.html>) and then compared with the EIAV sequences published in GenBank, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) application. Phylogenetic analysis was performed using MEGA version 6 software [32], employing the neighbor-joining method [34]. Phylogenetic trees were constructed by the maximum-likelihood method with the Hasegawa-Kishino-Yano model (HKY + G + I) nucleotide substitution algorithm. Statistical support for the trees was evaluated by bootstrapping based on 1000 repetitions. Including gaps and excluding the primer regions, a 393-nucleotide-long sequence of amplified partial *gag* fragments were compared with existing EIAV GenBank sequences. The accession numbers, strain codes and origins are as follows: AF033820.1 (Wyoming), AF016316.1 (EIAV<sub>UK</sub>), L06609.1 (WSU5), AB008196.1 (V70), AB008197.1 (V26), AF170894.1 (EIAV/TEXAS) and AF172098.1 (EIAVID) from the United States; JX003263.1 (Myiazaki2011-A) from Japan; AF327877.1 (EIAV<sub>Lisoning</sub>), GU385365.1 (LN5) and GU385361.1 (FDDV3-8TM) from China; AB693824.1 (German) from Germany, HQ888862.1 (Ita-90) from Italy; JX193070.1 (Assebroek) and JX19307 2.1 (Warsage) from Belgium; EF418585.1 (Can-10) from Canada and JX480631.1 (EIAV<sub>IRE</sub>) from Ireland. The sequences reported in this paper were deposited under GenBank accession numbers KC213776-KC213790 and are the first sequences of the *gag* gene isolated from Brazil.

Of the 62 samples tested by nested PCR, proviral DNA was detected in 53 (85.5%). Of those, 20 samples were negative by serologic testing (Table 1). Only two samples that were positive by AGID were not detected by nested PCR (Table 2). Statistical analysis showed that the nested PCR and AGID tests had reasonable agreement ( $\kappa = 0.21$ ). PCR-generated amplicons from 15 nested PCR-positive MDM samples were subjected to sequencing. Using the BLAST program, it was confirmed that all resultant

**Fig. 1** Phylogenetic tree based on a partial fragment of the *gag* gene. GenBank accession numbers and strain designations are shown



disease would have gone unnoticed by the European settlers. The variability in the sequence of the *gag* gene analyzed, although unusual, may represent polymorphisms, such as SNPs, deletions and insertions, that contribute to longer survival by evading immune surveillance and altered disease progression [25, 28]. It is characteristic of the lentiviruses to have high rates of small mutations, consequently giving rise to a population of different virus particles that share genetic, morphological and pathological features, commonly referred to as viral quasispecies [20]. Genetic variations lead to a viral persistence framework that allows the virus to escape the host immune response, leading to periods of recrudescence of disease [17, 20].

We studied the prevalence of EIAV infection and performed a phylogenetic analysis of the virus isolated in Bahia. Further studies are necessary in order to determine the prevalence of EIAV in other parts of the country and to

investigate the genetic variability of the circulating virus. The study of genetic diversity of EIAV in Brazil allows molecular diagnostic methods to be evaluated and primers to be chosen to detect different field isolates.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** Not required by this journal: study based on samples collected from equids subjected to euthanasia due to their disease status.

#### References

- Almeida VMA, Gonçalves VSP, Martins MF, Haddad JPA, Dias RA, Leite RC (2006) Anemia Infecciosa Equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 58:141–148

