

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Adriana Alves Oliveira Paim

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE MOLECULAR PARA DETECÇÃO DA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA A PARTIR DA ANÁLISE GENÔMICA DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DE EIAV**

Belo Horizonte
2022

Adriana Alves Oliveira Paim

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE MOLECULAR PARA DETECÇÃO DA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA A PARTIR DA ANÁLISE GENÔMICA DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DE EIAV**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Guimarães da Fonseca.

Co-orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Coorientadora: Dra. Renata de Lima Alvarenga Bottrel

Belo Horizonte

2022

043

Paim, Adriana Alves Oliveira.

Desenvolvimento de teste molecular para detecção da anemia infecciosa equina a partir da análise genômica de amostras brasileiras de EIAV [manuscrito] / Adriana Alves Oliveira Paim. – 2022.

162 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Guimarães da Fonseca. Coorientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis. Coorientadora: Dra. Renata de Lima Alvarenga Bottrel.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Anemia Infecciosa Equina. 3. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 4. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. I. Fonseca, Flavio Guimarães da. II. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. III. Bottrel, Renata de Lima Alvarenga. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título..

CDU: 579

ATA DE DEFESA DE TESE

04/01/2023 14:51

SEI/UFMG - 1922236 - Ata



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE ADRIANA ALVES OLIVEIRA PAIM

Nº REGISTRO: 2018754062

Às 09:30 horas do dia **19 de dezembro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Giliane de Souza Trindade (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (Universidade Federal de Minas Gerais), Pedro Augusto Alves (Fiocruz), Luiz Felipe Leomil Coelho (Universidade Federal de Alfenas), Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador), para julgar o trabalho final "**Desenvolvimento de Teste Molecular para Detecção da Anemia Infecciosa Equina a partir da Análise Genômica de Amostras Brasileiras de EIAV**" da aluna **Adriana Alves Oliveira Paim**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022

Membros da Banca:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dr. Pedro Augusto Alves

Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

De acordo:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza

(*Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia*)



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2022, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 21/12/2022, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giliane de Souza Trindade, Professora do Magistério Superior**, em 21/12/2022, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Augusto Alves, Usuário Externo**, em 21/12/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 22/12/2022, às 06:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Usuário Externo**, em 22/12/2022, às 08:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1922236** e o código CRC **B70C7172**.

Para Mateus e Isabeli

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo conforto do seu amor sem fim.

Aos meus filhos, Isabeli e Mateus, por caminharem comigo, por serem meus maiores amores, por serem fonte de inspiração e força. A vocês dedico este trabalho e a minha vida.

Ao meu grande amor, Léo! Meu melhor amigo, meu chão e meu teto. Obrigada por acreditar quando eu mesmo havia desistido. Obrigada por estar comigo. Sem você, sem seu apoio e seu abraço nada seria possível e nem faria sentido.

Aos meus pais, Dulce e Wagner, luzes da minha vida. Obrigada pelo carinho, pelo amor, pelo cuidado de toda vida. Pela ajuda de sempre, pelos conselhos tão preciosos e por transmitirem uma força sem medida de vontade de vencer.

Aos meus sogros, Verilda e Adilson, pelo amor, cuidado e ajuda em tantos momentos.

Ao meu irmão, Luciano, minha cunhada, Sabrina e meus afilhados Júlia e Bernardo. Pela torcida e orações, pelo amor e carinho de sempre.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e pelos bons desejos de sucesso.

Ao meu querido orientador, Professor Flávio, pela oportunidade de aprender com você o verdadeiro sentido da docência e da pesquisa. Pela sua generosidade. Por me acolher e acreditar em mim. Você é um ser humano incrível, um amigo maravilhoso, um professor sensacional e um pesquisador de grande excelência.

Ao querido Professor Jenner, pela preciosa coorientação, por todo ensinamento e pela ajuda em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida Professora Jordana, por todo apoio, por me oferecer tantas oportunidades de crescimento e aprendizado. Por ter uma palavra tão doce quanto necessária.

À Professora Edel pelo exemplo de profissionalismo e por toda ajuda ao longo desta caminhada.

À Doutora Renata pela coorientação, pela oportunidade de trabalhar em um laboratório de grande excelência como a Loci e por tornar possível a realização deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia do ICB – UFMG por todo aprendizado e pela ajuda constante.

Aos amigos do LVBA, meus “filhotes” tão queridos. Obrigada pelo apoio, pela ajuda, pelos conselhos, ensinamentos e momentos de muita alegria.

Aos secretários do departamento de Microbiologia, Débora e Tiago, pela ajuda e apoio.

Às agências de fomentos, Cnpq, Capes e Fapemig, pelo suporte financeiro no desenvolvimento do trabalho.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”

Cora Coralina

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma enfermidade de grande importância em Sanidade Equídea, tanto pelas perdas econômicas devidas à eutanásia obrigatória desses animais em determinadas regiões quanto pela perda da sanidade desses animais. A AIE apresenta distribuição mundial, é uma das onze doenças equinas que requerem notificação compulsória à Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) e no Brasil está incluída entre as doenças passíveis de medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal - MAPA - (Decreto Federal 24.548/1934). Apesar da grande importância econômica da cultura equídea, não há nenhum tratamento ou vacina descrito para a AIE e um teste molecular para sua detecção ainda não foi amplamente estabelecido. Considerando a importância deste setor no Brasil, o estudo genômico dos isolados brasileiros de EIAV merece destaque e pode servir como ferramenta para o desenvolvimento de um diagnóstico molecular, o que seria de fundamental importância para a detecção precoce e consequente controle da doença. Neste trabalho realizamos o sequenciamento massivo e paralelo de isolados de EIAV utilizando o sistema de enriquecimento alvo SureSelect com sequenciamento de próxima geração (NGS) Illumina, a partir do cDNA extraído do sangue de animais infectadas. Algumas sequências obtidas representam partes dos genes estruturais e acessórios do EIAV. Dada a grande dificuldade de sequenciamento completo desses isolados, foi necessário utilizar o sequenciamento de Sanger para complementar as sequências obtidas por NGS. Um dos isolados obtidos de uma amostra de jumento que teve seu genoma melhor caracterizado no NGS foi completamente sequenciado e está depositado no GenBank sob o número ON615427. Foi possível ainda identificarmos uma região gênica conservada entre todos os isolados descritos a partir da qual desenhamos um ensaio de qPCR que mostrou alto poder de detecção com área sobre a curva ROC de 0,83, valores de sensibilidade de 73,8% e de especificidade de 85,7%, poderá ser usado como teste molecular para o diagnóstico da AIE. Este trabalho contribui, portanto, para o estudo da diversidade genética de isolados brasileiros e para o controle da AIE no Brasil.

Palavras-chave: EIAV, AIE, NGS, Caracterização Genômica, Diagnóstico Molecular

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA) is a disease of great importance in Equine Health, both due to losses lost to the mandatory euthanasia of these animals in certain provisions and due to the loss of health of these animals. EIA has a worldwide distribution, is one of eleven equine diseases that require compulsory notification to the World Organization for Animal Health (WOAH) and in Brazil is included among the diseases subject to measures provided for in the Animal Health Defense Regulation - MAPA - (Federal Decree 24.548 /1934). Despite the great economic importance of equine culture, there is no treatment or vaccine described for EIA and a molecular test for its detection has not yet been widely established. Considering the importance of this sector in Brazil, the genomic study of Brazilian EIAV isolates is noteworthy and can serve as a tool for the development of a molecular diagnosis, which would be of fundamental importance for early detection and consequent control of the disease. In this work, we performed massive and parallel sequencing of EIAV isolates using the SureSelect target enrichment system with next-generation sequencing (NGS) Illumina, from cDNA extracted from the blood of infected animals. The dangling sequences represent parts of the independent and accessory EIAV genes. Given the great difficulty in completely sequencing these isolates, it was necessary to use Sanger sequencing to complement the continuous sequences by NGS. One of the isolates obtained from a donkey sample that had its genome better characterized in the NGS was completely sequenced and is deposited in GenBank under the number ON615427. It was also possible to identify a conserved gene region among all isolated isolates from which we designed a qPCR assay that showed high detection power with an area under the ROC curve of 0.83, sensitivity values of 73.8% and specificity of 85.7%, it can be used as a molecular test for the diagnosis of EIA. Therefore, this work contributes to the study of the genetic diversity of Brazilian isolates and to the control of EIA in Brazil.

Keywords: EIAV, AIE, NGS, Genomic characterization, Molecular Diagnosis

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Representação esquemática da partícula de vírion de lentivírus animais
- FIGURA 2 Representação esquemática da estrutura genômica do EIAV
- FIGURA 3 Representação esquemática do ciclo de replicação do EIAV na célula hospedeira
- FIGURA 4 Distribuição dos casos registrados de AIE no território brasileiro
- FIGURA 5 Gel de agarose para avaliação da qualidade do DNA extraído do buffy coat das amostras usadas
- FIGURA 6 Análise da curva padrão usando os valores CT (Threshold) das amplificações das amostras usadas na primeira fase do NGS
- FIGURA 7 Análise da curva de melting (TM) das amplificações das amostras usadas na primeira fase do NGS
- FIGURA 8 Exemplo de mapa de placa usado nas reações de qPCR com o iniciador 122.2
- FIGURA 9 Géis de agarose representativos dos resultados obtidos na tentativa de amplificar regiões específicas e determinadas do genoma do EIAV
- FIGURA 10 Análise da curva de melting das amplificações das amostras negativas usadas na reação de qPCR com o iniciador 122.2.
- FIGURA 11 Análise da curva de melting das amplificações das amostras positivas usadas na reação de qPCR com o iniciador 122.2.
- FIGURA 12 Gráfico de identidade do fragmento gerado no sequenciamento sanger dos amplicons produzidos na reação de qPCR
- FIGURA 13 Avaliação de desempenho da qPCR baseada em valores de CT
- FIGURA 14 Avaliação de desempenho da qPCR baseada em valores de TM
- FIGURA 15 Gráfico do desempenho da qPCR baseada em valores de CT
- FIGURA 16 Avaliação de desempenho da qPCR baseada em valores de TM.
- FIGURA 17 Gel de agarose do resultado das reações de PCR usando iniciadores específicos para completar o sequenciamento completo da amostra 122B
- FIGURA 18 Alinhamento da amostra ON6154727 com os isolados MN560970 e MN560971
- FIGURA 19 Anotação dos genes e resultado da análise da sequência completa do isolado 122B.
- FIGURA 20 Árvore filogenética da relação entre os fragmentos dos genes do EIAV de amostras brasileiras obtidos a partir do NGS das amostras e as demais sequências dos genes disponíveis no GenBank
- FIGURA 21 Análise filogenética de sequências genômicas de EIAV. Árvore filogenética de sequências provirais completas

- FIGURA 22 Gráfico de identidade e Lista de possíveis alinhamentos significativos do fragmento gerado com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 6 comparados contra sequências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.
- FIGURA 23 Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene tat
A, B, C e D
- FIGURA 24 Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene gag
A,B,C e D
- FIGURA 25 Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene pol
A,B,C e D
- FIGURA 26 Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene S2
A,B,C e D
- FIGURA 27 Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene env
A,B,C e D
- FIGURA 28 Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene rev
A,B,C e D

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Descrição das características das amostras usadas no estudo
TABELA 2	Quantificação das amostras de DNA extraídos do sangue dos equídeos
TABELA 3	Iniciadores usados na primeira fase do estudo para tentativa do desenvolvimento de iniciadores específicos
TABELA 4	Condições e variáveis das reações de PCR convencional testadas
TABELA 5	Quantificação das dosagens do DNA extraído das amostras usadas no sequenciamento massivo e paralelo
TABELA 6	Kits usados nas reações de NGS
TABELA 7	Iniciadores desenhados para realização da qPCR como proposta para o teste diagnóstico de detecção da AIE.
TABELA 8	Iniciadores desenhados a partir da sequência completa do genoma da amostra brasileira Poconé – BRA1
TABELA 9	Resultado compilado após análise de bioinformática das sequências obtidas com o sequenciamento massivo e paralelo dos isolados brasileiros de EIAV
TABELA 10	Resultados compilados das várias reações de qPCR
TABELA 11	Avaliação de desempenho de RT-qPCR baseada em valores de CT e TM, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro
TABELA 12	Resultado da análise da distância genética entre o isolado 122B e os demais isolados de EIAV disponíveis no GenBank

LISTA DE ABREVIATURAS

ED	Células de derme equina (equine dermis)
WOAH	Organização Mundial de Saúde Animal (<i>World Organization for Animal Health</i>)
EIAV	Vírus da anemia infecciosa equina (<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>)
FDD	Células de derme de feto de jumento (<i>fetal donkey derm</i>)
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IFN- β :	Interferon do tipo β
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RTq-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
q-PCR	Reação quantitativa de PCR em tempo real
rgp90 ELISA	ELISA com proteína recombinante rgp90
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
TGF- β	Fator de crescimento tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
GTA	Guia de Trânsito Animal
CTL	Linfócito T Citotóxico
PGE2	Prostaglandian 2
IFN	Interferon
ELR	Receptor de Lentivírus
FEK	Células de rim de feto equino (<i>fetal equine kidney</i>)
LFDA	Laboratório federal de Defesa Agropecuária
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
TAE	Tampão Tris Acetato EDTA
NGS	Next Generation Sequencing
EIAVWY	Isolado Wyoming de EIAV
SUASA	Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Animal

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA -----	16
1.1	A ANEMIA INFECCIOSA EQUINA E O VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA -----	16
1.2	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E GENÔMICAS DO EIAV--	17
1.3	OS HOSPEDEIROS DO EIAV - CAVALOS, ASININUS E MUARES - E SUAS PARTICULARIDADES -----	25
1.4	MECANISMOS DE INFECÇÃO DA AIE -----	27
1.5	MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DO EIAV-----	31
1.6	SINAIS E SINTOMAS DA AIE -----	31
1.7	MECANISOS DE ESCAPE IMUNOLÓGICO DO EIAV-----	33
1.8	TESTES PARA DETECÇÃO DA AIE -----	34
1.9	PREVENÇÃO E CONTROLE DA AIE -----	37
1.10	A REPERCURSSÃO DA AIE NO BRASIL -----	38
1.11	LEGISLAÇÃO DA AIE NO BRASIL -----	40
1.12	CARACTERIZAÇÃO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO EIAV -----	41
1.13	CONTRIBUIÇÃO DO SEQUENCIAMENTO MASSIVO E PARALELO NO ESTUDO DO GENOMA DO EIAV-----	43
2	JUSTIFICATIVA -----	45
3	OBJETIVOS -----	46
3.1	OBJETIVO GERAL -----	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS -----	47
4.1	AMOSTRAS -----	47
4.2	ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DE SEQUÊNCIAS CONSERVADAS DO EIAV PARA O DESENHO DE INICIADORES A SEREM TESTADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TESTE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA AIE -----	52
4.3	SEQUENCIAMENTO MASSIVO E PARALELO DE 15 AMOSTRAS DE EIAV ISOLADAS DE ANIMAIS POSITIVOS PARA AIE -----	55

4.3.1	AVALIAÇÃO DOS AMPLICONS OBTIDOS NA PRIMEIRA FASE DO NGS PARA AVALIAÇÃO DA SUA QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO USANDO qPCR COM METODOLOGIA DE CURVA PADRÃO -----	56
4.3.2	METODOLOGIA DE ANÁLISE DO NGS DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE EIAV -----	58
4.4	DESENVOLVIMENTO DE qPCR COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA AIE -----	59
4.5	SEQUENCIAMENTO SANGER PARA COMPLETAR OS FRAGMENTOS GERADOS PELO NGS DA AMOSTRA 122B -----	62
4.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS FRAGMENTES GERADOS PELO NGS DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE EIAV E DA COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE EIAV E A SEQUÊNCIA COMPLETA DA AMOSTRA 122B -----	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	66
5.1	RESULTADOS OBTIDOS NA TENTATIVA DE AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ESPECÍFICAS DO GENOMA PARA OS QUAIS FORAM DESENHADOS INICIADORES A PARTIR DA ANÁLISE IN SÍLICO DAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DE ISOLADOS DO EIAV -----	66
5.2	RESULTADOS OBTIDOS PELO SEQUENCIAMENTO MASSIVO E PARALELO DAS AMOSTRAS DE ISOLADOS BRASILEIROS DO EIAV -----	67
5.3	RESULTADO DA qPCR DESENVOLVIDA A PARTIR DA SEQUÊNCIA OBTIDA NO NGS DA AMOSTRA 122B -----	71
5.4	RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO SANGER PARA OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA COMPLETA DA AMOSTRA 122B –	82
5.5	RESULTADO DA ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS FRAGMENTES GERADOS PELO NGS DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE EIAV E DA COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE EIAV E A SEQUÊNCIA COMPLETA DA AMOSTRA 122B -----	104
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	111
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	112
8	ANEXOS -----	121

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - A ANEMIA INFECCIOSA EQUINA E O VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença de distribuição mundial, que provoca perdas consideráveis na indústria equídea. A AIE é causada pelo vírus da anemia infecciosa equina (Equine Infectious Anemia Virus - EIAV), que, de acordo com a última atualização de classificação taxonômica do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), pertence à seguinte ordem taxonômica: **Domínio** - *Riboviria*, **Reino** - *Pararnavirae*, **Filo** - *Artverviricota*, **Classe** - *Revtraviricetes*, **Ordem** - *Ortervirales*, **Família** - *Retroviridae*, **Subfamília** - *Orthoretrovirinae*, **Gênero** - *Lentivirus*, **Espécie** - *Equine infectious anemia virus* (Koonin et al., 2020)

Os primeiros relatos de sinais clínicos da AIE foram descritos em 1843 por Ligné e uma análise mais acurada da doença foi descrita muitos anos depois por Carre e Vallee em 1904. Nesta ocasião, juntamente com a descrição dos diferentes estágios da doença (aguda, subaguda e crônica), os autores observaram o fato de ser causada por um "agente filtrável" (Vallee e Carrw, 1904). Os autores descreveram também a reprodução experimental da doença pela transferência de pequenas quantidades de sangue de um cavalo doente para um burro e observaram o fato de o vírus persistir após a resolução dos sinais clínicos. Desde então, o EIAV é reconhecido por infectar *Equus caballus* e *Equus asinus*, membros da família *Equidae*, bem como os híbridos resultantes do cruzamento entre *Equus caballus* e *Equus asinus* (burros e mulas), nos quais provoca uma anemia persistente. É importante destacar que os equídeos estão entre um número muito limitado de espécies de mamíferos que atuam como hospedeiros naturais dos lentivirus.

A AIE apresenta prevalência de mais de 30% relatada em alguns países e regiões específicas, como o Pantanal brasileiro, e como tal, é de considerável importância para a indústria equina e é uma das onze doenças que requerem notificação compulsória à Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH), e no Brasil está incluída entre as doenças passíveis de medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal - MAPA - (Decreto Federal 24.548/1934). O controle da doença no Brasil, bem como em quase todos os países, depende totalmente da identificação de equídeos infectados seguida de sua segregação do rebanho

negativo e eutanásia ou quarentena, para prevenir a transmissão subsequente aos outros animais. Não há, até o momento, tratamento efetivo ou meios profiláticos para esta doença.

1.2 – CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E GENÔMICAS DO EIAV

Sob o microscópio eletrônico as partículas virais apresentam considerável pleomorfismo. Podem ser encontrados vírions ovais e esféricos, de 115nm de diâmetro e com capsídeo de simetria complexa. O EIAV é um vírus envelopado, com proteínas de matriz que recobrem externamente o nucleocapsídeo de formato cônico e medeiam a associação com a superfície interna do envelope viral, que é derivado da célula hospedeira e que contém numerosas projeções externas de aproximadamente 6-8 nanômetros (Matheka *et al.*, 1976; Weiland *et al.*, 1977; Leroux 2013; Cook, (2013-2016); Issel, 2013).

Cada partícula viral contém duas cópias simples não complementares de RNA genômico de sentido positivo dentro do capsídeo (Fig. 1).

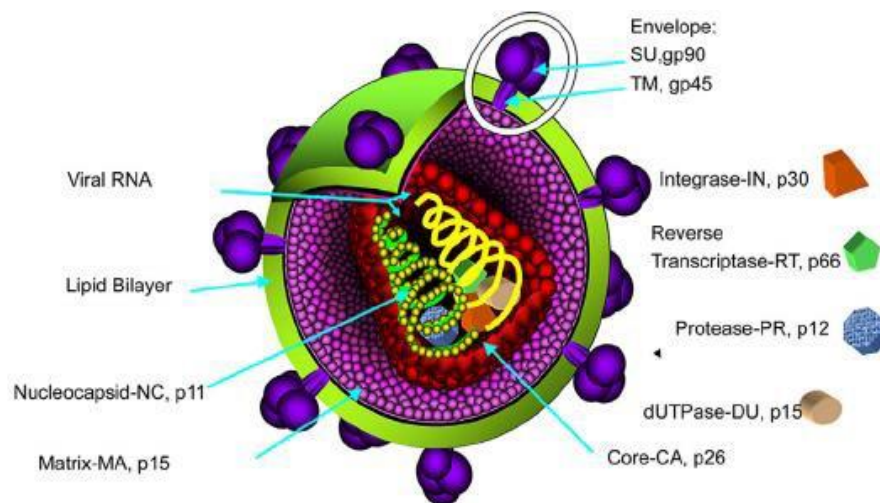


Figura 1. Representação esquemática da partícula de vírion de lentivírus animais. A Figura descreve genes estruturais comuns e proteínas codificadas. O gene gag codifica as proteínas do núcleo viral, incluindo as proteínas do capsídeo (CA), da matriz (MA) e do nucleocapsídeo (NC). O CA é relativamente conservado, o NC interage diretamente com o RNA viral. O gene pol codifica as enzimas relacionadas à replicação, como a protease (PR), a transcriptase reversa (RT) que catalisa a síntese do DNA viral e a integrase (IN). O gene env codifica a poliproteína do envelope que, após digestão por uma protease celular, resulta em subunidades transmembrana (TM) e de superfície (SU). Adaptado de Issel et al., 2014.

O genoma do EIAV possui duas moléculas de RNA de apenas cerca de 8,2Kb e é constituído pelos genes estruturais gag (antígeno específico do grupo), pol e env, flanqueado em ambas as extremidades por repetições terminais longas (LTRs). O EIAV possui ainda janelas de leitura aberta (ORFs) de genes acessórios adicionais s1, s2 e s3. s1 representa o gene tat (transativador transcricional), apresentando duas regiões codificadoras, uma localizada entre a região 5'LTR e o sítio de iniciação do gene gag, e a outra localizada na região intergênica pol-env. A ORF s2 está localizada entre os genes pol e env, sobrepondo a iniciação do gene env. s3 representa o gene rev (que regula a expressão de proteínas virais), sobrepondo o gene env. As ORFs acessórias s1 e s3 (tat e rev)

são comuns a todos os lentivírus, enquanto a s2 é exclusiva em EIAV (ISSEL et al., 2014). Outra característica marcante do EIAV é que esse vírus é o único membro dos lentivírus que não possui uma ORF que codifique um ortólogo para vif (Viral infectivity Factor), uma proteína dirigida contra uma defesa do hospedeiro para retrovírus, da família do complexo 3 da apolipoproteína β editante (APO β EC3). A ausência dessa proteína é inesperada, já que equinos possuem mais genes de APO β EC3 que qualquer outra espécie não primata (Bogerd et al., 2008).

O esquema do genoma viral está representado na figura 2.

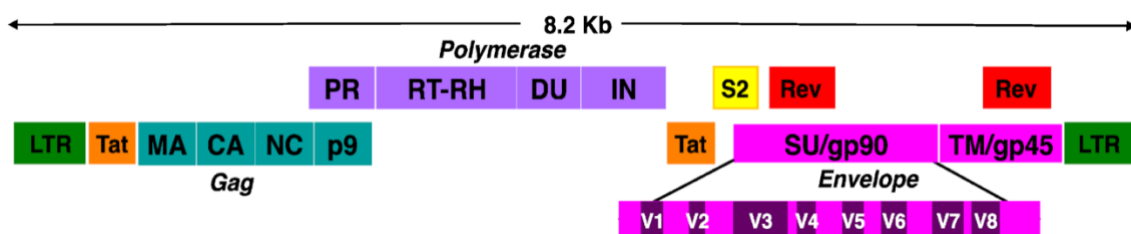


Figura 2: Esquema da estrutura genômica (proviral) do EIAV. Os genes estruturais estão representados em itálico e as proteínas correspondentes estão em negrito. Os genes acessórios estão representados nas caixas coloridas (tat – laranja; rev – vermelho; s2 – amarelo). As LTRs estão representadas em verde. Fonte: Craigo; Montelaro (2013).

As proteínas Gag são produzidas a partir da clivagem de um precursor de poli proteína (PR55gag) pela protease (Pr) codificada pelo vírus resultando nas proteínas de matriz p15 (MA), p26 do capsídeo (CA), nucleocapsídeo p11 (NC) e uma proteína de "domínio tardio" (p9). Estas proteínas formam a partícula viral com a p11 ligando-se ao genoma de RNA viral, a p26, que compreende a estrutura de nucleocapsídeo icosaédrico e a p15, formando a matriz (Fig. 1). p15 e p26 são essenciais para a formação de partículas virais, enquanto a p9 é crítica para a liberação de novas partículas do vírus da célula hospedeira.

Enquanto a ligação da proteína MA aos fosfoinosítídeos associados à membrana inicia a montagem da partícula lentiviral, o CA atua para controlar o empacotamento e, quando liberado pela protease viral, polimeriza como uma cápsula em torno do RNA genômico e das proteínas NC para gerar o virion maduro. A proteína CA contém a principal região de homologia (MHR), um motivo de vinte aminoácidos, que desempenha um papel significativo tanto nos estágios imaturos (antes da clivagem completa da poliproteína) quanto nos estágios maduros da montagem do vírus (Grund et al., 1994; Purdy et al., 2008; Strambio-de-Castillia e Hunter, 1992).

O empacotamento de RNA genômico em partículas virais da progênie é mediado por NC (P11), que contém dois motivos de ligação de zinco $CX_2CX_4HX_4C$ (CCHC) conectados por um ligante de comprimento variável com uma preponderância de aminoácidos básicos (Amodeo et al., 2006). A proteína p9 contém o domínio tardio (L) que nos isolados EIAVWY foi mostrado consistir em um motivo de quatro aminoácidos (tirosina Y, prolina P, ácido aspártico D e leucina L) (Chen et al., 2001; Jin et al., 2005a; Li et al., 2002; Puffer et al., 1997). Esta proteína viral se associa com a proteína X celular de interação com ALG-2 (ALIX) e a subunidade m2 do complexo de proteína adaptadora AP-2 (Martin-Serrano, 2007; Martin-Serrano et al., 2003; Puffer et al., 1997; Strack et al., 2003). Portanto, como ALIX se liga à proteína 4B multivesicular, um membro dos complexos de classificação endossômica necessários para o transporte-III (ESCRT-III), o p9 recruta esta via para mediar a liberação de partículas do vírus da progênie (Puffer et al., 1997; Strack et al., 2003; Zhai et al., 2008).

As proteínas *pol* também são produzidas por clivagem proteolítica (novamente pela protease viral) de um precursor de poliproteína (PR180gag/pol) e consistem em protease (Pr), transcriptase reversa (RT), que também pode apresentar atividade de RNase H, dUTPase (DU) e integrase (IN). A proteína RT é geralmente composta por um heterodímero contendo subunidades de 66 kDa (p66) e 51 kDa (p51) em que o p51 necessita da atividade RNase H (Coggins, 1981; Rausch et al., 1996; Souquet et al., 1996; Souquet et al., 1998; Wohrl et al., 1994). Em comum com outros retrovírus, o RT de EIAV é altamente sujeito a erros com uma tendência a catalisar incompatibilidades A:C. Além disso, esses erros de transcrição não são corrigidos porque a replicação viral inicial ocorre no citoplasma da célula onde as atividades de revisão de células estão ausentes e a RT não possui atividade de exonuclease 3'5'

(Bakhanashvili e Hizi, 1993, conforme revisado em Smyth et al., 2012) Como consequência da alta taxa de erro, prevê-se que cada rodada de transcrição reversa resulte na introdução de pelo menos uma mutação no genoma viral, produzindo aumentos significativos na diversidade genética. As populações resultantes de vírus geneticamente relacionados competindo dentro de um ambiente altamente mutagênico são hoje consideradas e denominadas “quasispécies”.

Os produtos do gene *env* do EIAV também são produzidos como uma poliproteína que é clivada por endoproteases celulares para produzir a proteína de superfície (SU) ou gp90 e a transmembrana (TM) ou glicoproteína do envelope gp45. Estas proteínas estão envolvidas na ligação ao receptor celular (identificado como Receptor de Lentivirus Equino-1 [ELR-1]) um membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (ZHANG *et al.*, 2005), e infecção subsequente das células hospedeiras. A organização do gene *env* de EIAV é típica daquela descrita para outros retrovírus na medida em que codifica as glicoproteínas de envelope de superfície (SU ou gp90) e transmembrana (TM ou gp45). Estes são traduzidos como uma poliproteína que é subsequentemente clivada pelas endoproteases celulares. Não se sabe se o heterodímero SU/TM se associa para formar uma estrutura multimérica na superfície da partícula EIAV madura semelhante aos trímeros SU/TM que ocorrem no HIV-1 (Liu et al., 2008). Aproximadamente metade do peso molecular aparente de EIAV gp90 é composto de resíduos glicosilados, embora conforme mostrado por estudos longitudinais em pôneis infectados com uma variante adaptada a fibroblastos patogênicos (EIAVPV) de EIAVWY as posições de muitos locais de N-glicosilação potenciais na região de codificação de SU estão sujeitas a alterações durante o curso da infecção (Leroux et al., 2001). A SU do EIAV, em comum com outros retrovírus, é responsável pela ligação ao receptor da célula hospedeira. Experimentos “*in vitro*” estabeleceram que a entrada do EIAV, após a ligação das glicoproteínas do envelope aos ELR, ocorre por meio de uma via endocítica mediada por clatrina e dependente de pH baixo (Brindley e Maury, 2005, 2008; Brindley et al., 2008; Jin et al., 2005b) e revelaram que a ligação dos domínios glicoproteicos virais ocorre nos dois terços do terminal C da gp90 do EIAV, como um complexo de determinantes descontínuos (Sun et al., 2008).

Um provável domínio de fusão de membrana foi identificado localizado dentro do domínio N-terminal de TM (Chong et al., 1991). A proteína SU é a única que mostrou conter epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes (Hussain et al., 1987, 1988). No entanto, a estrutura

terciária ou quaternária adotada pela SU pode conferir resistência à neutralização, a menos que os anticorpos efetores estejam presentes em títulos elevados. Isso é sugerido pelo fato de que as substituições não conservadas de aminoácidos induzidas pela passagem em série de uma variante adaptada a células de EIAVWY em células dérmicas de burro fetais (FDD) resultam em aumentos na sensibilidade a anticorpos neutralizantes em 1000-10.000 vezes (Cook et al., 1995).

Um dos principais fatores que contribuem para o estabelecimento de infecções EIAV persistentes é a capacidade do gp90 de sofrer alterações substanciais na sequência sem perda significativa de função. Além disso, essas mudanças não estão limitadas a transições ou transversões de nucleotídeos simples, mas como indicado acima, pode envolver deleções ou inserções relativamente grandes (Leroux et al., 1997, 2001; Zheng et al., 1997). Parece que a força seletiva predominante que impulsiona a evolução da gp90 "in vivo" é a resposta imune do hospedeiro.

O EIAV foi um dos primeiros vírus a ser associado à " deriva antigênica ", pois cada episódio febril sequencial em um equídeo infectado com EIAV é causado por uma variante antigênica que difere na sequência de codificação gp90 de seus predecessores (Kono, 1988; Kono et al., 1973; Leroux et al., 1997, 2001; Rwambo et al., 1990a; Zheng et al., 1997). O fato de que os anticorpos podem induzir mudanças na sequência de nucleotídeos na região de domínios de gp90 é apoiado por experiências em que as variantes antigênicas de EIAV foram produzidas por crescimento na presença de anti-soro neutralizante (Rwambo et al., 1990b). Além de evitar os anticorpos neutralizantes, as substituições também resultam na fuga de respostas imunes mediadas por células específicas (Mealey et al., 2003). O resultado da pressão imune seletiva contínua é que as sequências que codificam gp90 tornam-se cada vez mais divergentes daqueles presentes na amostra infectante original. Por exemplo, em um pônei infectado experimentalmente, sequências de aminoácidos previstos em gp90 diferiram do vírus parental em 6% em 260 dpi (dias após a infecção) e em 13% em 1219 dpi (Craig et al., 2007b). Curiosamente, a variação em gp90 dentro de animais infectados individuais não é distribuída aleatoriamente por toda a molécula, mas principalmente restrita a oito regiões hipervariáveis (Leroux et al., 1997, 2001; Zheng et al., 1997). Sendo o potencial de mudança inerente às sequências virais que codificam a GP90, não é surpreendente que haja uma variação cambial entre os diferentes isolados de EIAV. Por exemplo, EIAVWY previu identidades de

aminoácidos de 65,3%, 63,1%, 56,9% e 63,4% com sequências equivalentes em EIAVLIA, EIAVIRE, EIAVMYI e EIAVPA (Craig et al., 2009). Uma análise de sequências de gp90 de cavalos infectados durante o surto de AIE de 2006 na Irlanda se assemelha aos resultados obtidos em estudos longitudinais em cavalos infectados experimentalmente em que a maior variação ocorre dentro das oito regiões hipervariáveis (Quinlivan et al., 2013). Embora a variação em gp90 dentro de um único isolado pareça estar restrita a certos locais, os alinhamentos entre diferentes sequências de EIAV demonstram que as mudanças de aminoácidos podem ocorrer em toda a molécula com exceção de resíduos de cisteína aparentemente conservados, sugerindo ligações dissulfeto são essenciais para manter a arquitetura molecular desta glicoproteína.

Na ausência de Tat (Transactivator of Transcription Protein), apenas baixos níveis de transcrição basal são observados a partir do LTR de EIAV (Dorn et al., 1990; Dorn e Derse, 1988; Sherman et al., 1988). A proteína atua aumentando a eficiência de alongamento da RNA polimerase II do hospedeiro (PolII), um processo que requer interação com o transcrito de RNA viral nascente após formar uma estrutura de haste-alça específica denominada elemento de resposta de transativação (TAR) (Carvalho e Derse, 1991; Hoffman et al., 1993; Hoffman e White, 1995).

As interações entre Tat e TAR levam ao recrutamento de fatores celulares, incluindo fator de alongamento da transcrição positiva b (P-TEFb), um complexo de proteínas que compreende CDK9 (cinase 9 dependente de ciclina) e ciclina T1 que se acredita aumentar a processabilidade por fosforilar o domínio carboxila da maior subunidade da RNA PolII (Sune et al., 2000). A estrutura cristalográfica de EIAVWY Tat revela domínios N e C terminais flexíveis, um domínio central e uma região básica (Willbold et al., 1994). Portanto, possui uma estrutura semelhante à Tat do HIV-1, com exceção de um domínio rico em cisteína. O domínio central fornece uma estrutura para as regiões flexíveis e é relativamente conservado entre HIV-1 e EIAVWY. Em EIAVWY Tat, o domínio central compreende 15 aminoácidos delineados por dois resíduos de tirosina nas posições de aminoácidos 35 e 49 (Willbold et al., 1994).

A sequência de aminoácidos prevista de EIAVWY Tat compartilha cerca de 75% de identidade com as sequências de aminoácidos equivalentes em EIAVIRE, EIAVLIA e EIAVMYI. No entanto, a maioria das substituições de aminoácidos parece ser conservadora (dados não

publicados) e nos quatro isolados a organização geral do domínio é preservada. Tal como para as proteínas acessórias, Tat recruta proteínas da célula hospedeira que são essenciais para o alongamento dos transcritos de RNA virais nascentes pela RNA polimerase II (RNA POL II) da célula hospedeira (DORN *et al.*, 1990), enquanto Rev promove a exportação nuclear dos RNAs virais genômicos e dos RNAs processados por “splicing” (BELSHAN *et al.*, 1998).

A proteína S2 é exclusiva para EIAV e estudos de mutagênese demonstraram que, embora não seja essencial para a replicação “in vitro”, é um importante determinante de virulência “in vivo” (Fagerness *et al.*, 2006; Li *et al.*, 1998, 2000). Em experimentos de infecção de pôneis com isolados de EIAV geneticamente modificadas para bloquear a expressão de s2 (DS2), as cargas virais associadas ao plasma são várias ordens de magnitude mais baixas do que aquelas observadas em animais inoculados com vírus do tipo selvagem. Este fenótipo atenuado resultou em variantes EIAVDS2 que foram avaliadas como vacinas vivas modificadas (Fagerness *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2000, 2003).

A proteína EIAV S2 antagoniza a ação protetora da proteína SERINC. Mecanicamente, a proteína EIAV S2 recruta AP-2, realoca SERINC3 e 5 nas vesículas endossomais tardias e promove a degradação do SERINC5, impedindo a integração de SERINC3 e SERINC5 em partículas de vírus descendentes. Foi demonstrado que Env também regula a suscetibilidade do EIAV ao SERINC5 (Chande *et al.*, 2016). A expressão de citocinas pró-inflamatórias está aumentada em macrófagos equinos infectados com uma amostra derivada de EIAVWY de tipo selvagem em comparação com sua variante DS2 (Covaleda *et al.*, 2010a). Além disso, em um sistema de dois híbridos de levedura, S2 interage com homólogos equinos do proteassoma 26S ATPase subunidade 3 (PSMC3) e osteossarcoma amplificado 9 (OS-9) (Covaleda *et al.*, 2010b). No entanto, embora a variação S2 ao longo do tempo em equídeos infectados individuais pareça limitada (Li *et al.*, 2000), a proteína não é extensivamente conservada entre diferentes amostras de vírus com EIAVWY compartilhando apenas 46,8%, 54,4% e 39,7% de identidade de aminoácidos com EIAVIRE, EIAVLIA e EIAVMIY respectivamente. Além disso, há variação entre isolados nas sequências supostamente identificadas em um vírus derivado de EIAVWY como Nucleoporina, ligação de domínio SH3 e motivos de sinal de localização nuclear (Li *et al.*, 2000). Dito isto, as substituições de aminoácidos no motivo Nucleoporin parecem ser conservativas.

A proteína EIAV Rev facilita a exportação nuclear de RNA viral incompletamente processado e, quando está ausente, apenas o mRNA tat / rev bicistrônico está presente no citoplasma (Belshan et al., 2000; Gontarek e Derse, 1996; Martarano et al., 1994; Stephens et al., 1990). Todas as sequências de codificação de Rev estão contidas no gene env com o exon 3 estando na mesma janela de leitura de SU, enquanto o exon 4 está em uma janela de leitura diferente sobrepondo-se a região que codifica a cauda citoplasmática de TM. O Rev se liga ao RNA viral por meio do elemento específico de resposta ao Rev (RRE) e, em seguida, sofre multimerização com passagem através da membrana nuclear dependente de um sinal de exportação nuclear (Hope, 1997). A exportação nuclear de RNA viral incompletamente processado em células infectadas com EIAV é inibida pela leptomicina B, sugerindo que, como em outros sistemas lentivirais, é mediada por uma proteína celular célula CRM1 (necessária para manutenção da região cromossômica) ou via dependente de exportina (Nishi et al., 1994; Fornerod et al., 1997; Otero et al., 1998).

A repetição terminal longa (LTR) contida no DNA proviral de todos os retrovírus compartilham a mesma organização básica compreendendo um segmento 30 único (U3), uma região repetida curta (R) e uma extremidade 50 única (U5). A região U5 de 50 nt de EIAV é mais curta do que aquela observada em muitos retrovírus. Estudos de alinhamento comparativos demonstram que o comprimento do LTR varia entre os isolados de EIAV com EIAVWY, EIAVLIA, EIAVIRE e EIAVMYI com comprimentos de nucleotídeos de 323 bp, 316 bp, 313 bp e 306 bp, respectivamente. Além das diferenças de tamanho, há menos de 80% de identidade de sequência de nucleotídeos nas LTRs entre os quatro isolados diferentes, embora a maioria dessa variação ocorra na região U3 a montante do fator de transcrição conhecido. A região intensificadora dentro de U3 parece ser extensivamente conservada entre os diferentes isolados em que todas elas contêm um sítio de proteína de ligação ao DNA metilado (MDBP), uma sequência de reconhecimento TATA Pol II e a presença de seus motivos de ligação no LTR de EIAV é crítica para sua expressão em macrófagos equinos (Hines et al., 2004; Maury, 1994). Além da sua influência na transcrição viral em macrófagos, o EIAV LTR também contém um sítio de adição de poli-A e o motivo haste-alça TAR, que são conservados entre todos os isolados caracterizados até o momento (Maury et al., 1998).

1.3 - OS HOSPEDEIROS DO EIAV – CAVALOS, ASININOS E MUARES - E SUAS PARTICULARIDADES

Como dito anteriormente, o Vírus da Anemia Infecciosa Equina é capaz de infectar cavalos e pôneis (*Equus caballus*), asininos (*Equus asinus*) e muares (*E. caballus* X *E. asinus*), que são membros da família *Equidea*.

Cavalos e jumentos são mamíferos pertencentes ao gênero *Equus*, que surgiram há aproximadamente 4,5 milhões de anos. Embora haja uma herança compartilhada entre eles, os cavalos e os jumentos são diferentes em suas características físicas e comportamentais. Os cavalos têm pelagem específica dos equinos, pescoço mais alongado e cabeça mais definida. Os asininos (jumentos) são menores, têm pescoço menor, mais grosso, pelagem cinza e uma cruz na linha dorsal (Burden & Thiemann, 2015).

O cruzamento dessas duas espécies resulta em um híbrido estéril, denominado burro ou mula, que possui as características das duas espécies progenitoras, gerando uma grande diversidade de tipos corporais e temperamentos, porém, suas características fisiológicas se assemelham às do cavalo. A esterilidade dos muares se deve ao resultado da reprodução entre cavalos, que possuem 64 cromossomos, e os jumentos, que possuem 62 cromossomos. O resultado deste cruzamento é um filhote (mula ou burro) com 63 cromossomos. Cromossomos de número ímpar conferem alterações na meiose, dificultando, assim, a viabilidade da reprodução (Matthews et al., 2013)

Atualmente, a população mundial de equídeos é estimada em 116,7 milhões de animais, compreendendo 57,7 milhões de cavalos e pôneis, 50,4 milhões de jumentos e 8,5 milhões de muares (burros e mulas) (FAO. FAOSTAT., 2020).

A maioria das populações de burros e muares está concentrada no continente asiático, bem como em alguns países da América Central, América do Sul e África, garantindo a subsistência de 500 milhões de pessoas em comunidades pobres em países em desenvolvimento ao redor do mundo. Esses animais são usados principalmente como animais de trabalho (transporte de carga e tração) e para o transporte de pessoas. No entanto, a industrialização e mecanização da agricultura tem levado a um abandono crescente e global desses animais, que passam a viver de forma “errante”, perambulando pelas estradas podendo causar acidentes de trânsito além de representarem uma fonte potencial de transmissão de doenças infecciosas por vírus importantes, como o vírus da anemia infecciosa equina (Toribio, 2019).

Embora representem uma peça importante na cadeia de transmissão da AIE, a relação hospedeiro-vírus entre o EIAV e os jumentos (*Equus asinus*), burros e mulas têm sido pouco estudados e quase todos os trabalhos experimentais publicados sobre a AIE e sobre o EIAV estão relacionados a cavalos (*Equus caballus*).

Um dos estudos que consideram o curso da infecção em burros foi realizado por Cook e colaboradores (2001) e tinha por objetivo investigar as respostas sorológicas em burros à infecção por variantes de EIAV que produzem doença moderada a grave em cavalos. Os pesquisadores descreveram a resposta de burros desafiados por dois isolados de EIAV (a variante EIAVPV derivada da versão avirulenta do isolado Wyoming de EIAV (Malmquist et al., 1973); e o isolado Wyoming de EIAV (EIAV_{WY}). Neste trabalho observou-se que os burros permaneceram assintomáticos ao longo de um período de observação de 365 dias, exceto por trombocitopenia transitória leve. Eles apresentaram uma redução no nível de RNA viral associado ao plasma de 1000 vezes, e os anticorpos para p26 reduziram 5 vezes em comparação com os anticorpos produzidos por cavalos. Os autores destacaram neste trabalho, que o potencial reduzido de replicação viral descrito em burros não isenta esses animais de fazerem parte da cadeia de transmissão do EIAV (Cook et al., 2001).