2. Archambault D, Wang Z, Lecal JC, Gazit A, Yaniv A, Dahlberg JE, Tronic SR (1989) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anemia virus detection using recombinant Pr55<sup>gag</sup>. *J Clin Microbiol* 7:1167–1173
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2004) Instrução normativa nº45, de 15 de junho de 2004, Aprova as normas para prevenção e o controle da Anemia Infecciosa Equina-AIE. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília (DF), Seção 1:7, 2004
4. Capomaccio S, Capelli K, Cook RF, Nardi F, Gifford R, Marenzoni ML, Passamont F (2012) Geographic structuring of global EIAV isolates: a single origin for New World strains? *Virus Res* 163:656–659
5. Chen C, Li F, Montelaro RC (2001) Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in budding and infection. *J Virol* 75(20):9762–9770
6. Clements JE, Zink MC (1996) Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infectious. *Clin Microbiol Rev* 9(1):100–117
7. Coggins L, Norcross NL (1970) Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet* 60:330–335
8. Diaz-Miranda M, Vazquez-Blomquist D, Cruz LD, Vasallo C, Campos T, Je Perez, Paneque D, Duarte CA (2012) Sequence of the gene coding for the p26 protein from a Cuban strain of equine infectious anemia virus. *Biotecnol Apl* 29:17–21
9. Flores EF (2007) *Virologia veterinária*. UFSM, Santa Maria
10. Foil LD, Meek CL, Adams WY, Issel CJ (1983) Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am J Vet Res* 44:155–156
11. Goff SP (2007) Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, 5th edn. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1999–2069
12. Guerreiro MG, Bauer AG, Gloss RM, Vidor T, Farias MT, Trein E, Mancuso PC (1968) Simpósio sobre Anemia Infecciosa Equina. *Bol Inst Pesq Vet Desidério Finamor* 1(2):3–4
13. Guimarães LA, Bezerra RA, Mendonça CED, D'Afonseca WO, Albuquerque GR (2011) Prevalence of equine infectious anemia virus in mesoregion of South baiano, Bahia, Brazil. *Rev Bras Med Vet* 33(2):79–82
14. Hawkins JA, Adams WV, Wilson BH, Issel CJ, Roth EE (1976) Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *J Am Vet Med Ass* 168:63–64
15. Hines R, Maury W (2001) DH82 cells, a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia. *J Virol Methods* 95:47–56
16. Leite RC, Reis JKP, Oliveira AP, Nascimento PMP, Oliveira FG, Naves JHFF, Rodrigues APS, Gasparini MR, Alves F, Oliveira CHS, Rujão DS, Galinari GCF (2013) Retrovírus dos animais domésticos. *Vet Zootec* 20:73–93
17. Leroux C, Issel CJ, Montelaro RC (1997) Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J Virol* 71:9627–9639
18. Leroux C, Craigo JK, Issel CJ, Montelaro RC (2001) Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J Virol* 75:4570–4583
19. Leroux C, Cadore JL, Montelaro RC (2004) Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res* 35:485–512
20. Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC (1996) Genomic quasispecies associated with the initiation of infection and disease in ponies experimentally infected with equine infectious anemia virus. *J Virol* 70:3346–3354
21. Maury W (1994) Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J Virol* 68:6270–6279
22. Maury W (1998) Regulation of equine infectious anemia virus expression. *J Biomed Sci* 5:11–23
23. Maury W, Oaks JL, Bradley S (1998) Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J Virol* 72:9291–9297
24. Melo RM, Cavalcanti RC, Villalobos EMC, Cunha EMS, Lara MCCSH, Aguiar DM (2012) The occurrence of equids seropositives for encephalomyelitis and infectious anemia virus in Mato Grosso state, Brazil. *Arq Inst Biol* 79(2):169–175
25. Nagarajan MM, Simard C (2007) Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. *Virus Res* 129:228–235
26. Nociti DLP, Senna D, Rego CLP (2007) Anemia infecciosa equina em equídeos de tração no município de Cuiabá, MT, Brasil. *Rev Bras Med Vet* 29:165–167
27. Oaks JL, Mcguire TC, Ulibarri C, Crawford TB (1998) Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol* 72:7263–7269
28. Quilvan M, Cook RF, Cullinane A (2014) Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Vet Rec* 160:616–618
29. Rebellato MC, Oliveira C, Weiblein R, Silva SF, Oliveira LSS (1992) Serological diagnosis of equine infectious anemia virus infection in the central region of the Rio Grande do Sul state. *Ciênc Rural* 22(2):179–196
30. Santos EM, Motta PMC, Heinemann MB, Leite RC, Reis JKP (2011) Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. *Arq Bras Med Vet Zoo* 63(2):296–301
31. Sellon DC, Walker KM, Russel KE (1996) Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *J Virol* 70:590–594
32. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) Mega6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
33. Tashjian RJ (1984) Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. *J Am Vet Med Ass* 184:282–288
34. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
35. Williams DL, Issel CJ, Steelman CD, Adams WV, Benton CV (1981) Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am J Vet Res* 42(9):1469–1473

## 6 CONCLUSÕES

Os ensaios de PCR realizados nesta pesquisa demonstraram potencial uso como ferramenta complementar de diagnóstico do EIAV, detectando animais positivos que não apresentaram reação no teste sorológico de referência.

A detecção do DNA proviral em amostras de animais portadores assintomáticos e sorologicamente negativos comprova a importância destes animais como fontes de infecção para o resto do plantel.

O teste molecular detectou, em uma grande porcentagem de animais (24,4%), a presença do DNA proviral de EIAV em equídeos portadores assintomáticos da infecção mas sorologicamente negativos.

Para a detecção do DNA proviral a partir do sangue foi realizado o cultivo das PBMCs e a seleção de monócitos pela propriedade de aderência. O cultivo de monócitos *in vitro* estimula a diferenciação em macrófagos ativando a replicação viral.

Adicionalmente, monócitos infectados por EIAV aparecem ciclicamente no sangue, e sua presença está associada a episódios viremicos. Desta forma os 3 resultados negativos por *nested*-PCR encontrados nessa pesquisa podem ter ocorrido pelo baixo número de cópias provirais por célula, ou pela pequena quantidade de células infectadas na amostra.

A detecção do RNA do EIAV ocorre em amostras de soro de animais assintomáticos e sorologicamente positivos, ou seja a replicação viral ocorre na presença de anticorpos.

Outro achado deste trabalho foi a detecção de vírus livre circulando no plasma em animais assintomáticos e soropositivos. Isto sugere que (i) a supressão do fenômeno de restrição da replicação viral, ocorre na fase latente da infecção, mesmo na presença de anticorpos ou (ii) variantes virais ou *quasispecies* surgem a cada ciclo da replicação viral e escapam da resposta imunológica do hospedeiro.

Este estudo demonstrou que equídeos clinicamente sadios e sorologicamente positivos são possíveis portadores do vírus, tanto na forma livre ou como provírus integrado ao DNA celular, sugerindo que a replicação viral ocorre ainda na presença de anticorpos e, por outro lado, animais portadores assintomáticos, sorologicamente negativos constituem uma importante fonte de infecção para o plantel.

Nossos resultados sorológicos e moleculares demonstram a importância de se implementar outros testes de diagnóstico complementares ao IDGA na Bahia, e assim contribuir com o Programa de Controle de AIE e com o Comitê Estadual de Sanidade Equídea

(CESE-BA) para o desenvolvimento e implantação de normas para o controle da AIE no estado.

O vírus identificado na Bahia tem homologia com as cepas isoladas nos EUA, sugerindo que o vírus que circula na Bahia é similar à cepa Wyoming isolada nos EUA; além disso as cepas identificadas na Bahia apresentam elevada similaridade entre elas.

O estudo da diversidade genética do EIAV no Brasil permite avaliar os métodos de diagnóstico molecular e a escolha de iniciadores ideais para detectar diferentes isolados de campo, assim como identificar regiões de *gag* imunorelevantes as quais possam ser potenciais epitopos para os linfócitos citolíticos e o desenho de uma vacina contra EIAV.