A situação epidemiológica da AIE em jumentos foi estudada por Oliveira e colaboradores em 2017. Neste estudo foram analisados 367 jumentos e a prevalência de AIE nessa população revelou taxas positivas de 1,6% (6/367) em ensaio de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). No estudo de resposta imune dessa população foi possível observar maior tendência de variação na expressão das citocinas TNF- α (24 h), IL-6 e IFN- β (96 h) nos cultivos de PBMC de cavalos do que de jumentos pós-infecção com EIAV_{WY}. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de TNF- α , IL- α , IL-6 e TGF- β nas infecções de macrófagos de jumentos com a amostra patogênica e não patogênica do EIAV ($p \leq 0,05$). Na discussão desse trabalho, os autores dissertam sobre a necessidade de estudos adicionais para investigar se os jumentos que reagiram com a p26 são recentemente infectados, ou foram expostos a outras amostras de EIAV antigenicamente distintas ou outros retrovírus que ainda não foram identificados. As alterações no perfil de citocinas pelos macrófagos infectados nesse estudo talvez indique que a patogênese da AIE em jumentos ocorra por mecanismos diferentes daqueles estabelecidos para os cavalos. Os resultados das infecções “in vitro” indicaram, portanto, a necessidade de se aprofundar os estudos da resposta imune celular de jumentos ao EIAV, bem como pesquisar outros fatores relacionados ao hospedeiro, como por exemplo receptor de lentivírus equino (ELR) e fatores

de restrição retroviral, que podem ser diferentes dos fatores relativos aos equinos (Oliveira et al., 2017)

Em um trabalho recente, Dias-Costa e colaboradores (2021) demonstraram a circulação do EIAV na população de jumentos do Ceará, Brasil com base em ensaios imunológicos e pela primeira vez com abordagens moleculares. Um total de 124 jumentos foram avaliados quanto à presença do vírus e para tanto foram realizados testes sorológicos como IDGA, ELISA, usando proteína recombinante EIAV gp90 (rgp90) e proteína recombinante p26 (rp26), além da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene EIAV tat-gag. Com o resultado deste trabalho ficou evidente a circulação do EIAV entre os animais estudados, comprovando a importância destes animais como reservatórios da AIE. Neste estudo ficou comprovado também que a proteína gp90 usada entre os testes diagnósticos ELISA mostrou maior sensibilidade, o que poderia ser explicado pela produção de anticorpos específicos anterior à soroconversão na presença da proteína p26, usado no IDGA e em outros testes ELISA. A análise molecular por meio da reação em cadeia pela polimerase permitiu realizar neste estudo um perfil filogenético que comprova a relação próxima aos isolados cujos genomas foram previamente descritos (Malossi et al., 2020).

A situação dos mueres portadores de AIE encontradas no território brasileiro, especificamente da região nordeste, é ainda mais preocupante no que diz respeito ao controle da doença na região. Exceto pela citação da avaliação da AIE em mulas descritas em dois trabalhos na Itália em 2012 (Maresca et al., 2012) e na Etiópia em 2014 (Getachew et al., 2014), nenhum estudo sobre a situação destes animais foi realizado até o momento.

1.4 - MECANISMOS DE INFECÇÃO

O alvo primário do EIAV no hospedeiro são os monócitos, no entanto, proteínas virais não são sintetizadas nessas células, pois o vírus necessita que as células se diferenciem em macrófagos maduros para que seu ciclo viral se complete (Sellon, 1993; Maury, 1994; Fidalgo-Carvalho et al., 2009). Algumas amostras do EIAV podem infectar células endoteliais (Maury et al., 2005) e existem relatos da presença da expressão de antígenos do EIAV em células epiteliais de pulmão de cavalos infectados na Romênia (Bolfá et al., 2013). A importância deste achado em termos de potencial de transmissão por aerossol que também é observado em alguns retrovirus como o Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) e lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) ainda

não foram determinadas. Embora as amostras de campo do EIAV possam ser adaptadas em laboratório para se replicar em células fibroblásticas de equinos ou caninos este processo resulta na atenuação do vírus “in vivo” (Carpenter & Chesebro, 1989).

A infecção dos monócitos/macrófagos pelo EIAV tem início com a ligação da glicoproteína do envelope gp90 ao receptor ELR-1 (Equine Lentivirus Receptor 1) da célula hospedeira (Zhang, et al., 2005; Lin et al., 2013). Após essa ligação, ocorrem mudanças conformacionais, tanto na gp90, quanto na membrana celular, o que permite a fusão viral na célula hospedeira quando ocorre então a penetração da partícula viral. Essa entrada se dá por uma via endocítica dependente de pH baixo (Brindley; Maury, 2005; Jin et al., 2005) e mediada por clatrina (Brindley et al., 2008).

A transcrição reversa normalmente começa logo após a entrada do virion no citoplasma da célula infectada, com o emparelhamento de um iniciador RNAt na região U3 do RNA viral denominada sítio de ligação de primer ou PBS (Primer Binding Site) (Figura 3). O DNA é primeiro sintetizado a partir deste iniciador, utilizando o genoma de RNA de cadeia positiva como molde para formar sequências de DNA de cadeia negativa. A síntese ocorre em direção à extremidade 5' do RNA até CAP3', gerando as sequências U5 e R. O primer RNAt permanece ligado à sua extremidade 5'. Essa síntese também pode ser iniciada “prematuramente” durante a montagem e liberação do vírion, de tal modo que as preparações de vírions podem conter pequenas quantidades dos intermediários iniciais do DNA proviral (Fields; Knipe; Howley, 2007).

A degradação do híbrido DNA:RNA é mediada pela atividade da RNase H para liberar a fita de DNA a ser transferida até a extremidade 3' do genoma (Fields; Knipe; Howley, 2007). A proteína NC (nucleocapsídeo) auxilia na translocação do fragmento de DNA até a outra região R no genoma. Embora existam relatos que essa translocação ocorra para a região R do outro RNA genômico (translocação em trans), a melhor evidência é que a transferência ocorra aleatoriamente para qualquer uma das duas fitas de RNA viral (Yu et al., 1998). Ao se ligar na extremidade 3', esse fragmento de DNA cria um iniciador para a síntese do DNA proviral pela RT, e, à medida que o genoma entra na forma híbrida DNA:RNA pela ação da enzima, o RNA torna-se novamente suscetível à ação de RNase H da RT (Fields; Knipe; Howley, 2007). O primer responsável pela síntese da segunda fita de DNA é resultante da digestão do RNA híbrido em uma região com sequência rica em purinas perto da extremidade 3' do

genoma. Assim, a fita positiva é sintetizada até a extremidade 3' do genoma usando a fita negativa de DNA como molde. O primer, uma vez que serviu para iniciar a síntese de DNA, é rapidamente removido do DNA pela ação da RNase H (Fields; Knipe; Howley, 2007). A fita positiva é novamente transferida para a outra região R, quando a síntese da segunda fita se completa (Figura 3). O produto da reação de transcrição reversa é uma versão de DNA linear de cadeia dupla de comprimento total do genoma, flanqueada em cada extremidade por cópias da LTR. Formas de DNA proviral circularizadas com a união do LTR podem ser encontradas também, embora não seja consenso que estas possam se integrar no DNA genômico. Este dsDNA forma o complexo pré-integração (pre-integration complex - PIC) juntamente com a integrase IN e outras proteínas virais e celulares, que migram e entram no núcleo com o auxílio de *s2* (Li et al., 2000). A integração do DNA retroviral no genoma do hospedeiro é essencial para o ciclo de multiplicação de retrovírus. Mutantes incapazes de integrar não estabelecem a infecção na célula (Fields; Knipe; Howley, 2007). Não há mecanismo para eliminar o provírus eficientemente e uma vez que esteja estabelecido este é passado para as células filhas durante a divisão celular, estabelecendo uma infecção persistente (Fields; Knipe; Howley, 2007). A integração é mediada pela IN, que ainda no PIC no citoplasma corta o dinucleotídeo TT das extremidades do DNA proviral, deixando as pontas do LTR com extremidades 3'-OH recuadas. Esta primeira reação catalisada pela IN é chamada de processamento. Dentro do núcleo, a integrase promove a clivagem do DNA alvo hospedeiro com um escalonamento de 4 a 6 pb, bem como a ligação das extremidades 3'-OH do DNA proviral a fosfatos alternados do alvo no DNA hospedeiro clivado. A remoção dos 5' nucleotídeos não complementares do DNA proviral e o reparo das lacunas no DNA são realizados por enzimas do hospedeiro, que geram um provírus covalentemente integrado mais curto em 2 pb em cada extremidade e flanqueado por duplicações do local alvo (Liu; Andrade; Skalka, 2015).

O genoma proviral integrado marca o fim da fase inicial de replicação do retrovírus, que é caracterizada pela ação das enzimas virais. Agora, o genoma proviral será processado por enzimas do hospedeiro, com etapas normais à célula, como a transcrição, splicing e tradução. Os transcritos retrovirais são modificados com a adição de uma cauda poli (A), como os RNAm celulares. Uma fração do RNA viral é processada e exportada para fora do núcleo para servir como RNAm para tradução em proteínas virais. O restante do RNA viral permanece sem ser processado e deve ser transportado do núcleo para o citoplasma, onde ele serve duas funções: (i) como o modelo para a tradução das proteínas estruturais virais, Gag e Gag-Pol; e (ii) como o genoma viral, que é empacotado em partículas virais. A proteína rev auxilia na exportação do

RNA_m do núcleo (Stake et al., 2013). O RNA genômico forma um dímero não covalente (duas cópias) e é encapsulado por meio de uma interação entre a sequência de empacotamento e o NC (nucleocapsídeo). A proteína tat auxilia no aumento da taxa transcricional com a ligação a TAR, localizado no LTR (Tang; Kuhlen; Wong-Staal, 1999). As glicoproteínas de env são inseridas na membrana plasmática via Golgi.

A montagem da partícula retroviral para o brotamento é impulsionada principalmente pela proteína precursora gag. O agrupamento de gag faz com que a membrana a envolva com as glicoproteínas virais e, eventualmente, cause o brotamento (Stake et al., 2013). A localização do brotamento de lentivírus parece ser específica do vírus e da célula hospedeira. O sítio de montagem das partículas de EIAV ocorre na rede trans-Golgi, (Zhang et al., 2016). Uma vez embalada, a protease viral cliva a poliproteína gag/pol para formar o viri3n maduro (Fields; Knipe; Howley, 2007).

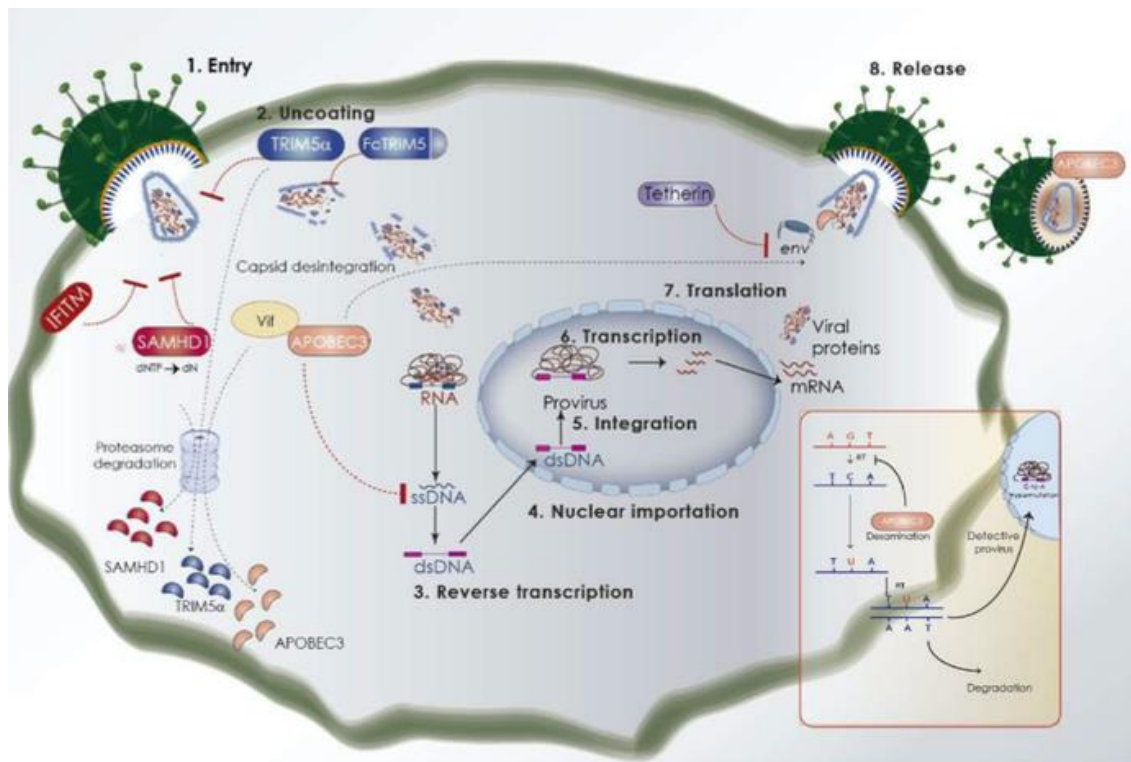


Figura 3: Modelo de replicação em retrovírus. A infecção inicia-se com a ligação da glicoproteína env viral ao receptor de superfície celular e a subsequente fusão do envelope viral com a membrana celular (1). O genoma viral é transcrito reversamente de RNA para DNA (2) e o provírus é integrado no genoma da célula hospedeira (3). A partir do genoma proviral, o RNA viral é transcrito pela polimerase celular e parte dele sofre splicing alternativo para traduzir a glicoproteína env e outras proteínas acessórias (4). Uma porção do RNA viral sem processamento é exportado do núcleo pela proteína rev (5) para traduzir gag e gag-pol (6). As

proteínas gag de alguns retrovírus migram através do núcleo durante a montagem (7). A seleção do gRNA pode ocorrer no citoplasma (8). O complexo gag-RNAg é transportado para a membrana plasmática (9) onde moléculas adicionais de gag se ligam para completar a montagem da partícula viral imatura, que brota a partir da membrana plasmática (10). Modificado de Maiso-Pablo et al., 2018.

1.5 – MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DO EIAV

A transmissão natural mais comum do EIAV é via insetos da família Tabanidae (*Tabanus sp.*) também conhecidos como moscas dos pântanos (Cook et al, 2013). Outras moscas, como as da espécie *Stomoxys calcitrans*, também são capazes de transmitir o vírus, mas são menos eficientes que os tabanídeos. As fêmeas dessas espécies possuem o hábito da hematofagia, pois ela é necessária para a maturação de seus ovos. Ao realizarem o repasto sanguíneo, as moscas passam a albergar temporariamente o vírus em sua probóscides e a transferência do agente viral ocorre quando este é interrompido e imediatamente continuado em um segundo animal (Foil et al., 1978; Bowman et al., 2006). Importante destacar que, especialmente os tabanídeos, são potentes vetores da AIE, pois as fêmeas realizam grandes repastos sanguíneos, com considerável acúmulo de sangue em suas proboscídes.

O vírus pode ser transmitido também iatrogenicamente por meio de agulhas ou instrumentos cirúrgicos contaminados, bem como por transfusão de hemoderivados contaminados. A transmissão do EIAV também pode ocorrer pelo contato do sangue infectado com feridas expostas de um animal saudável. Além dessas rotas de transmissão, alguns estudos mostraram a possibilidade da dispersão do EIAV por transmissão vertical por via uterina / perinatal (ou seja, no útero, no parto), ou após a ingestão de colostro infectado, bem como por aerossóis (Bolfá et al., 2013).

1.6 - SINAIS E SINTOMAS DA AIE

Com base na infecção experimental de cavalos com EIAV, a AIE pode ser caracterizada por três estágios definidos: agudo, crônico e assintomático de longo prazo (Issel e Coggins, 1979; Sellon, 1993).

A exposição inicial a uma amostra virulenta geralmente resulta em uma doença aguda caracterizada por febre, diarreia, letargia, anemia e trombocitopenia. Nesse momento, a carga viral concentra-se principalmente no fígado, pulmão, rim e baço e níveis mais baixos também

são detectados nos linfonodos, medula óssea e monócitos circulantes. A presença e replicação viral nesses órgãos determinam as lesões nos tecidos e consequentes sinais clínicos, sendo observado em especial hepatomegalia e esplenomegalia (Craig; Montelaro, 2008). No entanto, o sinal mais marcante da doença é a anemia, que ocorre tanto por hemólise imunomediada (eritrofagocitose e hemólise mediada pelo complemento), como pela depressão da medula óssea, intimamente ligada à replicação viral. Associada a isso está a trombocitopenia, que é um sinal precoce da doença que ocorre quase em todos os casos. Os mecanismos pelos quais ela ocorre não foram bem elucidados, no entanto, fatores produzidos pelos macrófagos infectados, como o TNF- α , TNF- β e IL-6 podem ter participação na depleção plaquetária por inibição do crescimento dos megacariócitos (Leroux et al., 2005; Craig; Montelaro, 2008; Ravazzolo; Costa, 2017). Além de interferir no desenvolvimento das plaquetas, o TNF- α induz episódios febris ao desencadear a cascata de produção do ácido araquidônico que leva à origem da produção de prostaglandina E2 (PGE2) e desregula a eritropoiese, sendo este mais um mecanismo de formação da anemia (Leroux; Cook, 2016).

Após esse episódio clínico inicial, a maioria das infecções tipicamente progride para AIE crônica, caracterizada por ciclos repetidos da doença em intervalos irregulares e associada a ondas de viremia. Com o tempo, a frequência dos episódios da doença e a gravidade dos sinais clínicos geralmente diminuem. Os cavalos infectados de forma persistente tornam-se clinicamente assintomáticos para AIE indefinidamente, atingindo o estágio de portador assintomático, permanecendo infectados por toda a vida. Por qualquer motivo, se for induzida a imunossupressão os animais passam a apresentar alta viremia e os sintomas clássicos das fases aguda e crônica (Leroux et al., 2004).

1.7 - MECANISMOS DE ESCAPE IMUNOLÓGICO DO EIAV

Um dos principais mecanismos de resistência dos lentivírus é sua capacidade de evoluir na resposta ao desafio do sistema imunológico do hospedeiro. O EIAV pode resistir à resposta imunológica usando fatores de restrição retrovirais (FRR) para persistir no organismo do animal por toda sua vida. O EIAV desenvolveu várias estratégias durante sua evolução para alcançar este objetivo, dentre as quais, destacam-se:

- Integração do DNA proviral dentro da cromatina da célula hospedeira.
- O fato de o EIAV infectar monócitos, mas não estar ativo nessas células permite o estabelecimento de um período de latência onde o vírus pode ser transportado pelo organismo do animal sem o reconhecimento pelo sistema imune (Harrold et al., 2000).
- Resistência inata aos fatores de restrição retrovirais (FRR). Um dado recente sugere que as proteínas Env do EIAV são resistentes ao ortólogo equino da teterina, um FRR que ancora partículas virais da progênie na membrana da célula hospedeira, evitando desta forma a continuação da infecção (Neil et al., 2008; Yin et al., 2014). Também tem sido sugerido que o EIAV é resistente as proteínas APO β EC 3 equina (Zielonka et al., 2009; Bogerd et al., 2008), como descrito anteriormente.
- Resistência estrutural aos anticorpos neutralizantes. A proteína de superfície (SU) do EIAV e a única proteína viral que contém epítomos que são reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes. O fato de a SU ser naturalmente resistente a este tipo de anticorpo é sugerido pela descoberta de que os títulos de anticorpos neutralizantes no soro após a infecção pelo EIAV apresentaram um aumento de cerca de 1.000 a 10.000 vezes quando da introdução de substituições de aminoácidos específicos nesta glicoproteína (Cook et al., 1995).
- Variação genética e antigênica. A transcriptase reversa (RT) dos retrovírus não possui capacidade revisora de leitura, não sendo, portanto, capaz de corrigir erros durante a síntese do DNA proviral. No caso do EIAV a probabilidade de erro é de aproximadamente uma substituição de nucleotídeo a cada ciclo de replicação. Como as mutações também são introduzidas por eventos frequentes de recombinação entre as duas cópias de RNA genômico dentro de cada partícula viral cria-se rapidamente uma população diversa de “quasispécies” que consistem em muitos genótipos diferentes, mas relacionados entre si. Isto permite ao EIAV responder rapidamente a pressão de seleção, como a do sistema imune (Harrold, et al., 2000).

Em infecções experimentais em cavalos, os anticorpos contra o EIAV são detectáveis no ELISA ou immunoblot apenas 14 a 28 dias pós-infecção. No entanto, estes anticorpos não têm, neste período, uma atividade neutralizante viral significativa, uma propriedade que geralmente não é observada antes dos 38-87 dias pós-infecção e não atingem níveis máximos até 90-148 dias pós-infecção (Hammond et al., 1997; Rwambo et al., 1990a). Como os linfócitos citotóxicos (CTL) específicos contra o vírus podem ser detectados aos 14 dias pós-infecção (Mealey et al., 2005) acredita-se atualmente que as respostas imunes celulares e não a resposta humoral seja responsável pelo controle inicial da replicação do EIAV promovendo desta forma um declínio

dos sinais clínicos na fase aguda. Isso posto, deve-se considerar o fato de que pode haver comprometimento dos resultados dos testes sorológicos, já que resultados falso negativos podem ser obtidos em virtude da falta de produção de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos usados para o diagnóstico da AIE.

1.8 - TESTES PARA DETECÇÃO DA AIE

De acordo com a WOA, o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina é feito, oficialmente, por meio do ensaio de Imunodifusão em Gel de ágar (IDGA), descrito por Coggins e Norcross em 1970. O principal antígeno para o diagnóstico de AIE em testes de IDGA e ELISA é a proteína p26. Esta proteína é a mais abundante na partícula viral, é o alvo de uma intensa resposta imune do hospedeiro, é altamente conservada entre os diferentes isolados virais e é antigenicamente mais estável do que as proteínas gp90 e gp45 (Coggins et al., 1972; Shane et al., 1984). As reações específicas desse teste são indicadas através da formação de linhas de precipitação entre o antígeno (p26 do capsídeo viral) e o soro teste, e confirmados e pela identidade com a reação que ocorre entre do mesmo antígeno e o soro padrão positivo.

Esse teste tem sido considerado o padrão ouro para testes sorológicos na maioria dos países. Além disso, a sorologia envolvendo ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) também foi aprovada para o diagnóstico de AIE. Quatro kits ELISA foram aprovados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e estão disponíveis internacionalmente para diagnóstico de AIE. No entanto, a WOA afirma que um resultado positivo por ELISA deve ser retestado usando o IDGA para confirmar o diagnóstico, uma vez que alguns resultados falso-positivos podem ocorrer com ELISA. No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o diagnóstico de AIE deve ser feito por meio do IDGA, embora o uso do ELISA tenha sido recentemente aprovado como ensaio diagnóstico para AIE (Instrução Normativa N^o52, de 26 de novembro de 2018). Porém, nos casos de discordância entre o ELISA e o IDGA, prevalece o resultado obtido no IDGA. O imunoblot também pode ser usado como teste para detecção da AIE. Este teste é um método sorológico mais sensível, pois detecta, simultaneamente, reação de anticorpos anti-gp90, anti-gp45 e anti-p26 com as respectivas proteínas virais (Issel et.al., 1999). O imunoblot possibilita a confirmação do *status* imunológico do animal infectado pelo EIAV, pois é utilizado como ferramenta de estudo da cinética da resposta imune dos equídeos com AIE (Issel e Cook, 1993;

Cullinane, et al., 2007). Esse método não está disponível comercialmente, no entanto, tem sido usado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da AIE no laboratório referência da Universidade do Kentucky, nos Estados Unidos, como também foi utilizado em surto da AIE ocorrido na Irlanda em 2006 (Cullinane et al., 2007) e no Programa de Vigilância da AIE na Itália (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013).

Em resumo, a identificação de equídeos infectados com EIAV fica dependente de métodos sorológicos indiretos, já que são, como dito anteriormente, os únicos testes de diagnóstico oficialmente reconhecido para AIE na grande maioria de países em todo o mundo.

Um grande problema com o uso de testes exclusivamente sorológicos é que há um atraso, ou “janela sorológica”, entre o momento da infecção e a produção de anticorpos específicos detectáveis. Embora em casos de infecções por EIAV de cavalos ou pôneis (*Equus caballus*), isso geralmente seja inferior a 45 dias, períodos de até 157 dias foram relatados para o teste IDGA. Infelizmente, é durante o período imediatamente após a infecção e antes do desenvolvimento de respostas imunes adaptativas que as cargas virais associadas ao sangue podem atingir seus níveis mais elevados, maximizando assim o risco de transmissão. Além disso, Ricotti e colaboradores demonstraram em seus trabalhos que o EIAV pode estabelecer infecções sorologicamente silenciosas semelhantes às observadas com o vírus da hepatite da marmota (WHV) e o vírus da imunodeficiência símia (SIV), nas quais o vírus ou os ácidos nucleicos virais são prontamente detectáveis, mas por razões que não foram identificados, a replicação viral falha em estimular respostas humorais detectáveis. Um outro exemplo que destaca a fraqueza de um sistema de diagnóstico baseado inteiramente em sorologia foi observado durante o surto de AIE italiano de 2006, onde o teste de IDGA realizado após um período de quarentena obrigatório de 90 dias em cavalos sobreviventes estabelecidos na fazenda do caso índice não conseguiu identificar animais infectados adicionais presentes na fazenda, resultando em oito novos casos no ano seguinte. Portanto, embora a "janela sorológica" defina uma necessidade urgente para o desenvolvimento de técnicas de detecção direta para o EIAV, particularmente nos casos em que há suspeita de exposição recente, isso se torna ainda mais aparente se infecções sorologicamente silenciosas com este vírus forem confirmadas.

Claramente, isso ilustra a necessidade de métodos diretos de detecção para este lentivírus equino. Uma alternativa seria, portanto, a detecção de sequências do genoma viral por meio de

métodos moleculares. De fato, e infelizmente, o único método baseado em PCR recomendado pela OIE para o diagnóstico de AIE, no qual se detectava uma parte do gene pol se mostrou ineficaz quando usado durante surtos desta doença na Europa e no Japão (Dong et al., 2016; Cappelli et al., 2011; Nagarajan et al., 2001)

Outros testes baseados na técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) foram, a partir de então, desenvolvidos para detectar o material genético de EIAV (diretamente do DNA proviral ou acoplado com um passo de transcrição reversa para o RNA viral), e alguns foram usados com sucesso com isolados de campo mas somente em regiões geográficas específicas e restritas ao local onde os animais foram diagnosticados, ou seja, os iniciadores usados em determinadas situações com amostras de determinadas regiões não apresentavam sucesso quando usadas para detecção viral em amostras de outras regiões geográficas (Capomaccio et al., 2012b; Cappelli et al., 2011; Cursino et al., 2018; Dong et al., 2012; Nagarajan; Simard, 2001; Quinlivan; Cook; Cullinane, 2007).

De fato, prevê-se que qualquer um dos outros métodos baseados em PCR projetados contra regiões pouco conservadas do genoma viral será limitado à detecção de apenas uma pequena porcentagem de isolados virais por causa de incompatibilidades entre os iniciadores específicos e suas sequências alvo. Esse fato está relacionado à existência de extensa variação genética entre isolados de vírus geograficamente distintos, o que torna difícil projetar ensaios que sejam capazes de detectar a maioria das amostras na circulação atual. Isso é visto como um grande obstáculo para a implementação de rotina de um método diagnóstico baseado em PCR.

Como os métodos moleculares representem uma alternativa altamente sensível para a detecção de EIAV, essas técnicas requerem informações extensas da sequência de nucleotídeos. Há, portanto, uma necessidade urgente de caracterização do genoma de EIAV de isolados em diferentes regiões do mundo (Cappelli et al; 2011; Dong et al., 2013; Reis e Cook, 2014).

Antes que os métodos moleculares baseados em PCR possam ser adotadas rotineiramente, deve ser demonstrado: (i) que os primers (e as sondas) utilizados nestes ensaios estão localizados em regiões altamente conservadas do genoma viral, uma vez que a variação nessas sequências pode impedir ou reduzir significativamente a sensibilidade diagnóstica; e (ii) que as técnicas baseadas em PCR são sensíveis o suficiente para detectar níveis extremamente baixos de ácidos

nucléicos específicos de EIAV presentes em alguns animais clinicamente assintomáticos. Infelizmente, não há evidências conclusivas que demonstrem que qualquer um dos ensaios baseados em PCR descritos até a presente data atende a esses critérios. Assim sendo, as técnicas de diagnóstico atuais para AIE dependem ainda da detecção de anticorpos específicos contra o EIAV. Embora esta seja uma abordagem indireta e seja incapaz de detectar infecções recentes, a sorologia é a opção mais aceita no presente momento (Huggett, et al., 1995; Issel et al., 2014).

A despeito das dificuldades encontrados no desenvolvimento do teste molecular para diagnóstico da AIE, os esforços devem ser continuados na certeza de que esses testes baseados em PCR ou qPCR poderão complementar os esforços de controle de AIE existentes em todo o mundo porque, ao contrário das técnicas de diagnóstico sorológico indireto, eles têm o potencial de identificar equídeos recentemente infectados que representam um risco de transmissão significativo devido à alta viremia. Além disso, tais técnicas são essenciais para confirmar e estabelecer a prevalência de infecções por EIAV sorologicamente silenciosas, particularmente em países onde o vírus é endêmico.

A detecção de EIAV por meio de métodos moleculares pode também contribuir para os dados de incidência da doença, que podem ser subestimados em regiões onde a doença é endêmica, bem como a detecção de novos surtos de AIE para os quais medidas de controle podem ser tomadas para evitar propagação do vírus. A caracterização molecular do EIAV de diferentes regiões do mundo tem aumentado o conhecimento do genoma do vírus e aprimorado, portanto, o desenho de iniciadores, o que contribuirá para o desenvolvimento de PCRs visando diferentes regiões do genoma.

Assim, considerando a importância do diagnóstico molecular da AIE no controle da doença no Brasil, onde existem regiões em que a prevalência da AIE chega a mais de 30% da população de equídeos, pretendemos padronizar um ensaio de detecção do EIAV por PCR em Tempo Real para as amostras brasileiras do vírus

1.9 – PREVENÇÃO E CONTROLE DA AIE

Atualmente, não há vacinas disponíveis contra o EIAV. Como forma profilática de controle da AIE, uma vacina foi desenvolvida em 1975 pelo Harbin Veterinary Research Institute na China (Shen & Wang, 1985). Essa vacina foi desenvolvida pela passagem em série de uma amostra

de EIAV virulento (EIAVDV117) através de culturas de leucócitos de burro, produzindo o isolado EIAIAVDLV121 (WANG et al., 2016). Usada em cavalos chineses entre 1975 e 1990, a vacina foi creditada como a responsável pelo controle de AIE na China. Após este período, o programa de vacinas foi descontinuado (ISSEL et al., 2014).

Embora as vacinas com as amostras de EIAV atenuadas possam proteger contra viremia e doença clínica, as amostras de vacina podem persistir nos animais e não garantem que tais vírus não possam evoluir no hospedeiro. Além disso, pode ocorrer a interferência com o teste de diagnóstico sorológico, além do potencial dos vírus para reverter a virulência, a vacinação não é um componente das estratégias de controle de AIE atuais (ISSEL et al., 2014, Liu et al., 2016). Assim, o controle da AIE continua sendo realizado somente por meio da identificação, segregação e/ou eutanásia de animais infectados com EIAV.

1.10 – A REPERCUSSÃO DA AIE NO BRASIL

O EIAV foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1968, nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. De acordo com informações de agricultores e técnicos, a AIE foi relatada pela primeira vez no Pantanal em 1974 (Silva et al., 2001). De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), entre 2018 e 2019, houve 10.614 casos de AIE no Brasil com 6.905 focos, número bastante significativo em relação à população de equinos.

Vários são os estudos sobre a prevalência de AIE, porém essa prevalência é bastante variada dependendo do perfil zootécnico estudado e da região estudada (Almeida et al., 2017; Cutolo et al., 2014). Silva e colaboradores (2016) observaram ampla distribuição geográfica da AIE no Brasil, com variação nas taxas de prevalência desta enfermidade. Em seis anos de pesquisa sobre a prevalência de AIE em municípios do meio-norte mato-grossense, verificaram tendência de redução com o passar dos anos (3,76%; 4,26%; 2,89%; 3,11%; 2,89% e 2,40%), devido ao monitoramento realizado nos animais, bem como a realização periódica de exames, que permitem a adoção das medidas de controle da doença, e por fim, a eliminação dos positivos, como medida de defesa sanitária animal. Em outro estudo realizado em região pantanosa, Silva et al. (2001) verificaram uma taxa de prevalência de 18,2% em animais de serviço, utilizados na lida de gado na região do pantanal sul-mato-grossense. Esta alta taxa de prevalência está relacionada a animais de trabalho, ou seja, equinos de criação mais rústica, de idade mais avançada, muitas vezes, sem preocupação sanitária por parte dos produtores.

Também foi encontrada baixa prevalência de AIE em haras no estado de Minas Gerais (0,44 %). Observa-se que há cumprimento mais rigoroso da legislação quando se trata de animais com alto valor zootécnico, ou seja, controle sorológico periódico em dia e eutanásia de animais positivos ao teste de IDGA. Dessa forma, é possível manter propriedades livres da doença, uma vez que cavalos de haras geralmente viajam mais e são submetidos aos controles oficiais com maior frequência do que os animais de serviço (Almeida et al., 2017). Barzoni e colaboradores (2018) afirmam que levantamentos sobre a real situação da prevalência de AIE no Brasil são dificultados pelo fato de que os dados levantados até então, referem-se apenas aos testes realizados naqueles animais que estão com resultado negativo para emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) ou em casos de levantamento para certificação de propriedades pelo órgão oficial. O fato de não existirem dados epidemiológicos dos animais utilizados para trabalho, que constituem a maior parte do plantel de equídeos brasileiro, pode ser considerado um entrave para os estudos da real situação da enfermidade.

De fato, as estatísticas oficiais da AIE sobre equídeos não relatam com precisão a prevalência da doença nos países a que se referem, e as estatísticas são quase exclusivamente baseadas em testes laboratoriais realizados sobre o trânsito de animais e/ou participação em eventos controlados pelos Serviços Veterinários Oficiais. Isso geralmente envolve animais de valor de interesse zootécnico. Acredita-se que essa estimativa seja ainda mais comprometida para mulas e burros, que normalmente são animais de baixo valor econômico.

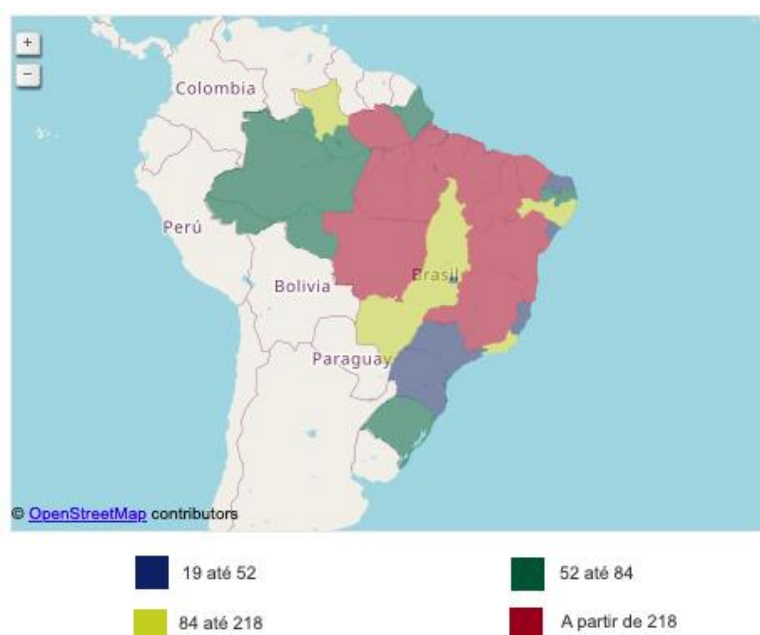


Figura 4: Situação da Anemia Infecciosa Equina reportada no Brasil entre 2018 e 2019 segundo o Banco de Dados de Informação sobre Saúde Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA – Disponível em: Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>. Acesso em: 09.05.2022

1.11 - LEGISLAÇÃO DA AIE NO BRASIL

Quanto a legislação vigente no Brasil, a Instrução Normativa nº 45 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) detalha as normas de prevenção e controle da AIE. Nela está descrito o processo da eutanásia à qual os animais que são diagnosticados com AIE devem ser submetidos (BRASIL, 2004). Isso traz grandes prejuízos aos proprietários e produtores, pois além da perda dos animais que são eutanasiados, toda a propriedade deve ser interditada até que ela seja declarada como controlada, após dois testes consecutivos com intervalo de tempo de 30 a 60 dias, sem a detecção de animais reagentes. Além disso, a eutanásia e os procedimentos para enterrar o animal também devem ser custeados pelos proprietários, sem nenhuma indenização por parte do poder público. Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA's) são responsáveis pelo diagnóstico, mas outros laboratórios podem realizar o teste de IDGA, contanto que sejam credenciados para a sua realização (BRASIL, 2018). Ainda é necessário que seja atendida uma série de critérios, desde o espaço físico das instalações e equipamentos às normas de biossegurança exigidos. Em 2008 foi publicada a Instrução Normativa nº 17 (BRASIL), que instituiu o Programa Nacional de Sanidade Equídea (PNSE), visando fortalecer o setor agropecuário dos equídeos. Esse programa tem como objetivo prevenir, diagnosticar, controlar e erradicar a AIE e outras doenças importantes que afetam a equideocultura, como o Mormo, através de atividades de educação sanitária, estudos epidemiológicos, controle do trânsito de animais, cadastramento, fiscalização e certificação sanitária e intervenção imediata quando da suspeita ou ocorrência de doença de notificação obrigatória. O Decreto nº 5.741 de 2006 (BRASIL) instituiu o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), órgão que atua em diferentes instâncias, operando em favor da sanidade agropecuária (animal e vegetal), realizando para isso atividades de vigilância e defesa sanitária, inspeção de produtos de origem animal e vegetal e fiscalização dos insumos e serviços utilizados nas atividades agropecuárias. Neste decreto é atribuída à SUASA a função da fiscalização e controle do trânsito de animais, de acordo com as obrigações de cada instância. Para ser realizado o movimento de animais, seja qual for a sua finalidade, é obrigatório que os

animais possuam a Guia de Trânsito Animal (GTA), que só pode ser emitida por Médicos Veterinários devidamente habilitados. Para que seja permitida a um equídeo a realização de trânsito interestadual, ele obrigatoriamente deve ter resultado negativo para a AIE, exame esse realizado em um laboratório oficial ou credenciado. Esse exame tem validade de 60 dias.

1.12 – AS CARACTERÍSTICAS DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO EIAV

O EIAV tem uma epidemiologia molecular global muito complexa, caracterizada por níveis relativamente baixos de identidade de sequência de nucleotídeos entre isolados geograficamente distintos e a existência de numerosos clados entre as amostras. Esta hipótese tem sido sustentada por estudos envolvendo a sequência de nucleotídeos e análise filogenética das sequências dos genes do EIAV, bem como de sequências completas do genoma do vírus. Estes estudos mostram uma variação significativa na identidade de sequência de aminoácidos prevista entre isolados virais, juntamente com a segregação em vários grupos monofiléticos.

Portanto, devido à clonalidade regional do EIAV e dada a grande variabilidade das sequências gênicas das amostras mesmo dentro de uma mesma região geográfica, o desenvolvimento de técnicas de detecção deve ser criado levando-se em consideração esta variabilidade genética ou antigênica das amostras que estão em circulação. Neste sentido, diversos estudos vêm sendo realizados na tentativa do desenvolvimento de um teste molecular robusto o suficiente para garantir a identificação precoce de animais infectados, o que pode controlar a dispersão viral entre os animais. Por exemplo, em 2012, Kuhar e colaboradores realizaram a detecção molecular de isolados eslovenos do EIAV usando como alvo a região P15 do gene gag. No estudo, os autores descreveram o maior primeiro relato de uma diversidade genética tão alta de amostras de EIAV deste país e concluíram que os resultados da análise filogenética também fornecem conhecimento adicional sobre a natureza altamente heterogênea do genoma do EIAV.

Em outro estudo, Gaudair e colaboradores (2016) analisaram os isolados de EIAV de um grande surto de AIE ocorrido na França em 2009. Neste estudo, a caracterização molecular dos vírus foi realizada a partir da sequência completa do gene gag (1.400 pb) dos DNAs provirais extraídos de um total de 14 animais. As sequências obtidas foram analisadas e depositadas no GenBank (acesso KT764943, KT764944, KT764946–KT764951 e KT764953–KT764956), bem como duas sequências parciais do gene gag (acesso KT764945 e KT764952). A análise

filogenética desses isolados demonstrou a presença de um grupo monofilético associados às demais amostras francesas, cujo gene gag foi sequenciado e depositado no mesmo banco de dados.

Em 2020, Cursino e colaboradores realizaram a detecção molecular partir do sequenciamento de DNA proviral de EIAV de equinos brasileiros. Neste trabalho foi identificada a região genômica do exon 1 de tat para gag (tat-gag). Testes sorológicos comparativos, compreendendo IDGA e dois ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), também foram realizados. Das 133 amostras, 58 foram positivas na PCR tat-gag e 49 foram obtidas sequências nucleotídicas de 272 pb. Usando este PCR tat-gag desenvolvido, o DNA proviral do EIAV foi detectado em 7% das amostras negativas para IDGA e em 26% das amostras negativas para IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA utilizados. A partir da análise filogenética das sequências do EIAV do Pantanal Brasileiro foi possível a identificação de agrupamento único e diferente dos clados de sequências de EIAV de outros países.

Em 2021, Romo-Sáenz e colaboradores desenvolveram ensaios de Nested-PCR e Semi-Nested-PCR mais eficazes do que o teste de AGID para identificação de EIAV em cavalos não sintomáticos no início dos estágios da doença. Análise BLAST do segmento 5'-LTR/tat de 203 pb do produto de PCR revelou 83-93% de identidade com isolados de EIAV no GenBank e amostras de referência de outros países. Por análise filogenética, as amostras mexicanas foram agrupadas em um clado diferente de outras sequências relatadas em todo o mundo, indicando que a região LRT/tat representa um importante alvo para a detecção de cavalos não sintomáticos.

1.13 - CONTRIBUIÇÃO DO SEQUENCIAMENTO MASSIVO E PARALELO NO ESTUDO DO GENOMA DO EIAV

Atualmente existem poucas sequências completas do genoma de EIAV disponíveis nos bancos de dados mundiais obtidas de amostras de cavalos naturalmente infectados. O estudo do genoma do EIAV teve início com o sequenciamento completo genoma de dois isolados: Wyoming, a primeira sequência do EIAV obtida em 1997 dos EUA (Petropoulos C.J., 1997), e Liaoning, isolada da China em 2007 (Tu et al., 2007). Essas sequências foram obtidas por meio do sequenciamento de Sanger (Sanger F., 1980). Atualmente, o uso de novas

tecnologias de sequenciamento (NGS – Next Generation Sequencing) aumentou o conhecimento do genoma do EIAV a partir de amostras de equídeos de diversos países. Dentre esses destacam-se os isolados: Miyazaki do Japão (Dong et al., 2013); H3, F4, F3 e F2 da Irlanda (Quinlivan et al., 2013); SA e DE da Itália (Cappelli et al., 2017), Cornwall, Devon e Newmarket da Inglaterra (Robinson et al., 2012); TN_0109, UKY98-07_PA_S15, NC_Dagmar e UKYE62_FL dos EUA (Cook et al., 2020); Ecl_Gard_co e Bau_Gard_co da França (Deshiere et al., 2019); EIAV-SERB-1 da Sérvia (Lupolovic et al., 2021). No Brasil foram sequenciadas em 2020 duas amostras de EIAV de cavalos naturalmente infectados da região do Pantanal (MT, Brasil). Essas amostras estão depositadas no GenBank sob a referência MN560970.1 (POCONE - BRA1) e MN560970.1 (POCONE - BRA2). E ainda, estudos recentes de vigilância e epidemiologia sobre surtos de EIAV na França permitiram a identificação de dois casos assintomáticos de EIAV franceses, designados como EIAV-FR-15 e EIAV-FR-16, cujos genomas foram caracterizados por meio um sequenciamento direto de todo o genoma de EIAV sem etapas de clonagem ou amplificação. Além disso, existem várias sequências parciais publicadas do gene gag da França, Brasil, Eslovênia, Bélgica, EUA, Itália, Romênia e Canadá (Caij et al., 2014; Capomaccio et al., 2012; Cappelli et al., 2011; Gaudaire et al., 2018; Kuhar & Malovrh, 2016; Nagarajan & Simard, 2007; Tigre et al., 2017).

A dificuldade no processo de sequenciamento completo se deve, em parte, pelas características evolutivas desses vírus, já que sua taxa de mutação se correlaciona diretamente com os níveis de replicação viral e com a taxa de erro da polimerase do vírus, como explicado anteriormente. A realização do sequenciamento completo de isolados virais por meio de sequenciamento massivo e paralelo sem a necessidade do uso de iniciadores específicos, dada a grande variabilidade genética mesmo entre isolados de regiões geográficas semelhantes, pode garantir maior sucesso na descrição do genoma completo desses isolados, o que permitiria um estudo aprofundado para desenvolvimento de possíveis alvos antivirais e terapias antigênicas, bem como abre a possibilidade para o desenvolvimento de vacinas e métodos moleculares para o diagnóstico da AIE e portanto, com essas possibilidades, controlar a doença evitando o surgimento de surtos endêmicos e perdas ainda maiores na equideocultura.

Novos estudos moleculares e o aumento das informações sobre as características genéticas do EIAV podem contribuir com a construção de árvores filogenéticas mais robustas o que, por sua vez, fortalece os estudos e avanços nos aspectos relacionados ao controle da AIE. Esses estudos também podem ter relevância no desenvolvimento e produção de vacinas e formas de tratamento com alvos moleculares direcionados.

Além disso, deve-se considerar a importância do estudo genômico dos isolados obtidos a partir de muas e burros infectados com o EIAV. Esses animais fazem parte da cadeia de transmissão da AIE tanto quanto os equinos e apresentam uma resposta imune particular na presença do vírus (Cooh et al., 2001), mas não havia até este momento nenhuma sequência completa do EIAV isolado desses animais.

2 - JUSTIFICATIVA

A Anemia Infeciosa Equina é uma das doenças de maior repercussão na indústria equina e a despeito dessa importância, a doença permanece sob controle exclusivo do diagnóstico de animais em trânsito, seguido da remoção, isolamento e eutanásia dos animais soropositivos. Na ausência de um método eficaz de detecção molecular e devido à escassez de análises genômicas, a AIE permanece sem possibilidade de diagnóstico precoce, sem tratamento ou método profilático, o que deveria contribuir para seu controle. De fato, a AIE tem sido diagnosticada no Brasil e em outras partes do mundo por meio de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o vírus. Com é de amplo conhecimento, os testes sorológicos, embora sejam muito eficientes e específicos, em sua maioria esbarram nas questões relativas ao tempo de soroconversão e/ou falha na detecção de anticorpos. Nesse sentido, em alguns casos, quando considerados isoladamente, estes testes podem comprometer o diagnóstico produzindo resultados falso positivos que, no caso da AIE, levariam à eutanasia de uma animal saudável ou poderia manter uma cadeia de transmissão ao não detectar anticorpos e produzir um resultado falso negativo. Este problema pode ser amenizado pela combinação do teste sorológico com um teste molecular, que seja suficientemente robusto, com alta capacidade de detecção de sequências virais mesmo em pequenas quantidades presentes nos animais infectados, conferindo, assim, maior confiabilidade ao diagnóstico da AIE.

Assim, este trabalho atende às demandas de melhorar o conhecimentos sobre a estrutura genômica de isolados brasileiros de EIAV e abrir a possibilidade de uso de um teste molecular com alto poder de detecção, que associado aos testes sorológicos hoje utilizados no diagnóstico da AIE, deve contribuir com o controle da doença no território brasileiro.

3 - OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um ensaio molecular, baseado em qPCR, para detecção da Anemia Infecciosa Equina no Brasil.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o sequenciamento massivo e paralelo de amostras de EIAV isoladas de animais positivos para AIE provenientes de diferentes regiões brasileiras e apresentar uma sequência completa do genoma do EIAV isolado de um asinino para efeito de comparação com isolados provenientes de equinos.
- Validar um qPCR a partir de iniciadores específicos de amostras brasileiras para o diagnóstico da AIE no Brasil.
- Comparar a qPCR com testes sorológicos: IDGA, ELISA e sequenciamento no diagnóstico da AIE utilizando amostras de referência e amostras de campo.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - AMOSTRAS

Amostras de sangue de 12 cavalos e 8 jumentos positivos para AIE previamente diagnosticados e 78 amostras de equinos e jumentos negativos para AIE também previamente diagnosticados foram coletadas em EDTA a fim de se proceder a separação da camada leucocitária (*buffy coat*) para a obtenção do DNA proviral do EIAV.

Os testes sorológicos haviam sido realizados no Laboratório de Retrovirose, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais utilizando protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (UFMG/CEUA 171/2018 e CEUA 206/2017). O teste usado para diagnóstico desses animais foi o IDGA e Elisa para detecção da proteína p90, testes oficiais aprovados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de acordo com as instruções normativas.

A identificação das amostras bem como suas características quanto à espécie e status do diagnóstico destas amostras estão descritas na tabela 1. Nenhum animal usado no estudo apresentava sinais ou sintomas de anemia infecciosa equina no momento da coleta do sangue.

Tabela 1- Descrição das características das amostras usadas no estudo quanto às características de raça, espécie, sexo, data de nascimento ou coleta e diagnóstico para AIE. Alguns animais abandonados e errantes não puderam ter a data de nascimento definida, por isso foram inseridos os dados de data de coleta do material desses animais.

Amostra	Espécie	Sexo	Raça	Data nasc. Estimada	Diagnóstico AIE
4	EQUINO	F	MESTIÇO	01/06/2010	POSITIVO
34	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2016	POSITIVO
47	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2013	POSITIVO
62	EQUINO	M	PURUCA	01/07/2014	POSITIVO
176	EQUINO	F	MARAJOARA	01/07/2011	POSITIVO
184	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2016	POSITIVO
185	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2010	POSITIVO
190	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2010	POSITIVO
220	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2012	POSITIVO
313	EQUINO	M	MARAJOARA	01/07/2015	POSITIVO
319	EQUINO	M	PURUCA	01/07/2014	POSITIVO
328	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2013	POSITIVO
122B	JUMENTO	F	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
7	JUMENTO	F	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
3825	JUMENTO	M	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
1762	JUMENTO	F	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
8529	JUMENTO	M	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
3213	JUMENTO	M	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
7275	JUMENTO	M	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
PIG	JUMENTO	M	MESTIÇO	ADULTOS*	POSITIVO
3	EQUINO	F	MESTIÇO	15/06/2016	NEGATIVO
14	MUAR	F	MUAR	01/07/2008	NEGATIVO
17	EQUINO	F	MESTIÇO	15/08/2017	NEGATIVO
24	EQUINO	F	MESTIÇO	15/11/2017	NEGATIVO
25	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2014	NEGATIVO
26	EQUINO	F	MESTIÇO	15/08/2017	NEGATIVO
34	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2016	NEGATIVO
39	EQUINO	F	MESTIÇO	15/11/2017	NEGATIVO
46	EQUINO	F	MESTIÇO	15/01/2017	NEGATIVO
47	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2013	NEGATIVO
85	EQUINO	F	MESTIÇO	15/06/2017	NEGATIVO
90	EQUINO	F	MARAJOARA	01/07/2013	NEGATIVO
91	EQUINO	F	MARAJOARA	01/07/2007	NEGATIVO
94	EQUINO	F	MARAJOARA	15/06/2017	NEGATIVO
110	EQUINO	F	MARAJOARA	15/04/2017	NEGATIVO
111	MUAR	F	MUAR	01/07/1997	NEGATIVO
112	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2010	NEGATIVO

113	EQUINO	F	MESTIÇO	15/05/2017	NEGATIVO
114	EQUINO	M	MESTIÇO	15/04/2016	NEGATIVO
114	EQUINO	M	MARAJOARA	15/04/2016	NEGATIVO
115	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2012	NEGATIVO
116	EQUINO	M	MARAJOARA	15/04/2017	NEGATIVO
117	EQUINO	F	MARAJOARA	01/07/2012	NEGATIVO
119	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2007	NEGATIVO
120	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2012	NEGATIVO
121	EQUINO	F	MESTIÇO	15/03/2017	NEGATIVO
122	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/1999	NEGATIVO
123	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2008	NEGATIVO
125	EQUINO	M	MESTIÇO	15/05/2017	NEGATIVO
126	MUAR	F	MUAR	01/07/2015	NEGATIVO
127	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2012	NEGATIVO
128	EQUINO	M	CRIOULO	15/12/2009	NEGATIVO
129	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2008	NEGATIVO
130	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2005	NEGATIVO
131	EQUINO	F	MESTIÇO	15/03/2017	NEGATIVO
174	EQUINO	F	MARAJOARA	01/07/2007	NEGATIVO
175	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2016	NEGATIVO
179	EQUINO	M	MESTIÇO	15/06/2017	NEGATIVO
187	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2016	NEGATIVO
196	EQUINO	F	MESTIÇO	15/06/2017	NEGATIVO
200	EQUINO	M	MESTIÇO	15/06/2017	NEGATIVO
203	EQUINO	F	MESTIÇO	15/11/2016	NEGATIVO
204	EQUINO	F	MESTIÇO	15/11/2016	NEGATIVO
215	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2014	NEGATIVO
218	EQUINO	F	MESTIÇO	15/06/2017	NEGATIVO
220	EQUINO	F	MESTIÇO	01/07/2012	NEGATIVO
224	EQUINO	F	MARAJOARA	01/07/2014	NEGATIVO
256	EQUINO	M	MARAJOARA	01/07/2015	NEGATIVO
257	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2013	NEGATIVO
266	MUAR	M	MUAR	01/07/2015	NEGATIVO
268	MUAR	F	MUAR	01/07/2014	NEGATIVO
269	MUAR	M	MUAR	01/07/2001	NEGATIVO
274	EQUINO	M	MARAJOARA	01/07/2014	NEGATIVO
290	EQUINO	M	MANGA LARGA	15/12/2010	NEGATIVO
307	EQUINO	M	PURUCA	01/07/2001	NEGATIVO
313	EQUINO	M	MARAJOARA	01/07/2015	NEGATIVO
319	EQUINO	M	PURUCA	01/07/2014	NEGATIVO
328	EQUINO	M	MESTIÇO	01/07/2013	NEGATIVO

389	EQUINO	M	MESTIÇO	14/01/2018	NEGATIVO
395	EQUINO	M	MESTIÇO	25/12/2017	NEGATIVO
398	EQUINO	M	MARAJOARA	05/01/2018	NEGATIVO
399	EQUINO	M	MESTIÇO	10/01/2018	NEGATIVO
403	EQUINO	M	MESTIÇO	05/01/2018	NEGATIVO
404	EQUINO	F	MARAJOARA	05/01/2018	NEGATIVO
411	EQUINO	F	NÃO INFORMADO	10/01/2018	NEGATIVO
420	EQUINO	F	MESTIÇO	24/02/2018	NEGATIVO
421	EQUINO	M	MESTIÇO	19/02/2018	NEGATIVO
424	EQUINO	M	MESTIÇO	15/03/2018	NEGATIVO
425	EQUINO	F	MESTIÇO	02/03/2018	NEGATIVO
426	EQUINO	F	MESTIÇO	20/05/2018	NEGATIVO
427	EQUINO	F	MESTIÇO	08/03/2018	NEGATIVO
433	EQUINO	F	MESTIÇO	10/02/2018	NEGATIVO
435	MUAR	M	MUAR	06/04/2018	NEGATIVO
436	EQUINO	F	MESTIÇO	15/03/2018	NEGATIVO
437	EQUINO	M	MESTIÇO	15/02/2018	NEGATIVO
438	EQUINO	M	MESTIÇO	04/04/2018	NEGATIVO
439	EQUINO	F	MESTIÇO	09/04/2018	NEGATIVO
440	EQUINO	F	MESTIÇO	03/03/2018	NEGATIVO

* Animais errantes e sem identificação usados neste estudo foram registrados de acordo com a data de coleta do material usado no estudo.

O DNA das células do *buffy coat* foi extraído com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas estão estocadas em tubos eppendorf de 1,5 mL, livres de RNases e DNases, identificadas e congeladas a -20°C. O rendimento das extrações de DNA foi estimado através de avaliação espectrofotométrica no equipamento NanoVue™ (GE Healthcare). Para o uso do DNA extraído no sequenciamento massivo e paralelo o DNA extraído foi quantificado por meio de análise de fluorescência por meio do kit Qubit (Life Technologies, Carlsbad, MA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% concentrado. As concentrações do DNA extraído e a avaliação da sua qualidade por meio da relação 260/280 e corrida em gel de agarose 1,5% concentrado em tampão TAE e corados com Sybr Safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) estão representados na figura 5 e descritos na tabela 2.

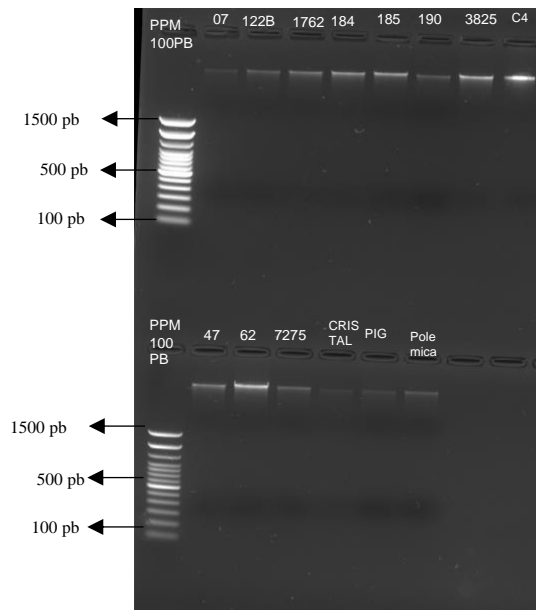


Figura 5 – Gel de agarose para avaliação da qualidade do DNA extraído do buffy coat das amostras usadas. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder - Promega Corporation). O DNA extraído apresenta banda única no tamanho esperado acima de 1500 pares de base.

Tabela 2 – Quantificação das amostras de DNA extraídos do sangue dos equídeos e análise da qualidade do DNA por meio da avaliação da relação 260/280nm, que mede a quantidade de ácido nucléico em relação ao conteúdo de proteínas encontradas. A concentração ideal, produto da divisão entre a concentração de ácido nucléico sobre a concentração de proteína, deve estar em torno no 1,8.

AMOSTRA	QUANTIFICAÇÃO ng/uL	RELAÇÃO 260-280
EQUINOS POSITIVOS		
C4 FAS	55,5	1.7
4	57,5	1.8
34	109	1,7
47	48	1.8
62	48.9	1.8
176	58	1.8
184	32	1.7
185	121.5	1.7
190	111	1.7
220	62.5	1.8
313	25.5	1.5
319	50	1.8
3285	54	1.8
Polemica	26.5	1.8
Cristal	50.4	1.7
Safira	55.6	1.8
ASININOS POSITIVOS		
122B	64	1.7
7	129	1.7
3825	377	1.8
1762	364	1.8
8529	224	1.8
3213	109	1.8
7275	189	1.8
PIG	223	1.8

4.2 - ANÁLISE *IN SÍLICO* DE SEQUÊNCIAS CONSERVADAS DO EIAV PARA O DESENHO DE INICIADORES A SEREM TESTADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TESTE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA AIE

Os DNAs obtidos do sangue total dos animais, contendo, potencialmente, os DNAs provirais, foram submetidos a PCR usando iniciadores específicos desenhados a partir da análise *in silico* das sequências gênicas conservadas de EIAV disponíveis em bancos de dados. Os iniciadores usados nesta fase do estudo foram desenhados usando o programa Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Foram alinhadas e analisadas as regiões mais conservadas (acima de 90% de similaridade) observadas entre os isolados Wyoming (número de acesso GenBank AF327877) (Tu et al., 2007), Irlanda (número de acesso GenBank número JX480631) (Quilivan et al., 2013), Miyazaki-2011A (número de acesso GenBank JX003263) (Dong et al., 2013) e Wyoming (número de acesso GenBank AF033820) (Petropoulos et al. 1997). As sequências foram alinhadas usando o programa Aliview. Os primeiros iniciadores propostos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Iniciadores usados na primeira fase do estudo para tentativa do desenvolvimento de iniciadores específicos do ensaio de qPCR para o diagnóstico molecular da AIE.

INICIADOR	SEQUÊNCIA 5' 3'	REGIÃO	TAMANHO DO AMPLICOM (PARES DE BASE)
S2.1_F	CCCTATCACCCAACAAACAGA	S2	143
S2.1_R	TGTCTCTTGCCTCTGCCATTT		
LRT F	TCAGTCCTTGTTCCAACCTTGTTT	LTR	170
LTR R	TCCTACGATCAGCCAGGTTC		
AF327877_F	TCAACCCCTATCACCCAACA	GAG	373
AF327877_R	GTGTCTCTTGCCTCTGCCAT		
S2.2 F	TCCCTTCTTCTGCCATCCTT	S2	302
S2.2 R	GTTGGGTGGTAGGGGTTGAT		
S2.3 F	GTAACATGGTCAGCATCGCC	S2	286
S2.3 R	GAGTCTCTTCCCTCAGCCA		
ITA F	GACATGGAGCAAAGCGCTCA	POL	296
ITA R	CTGCCAGGCACCACATCTA		
ITA NEST F	TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG	POL	282
ITA NEST R	TTTCTGTTTCCAGCCCATTC		
BETA ACTINA - CONTROLE ENDÓGENO F	GAGCAAGAGGGGGCATCCTGA	β-Actina	100
BETA ACTINA - CONTROLE ENDÓGENO R	GGTCATCTTCTCGCGGTTGG		

Embora várias sequências tenham sido analisadas com o objetivo de se identificar regiões genômicas conservadas do EIAV não obtivemos sucesso nas tentativas de amplificação usando os iniciadores propostos (Tabela 3). Foram testados diversos kits comerciais como Taq Platinum™ Hot Start (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Taq Platinum™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e Gotaq® DNA Polimerase (Promega) em várias condições de ciclagem, concentrações diferentes de sais (MgCl₂), temperaturas de anelamento diferentes, tempos de extensão mais ou menos prolongados. As condições de reação e os kits utilizados estão descritos na tabela 4. A amplificação por PCR foi analisada por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%. Como controle endógeno da reação foram usados os iniciadores do gene da Beta Actina de *Equus caballus*, cuja sequência também está descrita na tabela 3.

Tabela 4 – Condições e variáveis das reações de PCR convencional testadas na tentativa de amplificar regiões específicas para serem usadas no diagnóstico molecular da AIE

4.3 - SEQUENCIAMENTO MASSIVO E PARALELO DE 15 AMOSTRAS DE EIAV ISOLADAS DE ANIMAIS POSITIVOS PARA AIE

Como objetivo de melhorar nosso conhecimento a respeito dos isolados brasileiros do EIAV foi proposta a realização do sequenciamento massivo e paralelo realizado a partir do cDNA extraído de 10 cavalos e 5 jumentos previamente diagnosticadas com AIE por meio de testes sorológicos (IDGA e ELISA).

As bibliotecas de DNA dessas amostras foram preparadas usando o xGen® Library Amplification Primer Mix, IDT (Integrated DNA Technologies). 3 µg de cada amostra foram fragmentadas e processadas para reparo final e adição de adaptadores. A biblioteca com tags de adaptadores dos fragmentos foram purificados usando esferas Agencourt AMPure XP (BeckmanCoulter Inc., Brea, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, cada biblioteca marcada com adaptador foi amplificada por PCR com a enzima KAPA HiFi DNA Polymerase (Hot Start and Ready Mix) (Roche Sequencing Store, Inc.) e o DNA amplificado foi então enriquecido com o kit xGen™ Lockdown™ Probe Pool (IDT (Integrated DNA Technologies) usando nesta etapa as sondas personalizadas desenhadas com base na sequência específica (números de acesso Genbank: AF170372). As bibliotecas capturadas foram então amplificadas por meio de PCR (16 ciclos) com primers de pré-captura para ligar os adaptadores indexados às suas respectivas sequências. Após a purificação com esferas AMPure XP, uma segunda rodada de captura foi realizada seguida de amplificação por PCR (16 ciclos) com primers de pós-captura e indexação direcionados a adaptadores 5' e 3-ligados e permitindo codificar em barras as leituras correspondentes às diferentes amostras. A qualidade e a quantidade de bibliotecas amplificadas foram testadas por meio de quantificação com o Kit de Ensaio Qubit dsDNA HS (Life Technologies). As concentrações de todas as etapas de preparo das bibliotecas estão descritas na tabela 5. Biblioteca indexada tinham um tamanho médio de 350 pb. As bibliotecas indexadas foram agrupadas em concentrações equimolares (12 picoMolar) e prosseguiu-se o sequenciamento massivo e paralelo na plataforma MiSeq usando o MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina).

As sondas e suas respectivas referências estão descritas no anexo 2.

Todos os kits utilizados estão descritos na tabela 6.

Tabela 5 – Quantificação das dosagens do DNA extraído das amostras usadas no sequenciamento massivo e paralelo das amostras por emissão de fluorescência no sistema Qubit (Life Technologies, Carlsbab, MA, USA)TM usando para isso o Kit dsDNA BR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Amostra	Quantificação Qubit ng/uL	Quantificação Dia 1 ng/uL	Quantificação da Biblioteca produzida ng/uL
Equinos			
C4	14,8	66,6	1,95
4	59	29,8	0,7
47	39,7	37,4	9,75
Polêmica	19,7	36	9,75
62	61,8	43,2	9,75
184	40,6	47,8	22,5
185	55	53,4	22,5
190	53,6	47	22,5
Cristal	13,3	42	22,5
Safira	9	40	22,5
Asininos			
122B	85,4	24,8	2,36
1762	56	33,4	9,75
3825	57	31,4	9,75
PIG	22,5	109	2,5
7275	57,5	136	22,5

Tabela 6 – Kits usados no NGS das amostras brasileiras do EIAV com suas respectivas referências

ITEM	EMPRESA
xGen TM Lockdown TM Probe Pool, 16 rxn	IDT (Integrated DNA Technologies)
xGen [®] Hybridization and Wash Kit, 16 rxn	IDT (Integrated DNA Technologies)
xGen [®] Library Amplification Primer Mix, 16 rxn	IDT (Integrated DNA Technologies)
xGen [®] Universal BlockersTS Mix, 16 rxn	IDT (Integrated DNA Technologies)
Kit para quantificação Qubit	Qubit (Life Technologies, Carlsbab, MA, USA)
Agentcourt AMPure XP (Bids)	BECKMAN COULTER INC. (Brea, CA, USA)
Real time kit quantificação final	THERMO FISHER
Kit de sequenciamento Miseq Reagent Kit V2 Nano 2x150pb	ILLUMINA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Adaptadores indexados	IDT (Integrated DNA Technologies)
KAPA HiFi DNA Polymerase (Hot Start and Ready Mix formulation)	Roche Sequencing Store, Inc.

4.3.1 - AVALIAÇÃO DOS AMPLICONS OBTIDOS NA PRIMEIRA FASE DO NGS PARA AVALIAÇÃO DA SUA QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO USANDO QPCR COM METODOLOGIA DE CURVA PADRÃO

O sequenciamento massivo e paralelo realizado por meio de enriquecimento com sondas requer etapas de avaliação do processo, quando se quantifica e analisa o produto amplificado na

primeira etapa do processo. O resultado desta análise está demonstrado nas figuras 6 e 7 e são passos da metodologia usada no trabalho.

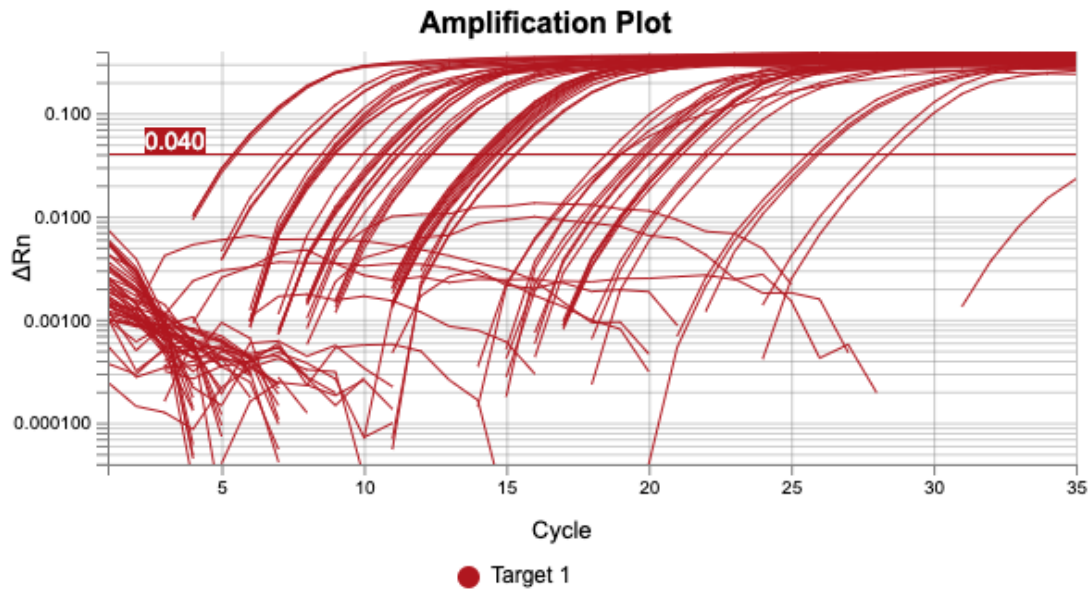


Figura 6 – Análise da curva padrão usando os valores CT (Threshold) das amplificações das amostras usadas na primeira fase do NGS para avaliação e prosseguimento das demais etapas.

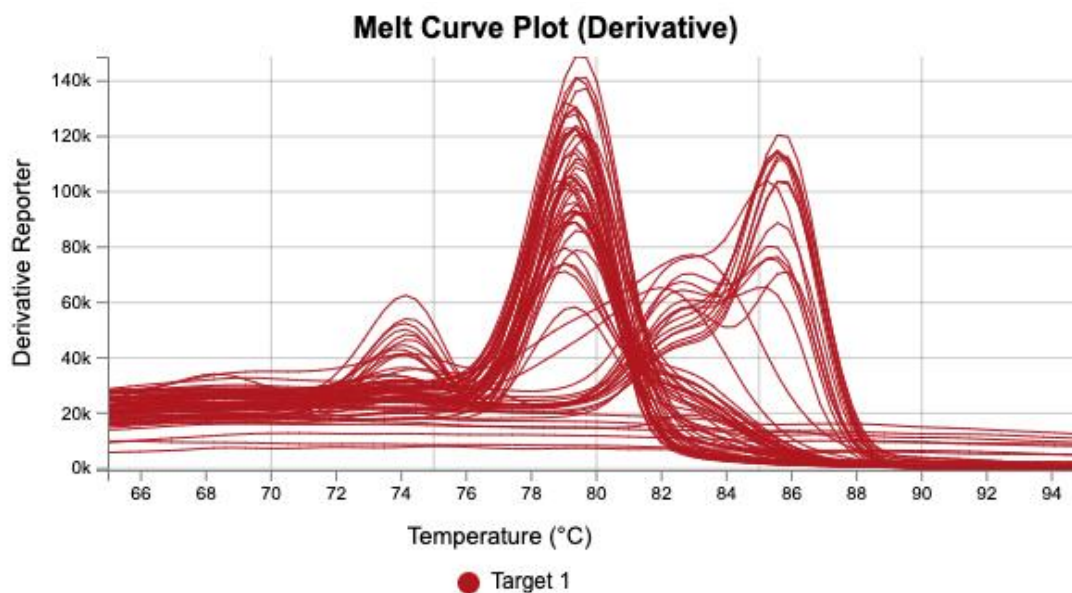


Figura 7 – Análise da curva de melting (TM) das amplificações das amostras usadas na primeira fase do NGS para avaliação e prosseguimento das demais etapas.

4.3.2 - METODOLOGIA DE ANÁLISE DO NGS DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE EIAV

As análises de bioinformática foram realizadas em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF), com as colaborações do Professor Aristóteles Góes Neto e da Doutora Paula Luize C. Fonseca.

Bibliotecas produzidas no sequenciamento foram filtradas e trimadas com o programa BBduk. Foi realizado o mapeamento contra o genoma de referência (hospedeiro) usando o Bowtie2 (Obs. Nessa etapa, foram usados três genomas do gênero *Equus* que estavam disponíveis no NCBI: GCF_000696695.1, GCF_001305755.1, GCF_002863925.1.) para eliminar tudo que se referisse ao genoma dos equídeos. Os dados não alinhados ao genoma hospedeiro foram usados para a montagem de contigs usando o programa SPAdes. Para todos os contigs montados foi verificado a similaridade com o banco de dados “nr” (todos os hits disponíveis no NCBI) e de proteínas virais também do NCBI usando o programa Diamond para processamento dos dados e-value de $1e-10$. (*Double Indexing Alignment of NGS Data – Disponível em <https://drostlab.com/software/> - Buchfink et al., 2014*).

4.4 - DESENVOLVIMENTO DE qPCR COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA AIE

Para as qPCRs realizadas nesta etapa usamos os iniciadores desenhados a partir da sequência da amostra 122B. A sequência obtida no NGS desta amostra mostrou uma região de 450pb muito conservada dentro do gene env quando analisadas contra as amostras de referência usando o alinhamento das mesmas usando programa Aliview (Larsson, A. 2014., disponível para download - <https://ormbunkar.se/aliview/>).

A sequência completa está descrita a seguir.

```
>122B_MN560970.1_env
tactaacctcttcgctaagatcctcagggccctctggaaagtaccagtggtgcagggctctccggcagtcgttacctgaagaaaaattccatcacaaacatgcat
cgcgagaagacacctggaccaggcccaacacacatacacctagcagggcgtgaccggtggatcaggggacaataactacaagcagaagtactccaggaacg
actggaatggagaatcagaggagtacaacagggcgccaaagagctgggtgaagtcaatcgaggcattggagagagctatattccgagaagaccaaggggga
gattctcagcctggggcgctatcaacgagcacaagaacggctctgggggaacaatctcaccaagggtccttagacctggagattcgaagcgaaggaggaa
acattatgactgttcattaagccaagaa
```

A partir desta sequência foram usados os programas para desenho de iniciadores Primer3 Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e Primer Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Foram selecionados dois iniciadores mais promissores por apresentarem conteúdo CG, temperatura de melting favoráveis bem como por não apresentarem possibilidade de formação de estruturas secundárias. O tamanho do amplicon produzido também era favorável ao desenvolvimento de um bom ensaio de qPCR, seja por Sybr Green™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ou Ensaio Taqman™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

A sequência dos iniciadores e o tamanho dos amplicons gerados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Iniciadores desenhados para realização da qPCR como proposta para o teste diagnóstico de detecção da AIE.

INICIADOR	SEQUÊNCIA 5` 3`	TAMANHO DO AMPLICOM (PARES DE BASE)
122.1F	GGAACGACTGGAATGGAGAA	154
122.1R	AAGGACCCTTGGTGAGGATT	
122.2F	CAGGCCCAACACAACATACA	150
122.2R	TCTCTCCAAATGCCTCGATT	

As qPCRs foram realizadas com o kit PowerTrack SYBR green Master Mix TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acordo com as recomendações e protocolo propostos pelo fabricante. As reações foram feitas em triplicatas para cada amostra. Foi usado como controle interno o gene da BetaActina e em todas as reações foram feitos controles negativos, em que foi colocado água livre de nucleases substituindo o DNA na reação. A figura 8 é um exemplo do mapa de placa usado para organização das amostras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	116	116	116	117	117	117	119	119	119	110	110	110
B	111	111	111	113	113	113	266	266	266	129	129	129
C	130	130	130	131	131	131	200	200	200	188	188	188
D	319	319	319	4	4	4	3213	3213	3213	7275	7275	7275
E	313	313	313	176	176	176	184	184	184	220	220	220
F	47	47	47	34	34	34	328	328	328	62	62	62
G	7275	7275	7275	PIG	PIG	PIG	3825	3825	3825	BR	BR	BR
H	Controle Endógeno - bactina	Controle Endógeno - bactina	Controle Endógeno - bactina	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda

	CONTROLE NEGATIVO
	AMOSTRAS POSITIVAS
	AMOSTRAS NEGATIVAS
	CONTROLE ENDÓGENO

Figura 8 – Exemplo de mapa de placa usado nas qPCRs com o iniciador 122.2. Na legenda estão indicadas as cores referentes às amostras positivas, negativas e controles negativos da reação.

Inicialmente, foram testados os dois iniciadores propostos e, a partir dos resultados desses testes, seguimos com o iniciador 122.2, que apresentou resultados mais consistentes, reprodutíveis e cujo análise da curva ROC mostrou resultados de especificidade e sensibilidade mais acurados, tanto na comparação com os resultados dos testes sorológicos previamente realizados e ainda mais acurados quando comparados aos resultados de amostras que tiveram seu diagnóstico baseados em sequenciamento de regiões gênicas específicas, o que foi previamente realizado no Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da UFMG, além dos resultados do NGS das amostras analisadas neste estudo, nas quais o material genético do EIAV foi identificado.

Para avaliarmos a especificidade da qPCR, 5 amostras positivas e 12 amostras negativas obtidas em uma qPCR foram purificadas por meio do kit PureLink™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e usadas no

sequenciamento de nucleotídeos com o mesmo par de iniciadores usados na qPCR. A sequência de nucleotídeos foi determinada de acordo com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) – em um sequenciador capilar automático “ABI 3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems, CA, EUA), utilizando o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as condições indicadas pelo fabricante. As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas, montadas e editadas no programa MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura et al., v5.2.2). Os contigs foram analisados por meio do programa CAP3 (CAP3 Sequence Assembly Program – PRABI-Doua., disponível em <https://doua.prabi.fr/software/cap3>). As sequências foram comparadas com sequências mundiais disponíveis no GenBank.

As análises estatísticas para avaliação dos resultados obtidos na qPCR foram realizadas no programa *GraphPad Prism* 8.0 (San Diego, CA, USA). Os testes de Shapiro-Wilk foram realizados para o teste de normalidade e após a definição da distribuição dos dados, o tratamento estatístico foi dado. Como a distribuição dos dados foi paramétrica, utilizou-se o teste T não pareado para as comparações entre grupos baseados no padrão ouro para diagnóstico do vírus, o teste de IDGA, considerando que valores de $p < 0,05$ são estatisticamente significativos. As análises de curva ROC e índices de desempenho como sensibilidade, especificidade, área sob a curva (AUC) e razão de verossimilhança (LR) foram calculados utilizando o programa *GraphPad Prism* 8.0 (San Diego, CA, USA). Valores de área sob a curva acima de 0,7 indicam resultados com potencial moderado a elevado em esclarecer resultados verdadeiramente positivos.

4.5 – SEQUENCIAMENTO SANGER PARA COMPLETAR OS FRAGMENTOS GERADOS PELO NGS DA AMOSTRA 122B

A partir do resultado do NGS das amostras e em específico o resultado do sequenciamento da amostra 122B de um jumento foi possível desenhar iniciadores específicos para completar o sequenciamento do genoma deste isolado. Assim, para cobrir as regiões não sequenciadas pelo NGS e obter a sequência genômica completa, foram desenhados iniciadores a partir das sequências de consenso parcial BRA1 e BRA2 e seus produtos sequenciados. Foram também utilizados os fragmentos dos genes do EIAV detectados no NGS para o desenho desses iniciadores. Foram desenhados 19 pares de iniciadores usando os programas Prime3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e Primer Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Tabela 8). Foram realizadas diversas

tentativas de amplificação destes fragmentos e o melhor resultado foi obtido com a enzima Taq Platinum™ HighFidelity (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O DNA amplificado das regiões correspondentes a cada iniciador foi analisado em gel de agarose a 1,5% concentrado. Os amplicons produzidos e caracterizados no gel de agarose em uma única banda no tamanho esperado foram usados no sequenciamento com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) e os amplicons que produziram mais de uma banda no gel de agarose foram purificados a partir da banda cortada do gel de agarose e por meio do Kit PureLink™ Genomic DNA Mini kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências de nucleotídeos foram determinadas de acordo com o método de sequenciamento didesoxi em um sequenciador capilar automático “ABI 3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems, CA, EUA), utilizando o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as condições indicadas pelo fabricante. As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas, montadas e editadas no MEGA versão 7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020), os contigs foram analisados por meio do programa CAP3 (CAP3 Sequence Assembly Program – PRABI-Doua., disponível em <https://doua.prabi.fr/software/cap3>). As sequências foram comparadas com sequências mundiais obtidas no GenBank. A montagem do genoma teve uma cobertura de 95% dos amplicons produzidos. Cerca de 15% das partes dos genes foram montadas por predição a partir das amostras depositadas no GenBank.

Tabela 8 – Iniciadores desenhados a partir da sequência completa do genoma da amostra brasileira Poconé – BRA1 (número de acesso no GenBank – MN560970.1) (Malossi et al., 2021) e tamanho de amplicons obtidos e usados no sequenciamento completo da amostra 122B.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	TAMANHO DO AMPLICON (PARES DE BASE)
TAT+UTR_F	TCCCTAGGACAGCAGAGGAG	700
TAT+UTR_R	GGTTGTCTCCCCGTAGAAT	
GAG1_F	TAATTGGGCGCTAAGTTTGG	750
GAG1_R	TTTTGCTTTCAGCAGTTGGA	
GAG2_F	CCCAGAGGATACACCCACTG	800
GAG2_R	GTGGGTTTGGTAATGGATGC	
GAG3_F	TGGTCCAATGAAGGGAGGTA	1000
GAG3_R	CAGGGAAAGTTTGCTTTTGG	
POL2_F	AGACGAAAGTCCCCAAGAT	700
POL2_R	ACATTCCCTCCAACCCCTAC	
POL3_F	AAACATTCTCCACCCCTGTG	800
POL3_R	CCCTGACATGCCCTCTTTTA	
POL4_F	ATTCCTCAATGGCCCCTTAC	250
POL4_R	CCCTCTGGATGTGGTAATC	
POL5_F	CAGCATTACTGTTCCGCTCT	300
POL5_R	TGTGCCTTAGAGCCATTACTCC	
POL6_F	GGGTTTTGAGACACCAGATGA	250
POL6_R	CCCCTGAACCTATCCATGTT	
POL7_F	GTGACTTGGACCGAAGAAGC	500
POL7_R	ACCACCCCTTATTGCCTTC	
POL10_F	TTGGATGGGTCCTGTTAAA	900
POL10_R	GCAAACCTTTTGTCCCTCAA	
POL11_F	AAGGGGAGAAGAAGGCTTTG	900
POL11_R	AGCCTGCCAGTGATTAGGTG	
POL13_F	GACATTAGAAGCGGCTTTGC	650
POL13_R	GTGGGTCTTTCCAGTCAGA	
S2_F	GGGGTAACATGGTCAGCATC	800
S2_R	TCTCTTCTCCGCCATTGT	

4.6 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS FRAGMENTES GERADOS PELO NGS DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE EIAV E DA COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE EIAV E A SEQUÊNCIA COMPLETA DA AMOSTRA 122B

Cada sequência obtida pelo NGS foi analisada e foi possível fazer uma análise filogenética com os fragmentos dos genes identificados. As sequências de nucleotídeos (descritas na tabela 9) do

EIAV obtidas foram analisadas em comparação com 12 sequências dos mesmos genes de EIAV depositadas no GenBank, cujos número de acesso neste banco de dados são: Liaoning (número de acesso GenBank AF327877) (Tu et al., 2007); Irlanda (número de acesso GenBank número JX480631) (Quilivan et al., 2013); Miyazaki-2011^a (número de acesso GenBank JX003263) (Dong et al., 2013); Wyoming (número de acesso GenBank AF033820) (Petropoulos et al. 1997); Poconé BRA1 (número de acesso GenBank MN560970.1) e Poconé BRA2 (número de acesso GenBank MN560971.1) (Malossi et al., 2021); França (número de acesso GenBank KT764951.1) (Dados não publicados – Submissão direta ao GenBank); ITA DE (número de acesso GenBank KM247554.1) e ITA SA (número de acesso GenBank KM247555) (Dados não publicados – Submissão direta ao GenBank); UK (número de acesso GenBank MH580897.1) (Dados não publicados – Submissão direta ao GenBank); CORNWALL (número de acesso GenBank MH580898.1) (Dados não publicados – Submissão direta ao GenBank). As sequências foram alinhadas no programa MEGA versão 7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020). A similaridade de nucleotídeos estimada entre as sequências foi calculada pelo modelo Maximum Composite Likelihood com gamadistribuição (parâmetro de forma = 5). As árvores filogenéticas foram reconstruídas usando o método de Máxima Verossimilhança, modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura-Nei, considerando distribuição gama (5 categorias), e sítios invariáveis, implementado na versão MEGA versão 7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020). Um total de 1.000 réplicas de bootstrap foram executadas. Os mesmos parâmetros foram usados na análise filogenética da sequência completa do Isolado 122B (GenBank – ON615427) contra as mesmas amostras de referência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1- RESULTADOS OBTIDOS NA TENTATIVA DE AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ESPECÍFICAS DO GENOMA PARA OS QUAIS FORAM DESENHADOS INICIADORES A PARTIR DA ANÁLISE IN SÍLICO DAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DE ISOLADOS DO EIAV

As PCRs realizadas nesta etapa do trabalho seguiam parâmetros diversos e foram usados também diferentes kits comerciais como descrito na tabela 5. Os resultados obtidos com a PCR convencional foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE e corados com Sybr Safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e estão representados na figura 9.

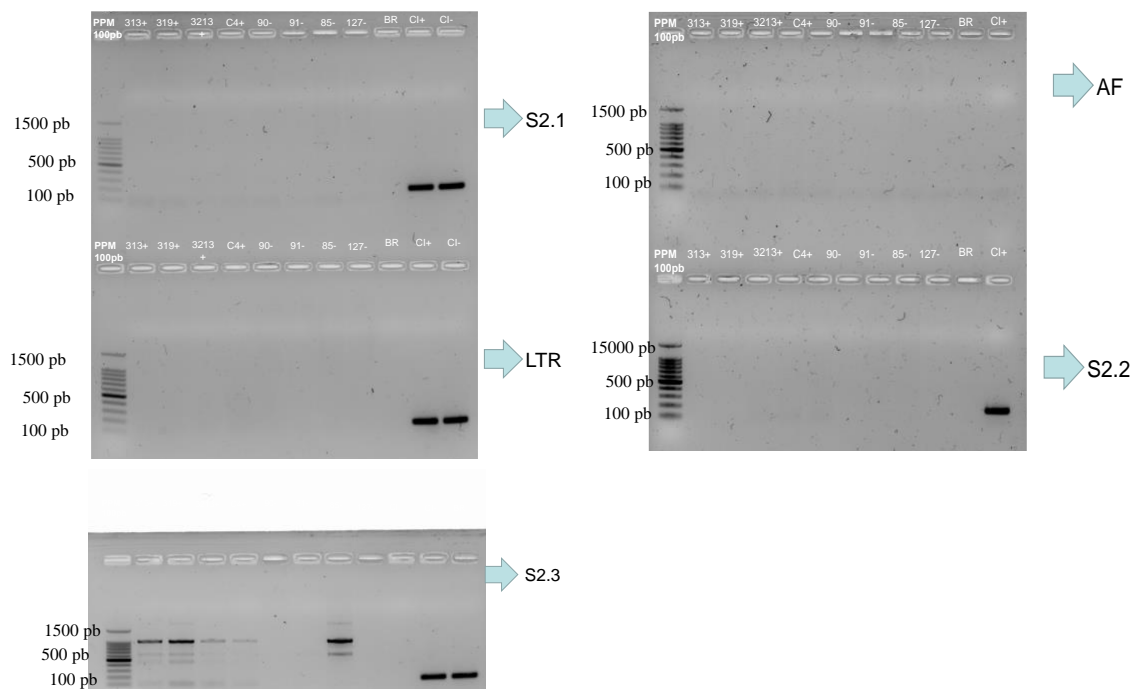


Figura 9 – Géis de agarose representativos dos resultados obtidos na tentativa de amplificar regiões específicas e determinadas do genoma do EIAV desenhadas a partir da análise das sequências depositadas em bancos de dados. As setas azuis ao lado dos géis representam o nome dos iniciadores, cujas regiões gênicas recebem o mesmo nome dos iniciadores. Foi usado o padrão de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder – Promega Corporation).

As canaletas destacadas com CI+ representam os controles endógenos da reação obtidos pela amplificação do gene da Beta Actina.

Nas reações de PCR, realizadas nesta etapa do trabalho, foram usados os iniciadores propostos que foram desenhados com base nas sequências disponíveis no GenBank até novembro de 2019. Até este momento, pouquíssimas informações sobre amostras brasileiras do vírus estavam disponíveis. Mais uma vez, a clonalidade regional das amostras de EIAV e suas particularidades poderiam explicar o insucesso dos resultados das reações.

Embora as reações tenham sido realizadas sob diversas condições, somente o controle endógeno das reações produziam amplicons detectáveis no gel de agarose (Figura 15). De fato, não houve sucesso na amplificação de sequências virais dos isolados brasileiros presentes nos animais infectados. Como os controles endógenos funcionaram, realmente não estávamos conseguindo amplificar os fragmentos esperados correspondentes às sequências do EIAV. A alternativa a essa proposta seria realmente conhecer melhor as características genômicas dos isolados brasileiros e para tanto propusemos a realização do sequenciamento massivo e paralelo do DNA proviral de isolados obtidos a partir das amostras de sangue de cavalos e jumentos de diversas regiões do Brasil.

5.2 – RESULTADOS OBTIDOS PELO SEQUENCIAMENTO MASSIVO E PARALELO DAS AMOSTRAS DE ISOLADOS BRASILEIROS DO EIAV

Os resultados do sequenciamento massivo e paralelo obtidos após as análises de bioinformática mostraram somente fragmentos dos genes do EIAV para algumas amostras de cavalos e jumentos incluídos no estudo. Somente nas amostras 122B, 62, 1762, 3825, PIG, Polemica e C4 foi possível observar as regiões de similaridade quando comparadas às sequências disponíveis nos bancos de dados. Os resultados compilados estão descritos na tabela 9, na qual estão apresentados os dados referentes ao nome (ID) e à espécie dos animais estudados. O qseqid refere-se ao nome dado à sequência obtida no NGS, o sseqid refere-se à sequência de comparação usada. Estão descritos ainda o percentual de identidade (pident), o tamanho da sequência obtida (length) o e-value da relação entre as sequências analisadas.

Tabela 9 – Resultado compilado após análise de bioinformática das sequências obtidas com o sequenciamento massivo e paralelo dos isolados brasileiros de EIAV.

ID	Espécie	qseqid	sseqid	pident	length	evalue
62	Equino	NODE_276_length_270_cov_0.766839	MN560970.1_pol	43.1	65	5.1e-12
122B	Asinino	NODE_29_length_841_cov_1843.201571	MN560970.1_rev	64.4	135	1.8e-47
122B	Asinino	NODE_29_length_841_cov_1843.201571	MN560970.1_env	52.7	450	1.4e-36
122B	Asinino	NODE_1007_length_274_cov_0.751269	MN560970.1_pol	37.7	61	8.0e-05
122B	Asinino	NODE_4329_length_236_cov_0.930818	MN560970.1_env	60.9	23	5.3e-05
122B	Asinino	NODE_4508_length_235_cov_0.936709	MN560970.1_rev	81.2	16	2.6e-04
122B	Asinino	NODE_4508_length_235_cov_0.936709	MN560970.1_env	66.7	15	7.6e-04
122B	Asinino	NODE_5352_length_151_cov_10.697368	MN560970.1_rev	56.4	39	2.0e-10
122B	Asinino	NODE_5352_length_151_cov_10.697368	MN560970.1_env	55.3	38	1.4e-06
1762	Asinino	NODE_551_length_286_cov_1.411483	MN560970.1_S2	47.4	38	5.4e-04
1762	Asinino	NODE_999_length_275_cov_0.747475	MN560970.1_pol	51.7	60	1.2e-13
3825	Asinino	NODE_588_length_279_cov_3.009901	MN560970.1_S2	47.4	38	5.3e-04
3825	Asinino	NODE_5121_length_229_cov_0.973684	MN560970.1_tat	43.3	30	5.1e-05
PIG	Asinino	NODE_28_length_494_cov_1.786571	MN560970.1_S2	47.4	38	9.4e-04
Polemica	Equino	NODE_437_length_289_cov_1.396226	MN560970.1_pol	31.8	66	9.3e-04
C4	Asinino	NODE_84_length_455_cov_4.468254	MN560970.1_tat	93.8	32	2.4e-14
C4	Asinino	NODE_84_length_455_cov_4.468254	MN560970.1_gag	92.0	25	2.1e-10
C4	Asinino	NODE_4152_length_252_cov_0.845714	MN560970.1_gag	44.0	25	6.3e-04
C4	Asinino	NODE_6022_length_240_cov_0.907975	MN560970.1_gag	39.6	53	9.5e-10
C4	Asinino	NODE_6408_length_238_cov_0.919255	MN560970.1_env	27.8	36	7.7e-04

Devido aos diversos empecilhos e dificuldades no diagnóstico da AIE e a iminência de surtos epidêmicos no território brasileiro, nosso objetivo em realizar o sequenciamento massivo e paralelo em isolados de EIAV provenientes de cavalos e jumentos distribuídos no território nacional era senão aumentar nosso conhecimento sobre essas amostras para contribuir com os estudos de potenciais formas de controle, tratamento ou prevenção da AIE em nosso país. Para tanto, usamos sondas de captura personalizadas para enriquecer sequências provirais de EIAV de DNA genômico equino e de asininos. Sequenciamos o material genético e o DNA proviral do EIAV que estava integrado ao genoma desses 15 animais (10 cavalos e 5 jumentos). O sequenciamento viral genômico foi usado neste estudo para analisar variantes virais, quasispecies e alterações de proteínas preditas das amostras isoladas.

Esta metodologia não requer o uso de primers específicos e, portanto, poderia ser estendido a todos os isolados de EIAV independentemente da presença de sequências conservadas conhecidas. Além disso, esperávamos também que o enriquecimento das sequências com as sondas de captura permitiria a detecção de baixa quantidade de vírus e poderia então ser aplicado em animais assintomáticos. As bibliotecas construídas tiveram uma cobertura de 100% e uma alta profundidade de leitura. Mas as sequências que geraram regiões de similaridade com os genes do EIAV (quando comparadas às sequências depositadas em bancos e dados e disponíveis) estavam fragmentadas. O processo de sequenciamento a partir do DNA proviral não foi uma estratégia adequada, uma vez que as dificuldades relativas ao processo de sequenciamento completo do genoma assim realizado deve ser considerado e pode ser explicado quando se leva em consideração as características gerais dos Lentivírus. De fato, a taxa de variação genética entre os Lentivírus está correlacionada diretamente com os níveis de replicação viral e, conjuntamente, com a taxa de erro da polimerase do vírus. A transcriptase reversa (RT) do EIAV é tão propensa a erros como outras RT, pois pares errados de purina-pirimidina podem ser sintetizados pela enzima mais facilmente do que purina-purina. Este fato eleva a taxa de erro, e prevê-se que cada ciclo de transcrição reversa resulte na introdução de pelo menos uma mutação no genoma viral, produzindo aumentos significativos na diversidade genética (Leroux; Cadoré; Montelaro, 2004). A organização genômica dos retrovírus, apresentando duas cópias de RNA viral, também permite uma recombinação genética, uma vez que variantes distintas podem ser empacotadas juntas, originadas de mutações pontuais ou coinfeção celular (Simon-Lorriere; Holmes, 2011). Os genes gag e pol são, no geral, os mais conservados do genoma, enquanto env e a ORF codificante para rev são as mais variáveis

(Cook; Leroux; Issel, 2013). As populações resultantes de vírus geneticamente relacionados competindo dentro de um ambiente altamente mutagênico foram denominadas “quasispecies”. Estes fatos foram bem caracterizados neste estudo.

Apesar da grande dificuldade encontrada, conseguimos sequenciar e descrever uma região do gene env da amostra 122B que apresentou alta similaridade com a mesma região gênica das demais amostras de EIAV disponíveis nos bancos de dados. Embora o gene env seja fortemente divergente dentro dos isolados de EIAV e mostre poucas semelhanças com as sequências de referência usadas, conseguimos identificar uma região com alta similaridade, a qual usamos para desenhar os iniciadores da qPCR proposta no desenvolvimento do diagnóstico molecular da AIE.

Em outra amostra (C4) foi possível sequenciar e identificar as regiões LTR do genoma viral. Seria esperado que em outras amostras também fossem encontradas sequências similares relativas à essa região, já que as LTRs tendem a permanecer altamente conservadas em relação ao isolado infectante, tanto em relação ao tempo pós infecção quanto sua permanência nos compartimentos dos tecidos (Leroux; Issel; Montelaro, 1997; Maury et al., 2005; Reis et al., 2003). Assim, foi possível se identificar, na amostra C4, as seguintes sequências, nas quais podem se identificar regiões repetitivas e regulatórias:

>C4_EIAV_EquineBrazil_tatgag

```
tacgagatacgcaggtgactggaggtcagacgtgtgctcttccgaktbctctstctcaactgttttaagatcctacagttggcgcccga
acagggacctgagaagggcgagaccctgctgctgaacctggctgacgtaggatccctaggacagcagaggagaactgcagaa
gttcttgagggtgttctggcmagakcryasgaasayrggtaagatgggagaccattgactggagcaaagcgctcaggaagcta
gagaaggtgacggttccgggtctcaaaaattgag
```

>C4_EIAV_EquineBrazil_LTR

```
tcataaccatataaacctcgaagctagctcatgttgctaggcaactaaactgtaataacctttagtctctcattatggttctgttttacact
atataagtgctgtgttctgtaacaagacactcagattctcgggtctgagtccttctctgctggacctaacaagccttggataataataat
tcaactcatcttttacttaataatctgtaaaagattgcaatagaagactaaaatagcagactaaataaagcttggagaattagctctt
cattacatggcatatattcacaccatttccattccaaatagcat
```

Foi possível ainda identificar fragmentos do gene rev na amostra 122B, este fragmento coincide em parte com região do gen env descrita anteriormente, que por sua vez está contido na região codificadora do gene rev. Esse gene se desenvolve em duas subpopulações distintas, que

exibem diferentes fenótipos em relação à virulência. Eles, então, circulam em dominância com cada estado de doença e apresentam, portanto, sequências gênicas distintas em cada um desses grupos (Baccam et al., 2003).

5.3 – RESULTADO DA qPCR DESENVOLVIDA A PARTIR DA SEQUÊNCIA OBTIDA NO NGS DA AMOSTRA 122B

Os resultados gerados nas reações de qPCR usando o iniciador 122.2 estão apresentados nas figuras 10 e 11, nas quais se observam as curvas de melting e os CTs dos amplicons gerados quando foram testadas amostras de animais positivos e negativos para AIE, de acordo com os testes sorológicos e sequenciamento de regiões específicas previamente realizados, além dos resultados obtidos pelo NGS das amostras deste estudo. Como foram realizadas várias qPCRs com o iniciador 122.2, com diferentes concentrações desse iniciador e reagentes, foi criada uma tabela com os resultados compilados (Tabela 10) a partir da qual foi possível se caracterizar os pontos da curva no qual o CT corresponde à amplificação do produto de 180 pb bem como a curva de melting com temperatura entre 83 e 85°C, que corresponde à amplificação do produto esperado.

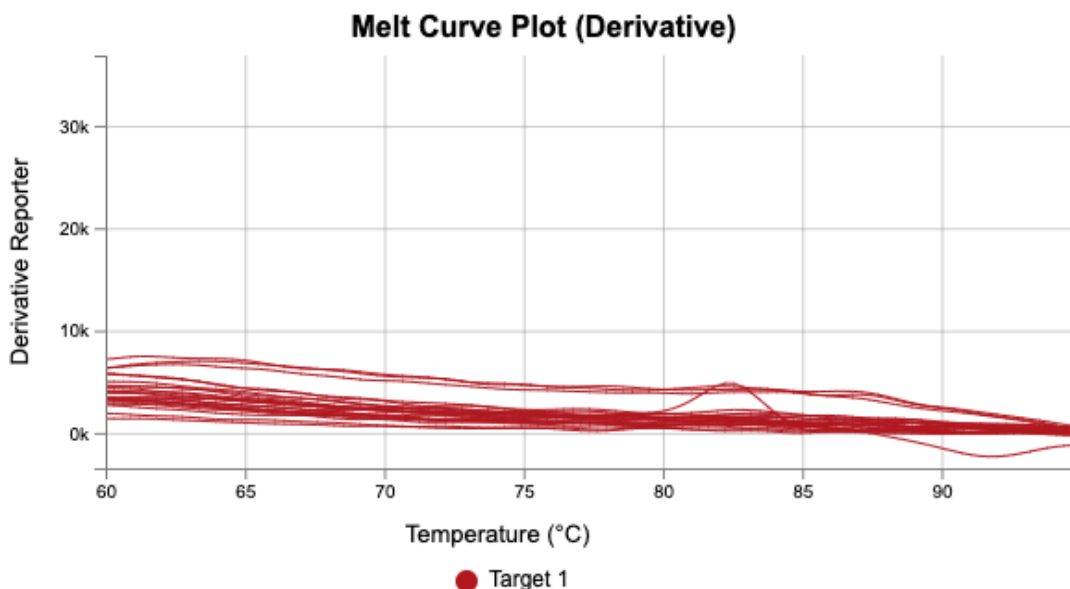


Figura 10- Análise da curva de melting das amplificações das amostras negativas usadas na qPCR com o iniciador 122.2.

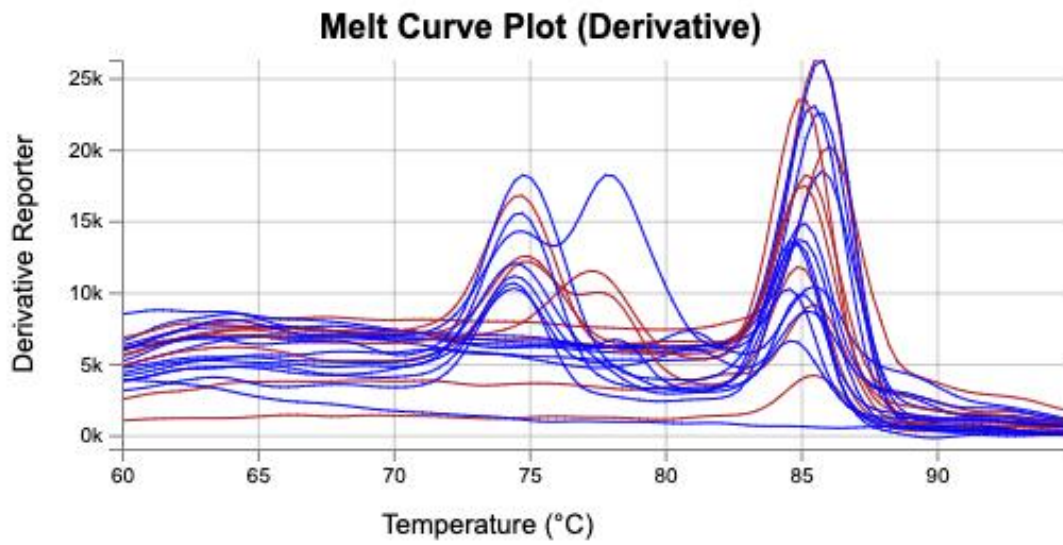


Figura 11 – Análise da curva de melting das amplificações das amostras positivas usadas na qPCR com o iniciador 122.2.

91	NEGATIVO	NSA	0	0	0	0	35	83-85									
94	NEGATIVO	NSA	0	0	35	84	38	83									
110	NEGATIVO	NSA	35	75-85	32	75-85	0	0	0	0	30	75-85	30	87	30	75-85	
111	NEGATIVO	NSA	30	75-85	32	75-85	0	0	0	0	30	75-80	30		30	75-80	
112	NEGATIVO	NSA	35	75-85	32	75-85	35	81	30	87	30	75-85	30	80-85	30	75-85	
113	NEGATIVO	NSA	35	75-85	32	75-85	35	83	30	85	30	75-85	30	85	30	75-85	
114	NEGATIVO	NSA	35	75-85	32	75-85	0	0									
114	NEGATIVO	NSA			33	75-86	0	0									
115	NEGATIVO	NSA			34	75-87	0	0									
116	NEGATIVO	NSA			35	75-88	0	0									
117	NEGATIVO	NSA			36	75-89	0	0									
119	NEGATIVO	NSA			37	75-90	0	0									
120	NEGATIVO	NSA			38	75-91	0	0									
121	NEGATIVO	NSA			39	75-92	0	0									
122	NEGATIVO	NSA			40	75-93	0	0									
123	NEGATIVO	NSA			41	75-94	0	0									
125	NEGATIVO	NSA			42	75-95	0	0									
126	NEGATIVO	NSA			43	75-96	0	0									
127	NEGATIVO	NSA			44	75-97	0	0									
128	NEGATIVO	NSA			45	75-98	0	0									
129	NEGATIVO	NSA			46	75-99	0	0									
130	NEGATIVO	NSA			47	75-100	0	0									
131	NEGATIVO	NSA			48	75-101	0	0									
174	NEGATIVO	NSA			49	75-102	0	0									
175	NEGATIVO	NSA			50	75-103	0	0									
179	NEGATIVO	NSA			51	75-104	0	0									
187	NEGATIVO	NSA			52	75-105	0	0									
196	NEGATIVO	NSA			53	75-106	0	0									
200	NEGATIVO	NSA			54	75-107	0	0									
203	NEGATIVO	NSA			55	75-108	0	0									
204	NEGATIVO	NSA			56	75-109	0	0									
215	NEGATIVO	NSA			57	75-110	0	0									
218	NEGATIVO	NSA			58	75-111	0	0									
220	NEGATIVO	NSA			59	75-112	0	0									
224	NEGATIVO	NSA			60	75-113	0	0									
256	NEGATIVO	NSA			61	75-114	0	0									
257	NEGATIVO	NSA			62	75-115	0	0									
266	NEGATIVO	NSA			63	75-116	0	0									
268	NEGATIVO	NSA			64	75-117	0	0									
269	NEGATIVO	NSA			65	75-118	0	0									
274	NEGATIVO	NSA			66	75-119	0	0									

A partir da análise de todos os resultados obtidos nas qPCR realizadas, foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram pelo menos uma amplificação com ct entre 30 e 35 entre as triplicatas e com temperatura de melting entre 83°C e 85°C. A amostra foi considerada negativa se não houve nenhuma amplificação nesta faixa de temperatura ou se não houve nenhuma amplificação global.

Dentre as amostras negativas que apresentaram amplificação com ct de 30 e TM de 76°C foram selecionadas 12 amostras para que se fizesse o sequenciamento destes amplicons. O sequenciamento foi realizado também com 5 amostras positivas (TM 83 a 85°C).

O sequenciamento das amostras positivas mostrou 95% de identidade com a proteína gp90 de env.

O resultado do sequenciamento das amostras consideradas negativas não apresentou contigs compatíveis com nenhuma região gênica disponível do genbank.

Para efeito de exemplificação, o resultado do sequenciamento e análise de uma amostra positiva e negativa a partir dos amplicons da qPCR estão apresentados nas figuras 12A, B, C e D que sua correspondência geradas a partir das ferramentas Blastn e Blastx (NCBI/NIH; disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

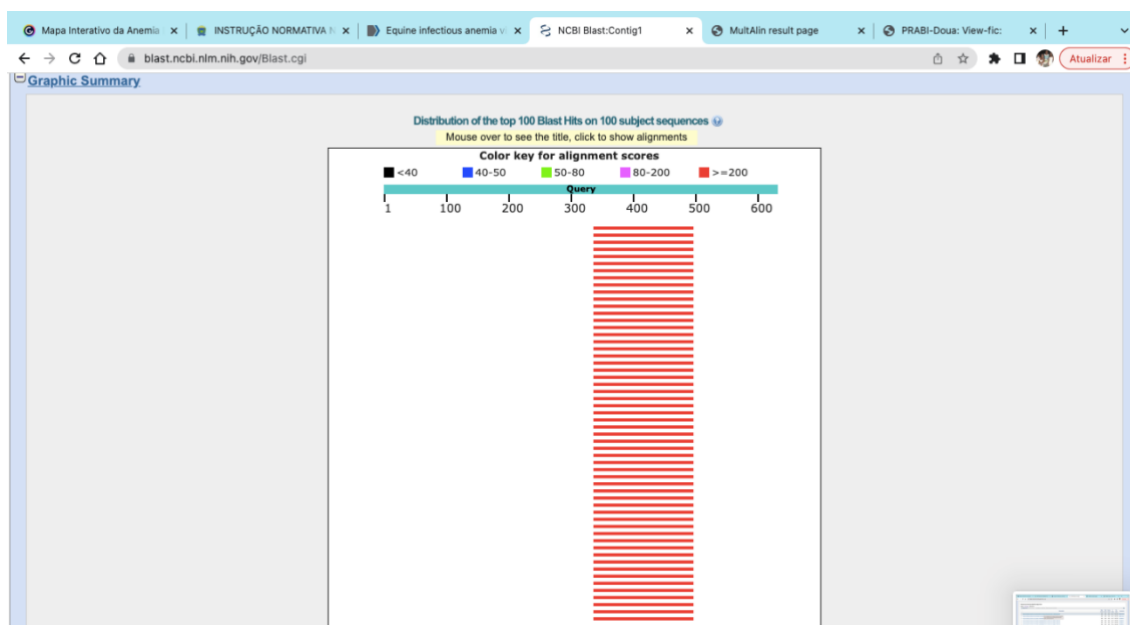


Figura 12A – Gráfico de identidade do fragmento gerado com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons produzidos na qPCR proposta para o diagnóstico molecular da AIE.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus nonfunctional envelope glycoprotein gene, partial sequence	283	283	25%	2e-71	98.75%	MZ614134.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus envelope glycoprotein	283	283	25%	2e-71	98.75%	MZ614132.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate 2150do568i gene, partial sequence	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288649.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate 2150do568rev9b rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288648.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate 2150do568rev5b rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288647.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate 2150do568rev1b rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288638.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev23 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288623.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev22 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288622.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev16 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288619.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev14 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288618.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev10 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288616.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev6 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288612.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev5 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288611.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev4 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288610.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev3 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288609.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev2 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288608.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus isolate wrev1 rev. protein (rev) mRNA, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AY288606.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus proviral integrase (int) and transactivator of transcription (tat) genes, partial cds; and truncated envelope protein (env) and mRNA transport protein (rev) genes, complete cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AF509240.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus variant RB2/E80 Rev and oed5 genes, partial cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AF314376.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus complete genome	283	283	25%	2e-71	98.75%	AF247394.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus RNA for envelope protein	283	283	25%	2e-71	98.75%	X16988.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus strain Th-1 clone F22 Rev (rev) mRNA, complete cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AF213975.1
<input type="checkbox"/> Equine infectious anemia virus strain Th-1 clone B11 Rev (rev) mRNA, complete cds	283	283	25%	2e-71	98.75%	AF213975.1

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#inHdr_2186386597

Questions/comments

Figura 12B – Lista de possíveis alinhamentos significativos do fragmento gerado com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons das amostras positivas produzidos na reação de qPCR proposta para o diagnóstico molecular da AIE contra seqüências depositadas no GenBank.

NCBI

Conserved Domains

Conserved domains on [EIAV_Rev] [Query_15332]

Contig3 amostra 3825

Graphical summary

RF -2

Non-specific hits

Superfamilies

EIAV_Rev

EIAV_Rev superfamily

List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
EIAV_Rev	pfam11129	Rev protein of equine infectious anemia virus; The sequence of this family is highly ...	165-269	9.62e-12

Blast search parameters

Date Source: Live blast search RD = 7R0YFEM016

User Options: Database: CDSEARCH001 Low complexity filter: yes Composition Based Adjustment: yes E-value threshold: 0.01 Maximum number of hits: 500

References:

- Harchler-Bauer A et al. (2017), "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", *Nucleic Acids Res.*45(D):200-3.
- Harchler-Bauer A et al. (2015), "CDD: NCBI's conserved domain database.", *Nucleic Acids Res.*43(D):222-6.
- Harchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D):225-9.
- Harchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.*32(W):327-331.

Help | Disclaimer | Write to the Help Desk

NCBI | NLM | NIH

HHS Vulnerability Disclosure

Figura 12C – Identificação do domínio conservado EIAV_Rev superfamily identificado a partir da análise da seqüência de nucleotídeos (Blastx) do sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons obtidos na qPCR com o iniciador 122B.

AMOSTRAS NEGATIVAS

Amostras negativas analisadas não geraram contigs. As seqüências diretas e reversas foram analisadas no programa blast

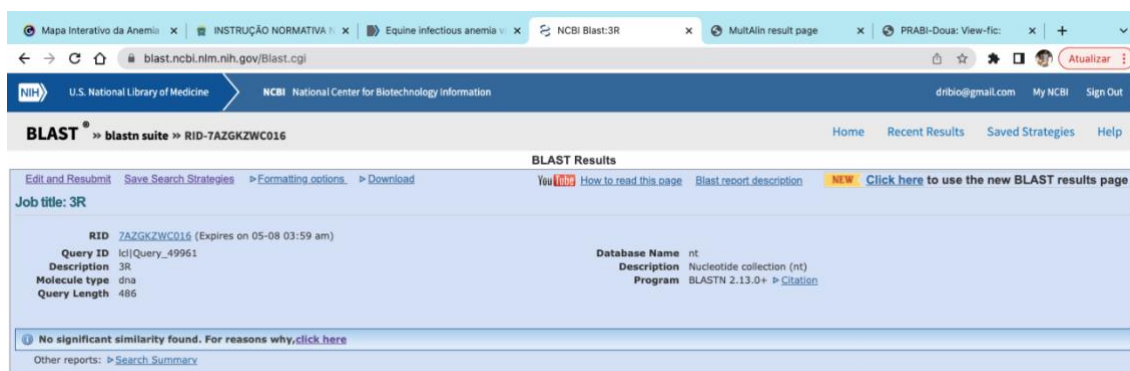


Figura 12D – Resultado dos alinhamentos significativos do fragmento gerado no sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons das amostras negativas produzidos na qPCR proposta para o diagnóstico molecular da AIE contra sequências depositadas no GenBank.

O resultado deste sequenciamento comprovou a acurácia do iniciador (122.2) para ser usado como teste molecular de detecção da AIE.

A partir dos dados obtidos nas qPCRs, foi realizada a avaliação de desempenho de qPCR baseada em valores de CT e TM, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro. O resultado desta análise está descrito na tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação de desempenho de RT-qPCR baseada em valores de CT e TM, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro.

		Cut-off	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio	AUC
CT	122.2	> 34.00	80	58,40% to 91,93%	85,71	76,67% to 91,63%	5,6	0,8345
TM	122.2	> 0.5000	80	58,40% to 91,93%	73,81	63,52% to 82,02%	3,055	0,769

A análise dos dados de avaliação de desempenho de RT-qPCR baseada em valores de CT indicou uma acurácia de acima de 80% em diferenciar resultados positivos e negativos, como demonstrado nos gráficos de análise sobre a curva ROC desenvolvida a partir dos dados obtidos com as reações de qPCR do teste diagnóstico proposto apresentados na figura 13.

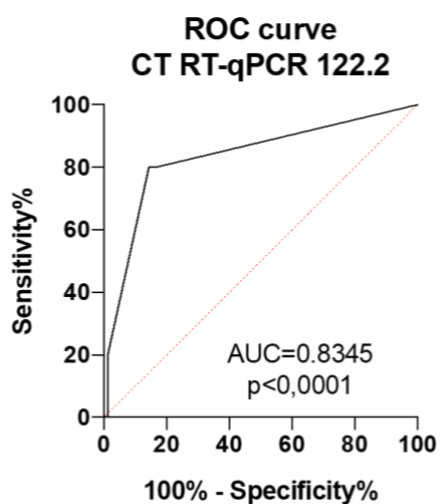


Figura 13 - Avaliação de desempenho da qPCR baseada em valores de CT, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro. Dados obtidos a partir da análise no programa *GraphPad Prism* 8.0 (San Diego, CA, USA)– Acesso em 11/2022

A análise dos dados de avaliação de desempenho de RT-qPCR baseada em valores de TM indicou uma acurácia moderada a baixa em diferenciar resultados positivos e negativos. Esse resultado está demonstrado graficamente na figura 14.

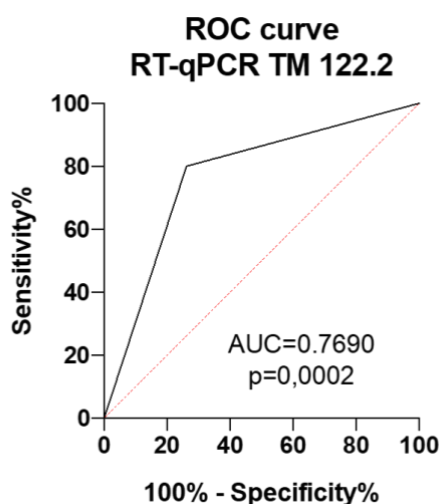


Figura 14 - Avaliação de desempenho da qPCR baseada em valores de TM, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro. Dados obtidos a partir da análise no programa *GraphPad Prism* 8.0 (San Diego, CA, USA) – Acesso em 11/2022

A análise dos dados da qPCR proposta como metodologia para o diagnóstico da AIE baseada em valores de CT indicou que esta técnica permite diferenciar significativamente ($p<0,0001$) resultados positivos e negativos. Esse resultado está representado graficamente nas figuras 15.

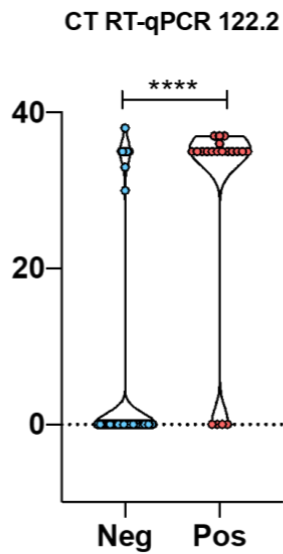


Figura 15 - Gráfico de desempenho da qPCR baseada em valores de CT, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro. Dados obtidos a partir da análise no programa *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, CA, USA) Acesso em 11/2022

A análise dos dados da qPCR baseada em valores de TM indicou que esta técnica permite diferenciar significativamente ($p < 0,0002$) resultados positivos e negativos. O gráfico representativo deste resultado está na figura 16.

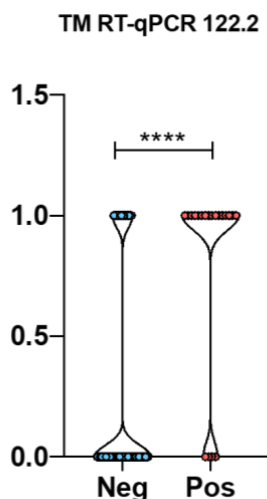


Figura 16 - Gráfico de desempenho da qPCR baseada em valores de TM, considerando o teste de Imunodifusão em Agar como padrão-ouro. Dados obtidos a partir da análise no programa *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, CA, USA)– Acesso em 11/2022

Embora o EIAV represente um grande problema sanitário para as populações de equídeos na maioria das regiões do mundo, o conhecimento detalhado sobre sua epidemiologia molecular é escasso. De fato, o desenvolvimento do teste molecular para AIE tem sido um grande desafio e muitos pesquisadores e grupos de pesquisa tem buscado o desenvolvimento de testes moleculares baseados em PCR convencional ou PCR quantitativa. Malossi e colaboradores em 2020 procuraram desenvolver um ensaio de qPCR para detecção do EIAV em amostras brasileiras do vírus, isolados da região do Pantanal. Nesse trabalho, os pesquisadores conseguiram sequenciar completamente duas amostras brasileiras de EIAV e houve assim um grande avanço no conhecimento do perfil genômico de amostras brasileiras. Outros trabalhos como os de Cook e colaboradores (2001; 2002), Costa e colaboradores (2021), Romo I Sáenz e colaboradores (2021) e Cook e colaboradores (2020) desenvolveram ensaios de detecção molecular para as regiões tat-gag, 5'LTR-tat e LTR respectivamente. No entanto, um ensaio por qPCR que pudesse identificar uma região específica de forma eficaz para se proceder a detecção do EIAV em amostras brasileiras de animais positivos para AIE ainda não foi descrito. Neste trabalho, graças ao sequenciamento massivo e paralelo de amostras brasileiras de EIAV, foi possível identificarmos uma região muito específica e conservada entre todos os isolados descritos até hoje. A partir desta região foi desenhado um ensaio de qPCR testado inicialmente com SybrGreen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), levando-se em consideração os parâmetros ideais para o desenvolvimento de iniciadores efetivos, como alto conteúdo CG, impossibilidade de formação de estruturas secundárias dentro das regiões propostas e entre elas, tamanho adequado e correspondência à mesma região detectada no sequenciamento, que corresponde à parte do gene *env* que codifica a glicoproteína gp90. Os dados obtidos neste trabalho são importantes pois a sequência obtida é muito conservada no gene da gp90 entre os isolados de EIAV do mundo e não só entre as amostras brasileiras cujas sequências estão disponíveis. A conservação de partes deste gene é aproveitada no fato de que este antígeno é a base do IDGA, teste oficial para a detecção de equídeos infectados com EIAV (Issel et al., 2014). Estudos recentes sugerem que episódios cíclicos observados durante a fase crônica da AIE estão associados com populações virais distintas que podem ser distinguidas como variantes genômicas e/ou antigênicas. Estas observações sugerem que a natureza cíclica da fase crônica está ligada à produção e seleção de variantes de envelope viral (*env*), ou mutantes de escape imunológico (Leroux et al., 2001). Os mutantes de escape antigênico são

vírus que por meio de mutações nos genes que codificam as proteínas de superfície produzem infecções persistentes, permitindo a replicação em um hospedeiro mesmo na presença de anticorpos (Flores, 2007). Essas conclusões são suportadas pela análise das sequências da proteína de superfície (SU – gp90) em cavalos e pôneis durante episódios clínicos cíclicos e nas substituições observadas em 8 domínios hipervariáveis (Zheng et al., 1997). A análise da SU demonstra que as substituições de aminoácidos entre diferentes amostras estão distribuídas por toda a molécula com exceção da região terminal amino. Outra característica conservada é a presença de resíduos de cisteína, sugerindo que as pontes dissulfeto são essenciais para a integridade estrutural e funcional da SU (Issel et al., 2014). Embora a presença de regiões hipervariáveis tenham sido descritas, a região do gene da gp90 descrita e usada na elaboração do teste molecular proposto neste trabalho está fora dos domínios hipervariáveis descritos e, portanto, pôde ser definido como uma região adequada à elaboração do teste molecular.

Com os resultados obtidos e análise sobre a curva ROC chegamos à conclusão que a qPCR desenvolvida usando os valores de CT apresentados tem desempenho elevado de 80% para identificar casos positivos de AIE. Esperamos, portanto, contribuir não só com o desenvolvimento de um novo procedimento diagnóstico que supere as dificuldades dos testes sorológicos, pois a partir de uma análise mais apurada e novos estudos voltados para a região descrita e amplificada nas reações positivas para detecção da região gênica citada, podem ser propostas novas tecnologia no futuro desenho de vacinas ou tratamento direcionado para a AIE.

5.4 – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO SANGER JUNTAMENTE COM NGS PARA OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA COMPLETA ON615427

Como descrito anteriormente, foram usadas as sequências geradas no NGS e como referências as amostras brasileiras (MN560970.1 – BRA1; MN560971.1 – BRA2) para desenhar os iniciadores correspondentes às regiões gênicas do vírus. Foram desenhados 19 iniciadores dentre os quais foram amplificadas regiões específicas de 14 pares de iniciadores, cujos amplicons foram sequenciados. A figura 17 mostra o resultado da PCR para amplificação dos fragmentos correspondentes aos iniciadores desenhados. Os resultados das PCRs foram analisados em gel de agarose 1,5% e tampão TAE e corados com Sybr Safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O tamanho dos amplicons obtidos estão descritos na tabela 8.

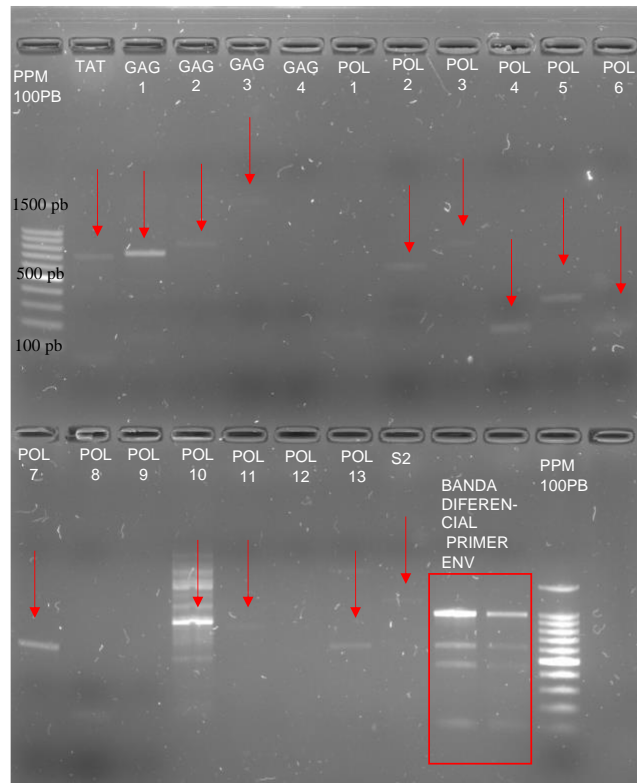


Figura 17: Gel de agarose do resultado das reações de PCR usando iniciadores específicos para completar o sequenciamento da amostra 122B. Foram desenhados 19 pares de iniciadores e desses foram obtidos os amplicons de 14 iniciadores. Os tamanhos dos amplicons das regiões dos genes *tat*, *gag*, *pol*, e *s2* estão descritos na tabela 8. As quatro últimas canaletas desta figura devem ser desconsideradas nesta parte do estudo. Foi usado o padrão de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder - Promega Corporation).

A partir do sequenciamento destes diversos fragmentos, construímos a primeira sequência completa do genoma de EIAV isolado de um jumento (amostra 122B), que está descrita abaixo. Os genes referentes a cada proteína do EIAV também foram caracterizados alinhados e comparados às amostras brasileiras de EIAV POCONÉ-BRA1 (MN MN560970.1) e POCONÉ-BRA2 (MN560971.1). A correspondência dos genes foi feita no Programa Geneious prime versão 2022.1. Foram identificados 7 ORFs relativas às sequências parciais e complementares dos genes *gag*, *pol* e *env*. A sequência completa deste isolado foi submetida ao GenBank e o número de acesso no banco de dados é ON615427.

A partir desta sequência foi analisado o perfil genômico através do alinhamento do genoma do isolado 122B com as demais sequências do genoma completo do EIAV disponíveis no GenBank. Parte deste alinhamento está representado na figura 18. A partir desta análise foram montadas as tabelas de caracterização de cada ORF sequenciada e alinhada. A análise deste alinhamento é necessária para a localização do número correto da base nitrogenada

correspondente ao início e fim de cada ORF (códon de iniciação e término de cada ORF). Esta etapa é parte obrigatória para a realização do depósito na nova sequência no GenBank.

A partir da avaliação da sequência, o GenBank fornece um número de acesso correspondente à sequência depositada e a anotação de cada ORF. A anotação dos genes e resultado da análise da sequência completa do isolado 122.2 com os intervalos relativos às ORFs, no formato de referência do GenBank podem ser visualizados a partir do link [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2287983409?report=graph&tracks=\[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD649220238,annots:Sequence,ShowLabel:false,ColorGaps:false,shown:true,order:1\]\[key:feature_track,name:Other_features---misc_feature,display_name:misc_feature,Features,id:STD3760889287,subkey:misc_feature,annots:Unnamed,shown:true,order:4\]\[key:feature_track,name:Other_features---3'UTR,display_name:3'UTR,Features,id:STD374084447,subkey:3'UTR,annots:Unnamed,shown:true,order:5\]\[key:feature_track,name:Other_features---5'UTR,display_name:5'UTR,Features,id:STD2600439000,subkey:5'UTR,annots:Unnamed,shown:true,order:6\]&v=1:8077&c=CC99FF&select=null&slim=0](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2287983409?report=graph&tracks=[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD649220238,annots:Sequence,ShowLabel:false,ColorGaps:false,shown:true,order:1][key:feature_track,name:Other_features---misc_feature,display_name:misc_feature,Features,id:STD3760889287,subkey:misc_feature,annots:Unnamed,shown:true,order:4][key:feature_track,name:Other_features---3'UTR,display_name:3'UTR,Features,id:STD374084447,subkey:3'UTR,annots:Unnamed,shown:true,order:5][key:feature_track,name:Other_features---5'UTR,display_name:5'UTR,Features,id:STD2600439000,subkey:5'UTR,annots:Unnamed,shown:true,order:6]&v=1:8077&c=CC99FF&select=null&slim=0)

Parte da anotação do DNA proviral do isolado ON615427 está representada na figura 19. A anotação gênica completa pode ser acessada por meio do link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ON615427>.

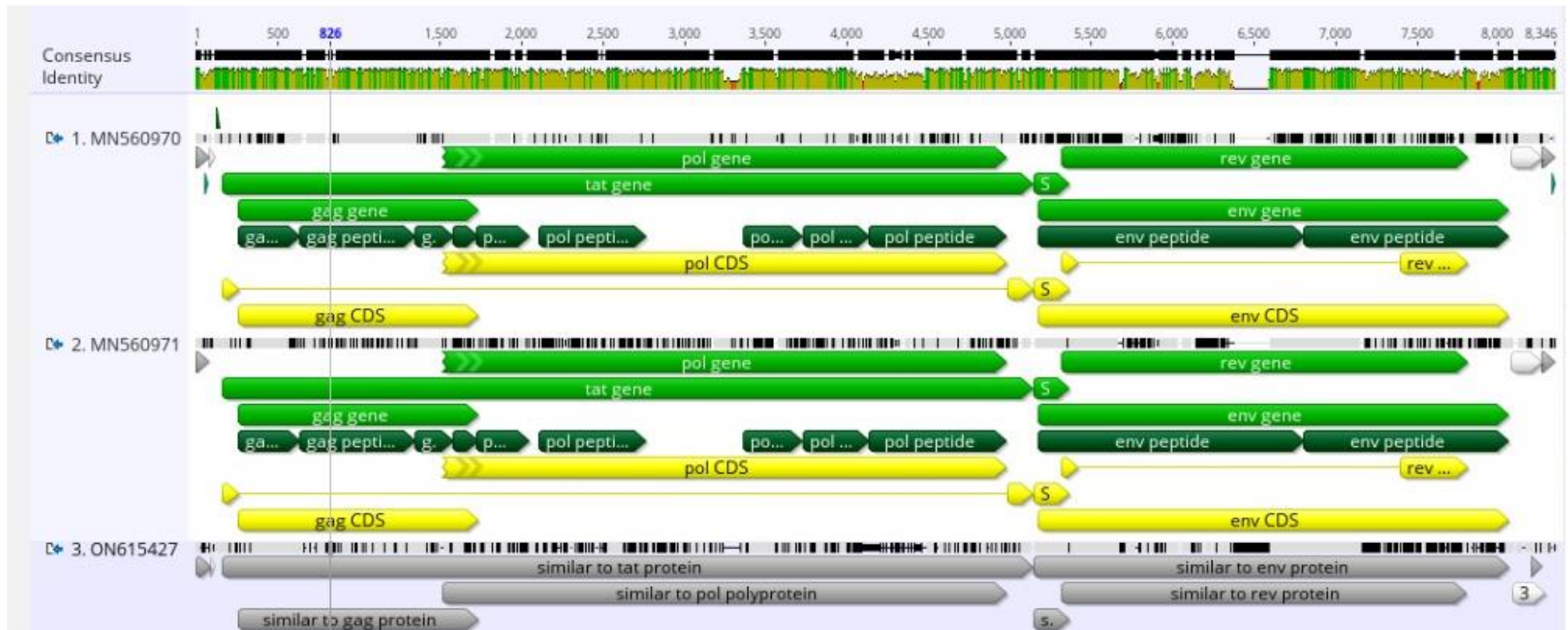


Figura 18: Parte do alinhamento da sequência completa da amostra 122B contra as amostras de EIAV disponíveis no GenBank. Nesta figura estão representadas além do isolado ON625427, os isolados MN560970.1(BRA1), MN560971.1(BRA2. Resultado obtido no programa Geneious Prime 2022.1.

```

LOCUS      122B_DonkeyBrazil      8080 bp    DNA      linear    UNA
16-MAY-2022
DEFINITION .
ACCESSION  urn.local...306-etmix9k
VERSION    urn.local...306-etmix9k
KEYWORDS   .
SOURCE     .
  ORGANISM .
FEATURES   Location/Qualifiers
  misc_feature   259..678
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 1 (frame 1)"
  misc_feature   866..1636
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 2 (frame 2)"
  misc_feature   2495..2974
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 3 (frame 2)"
  misc_feature   3578..3985
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 4 (frame 2)"
  misc_feature   4929..5633
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 6 (frame 3)"
  misc_feature   6290..6934
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 5 (frame 2)"
  misc_feature   6912..7622
                 /note="Geneious type: ORF"
                 /standard_name="ORF 7 (frame 3)"
ORIGIN
1 agacactcag attctgcggt ctgagtcctt acgagatagc atcaggtaag
actggagttc
61 agacgtgtgc tcttccgagt bctctgtctc aacttgttgg ttttaagatc
ctacagttgg
121 cgcccgaaca gggacctgag aagggcgagc acctgcctg ctgaacctgg
ctgatcgtag
181 gatccctagg acagcagagg agaacttgca gaagtcttct ggagggtttc
ctggccagag
241 ccaaggaasa caggtaagat gggagacca ttgacttggg gcaaagcgct
caggaagcta
301 gagaaggtag cggtttcggg gtctcaaaaa ttgagtacag gaaattgtaa
ttgggcgcta
361 agtttggtgg atttgtttca tgacaccaac ttcacaaaag agaaagactg
gcaattgagg
421 gatgtcattc cattgctgga agacgtttct cagacattgt caggactaga
aagagaagcc
481 tttgaaaaaa catggtgggc aatctctgca gtaaaaatgg gactacagat
taataatgcg
541 ggagatggaa aggcattctt ccaactgctg aaagcaaaat atgacaaaag
agatacaggt
601 aaaaaacagc ctgagcctcc agaggaattt ccaataatga ttgatggggc
cggaatatag
661 aatccggttc acccttaaca cccagaggat acaccacctg ggtaaatact

```

Figura 19: Parte da anotação dos genes e resultado da análise da sequência completa do DNA proviral do isolado ON615427 com os intervalos relativos às ORFs, no formato de referência do GenBank. Resultado obtido no programa Geneious Prime 2022.1.

Cada uma das sequencias obtidas e a sequênça completa da amostra 122B (GenBank: ON615427) alinhadas foram avaliadas individualmente quanto a sua identidade quando comparadas às demais sequênças completas bem como de cada gene disponíveis no GenBank, O gráfico de identidade e lista de possíveis alinhamentos significativos dos fragmentos gerados e correspondentes à sequênça completa e aos genes *tat*, *gag*, *pol*, *s2*, *env* e *rev* individualmente estão representadas nas figuras 22 (A e B); 23 (A, B, C e D); 24 (A, B, C e D); 25 (A, B, C e D); 26 (A, B, C e D); 27 (A, B, C e D) e 28 (A, B, C e D), respectivamente e estão apresentadas a seguir.

A



B

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> polymerase [Equine infectious anemia virus]	451	1269	61%	0.0	70.88%	QFE31731.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	449	1253	61%	0.0	70.00%	QBC73612.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	446	1235	61%	0.0	70.88%	QBC73618.1
<input type="checkbox"/> RecName: Full=Pol polyprotein; Contains: RecName: Full=Protease; AltName: Full=Retroviral; Contains: RecName: Full=Reverse transcriptase/ribonuclease H; Short=RT; AltName: F	437	1217	62%	0.0	70.00%	P32542.1
<input type="checkbox"/> reverse transcriptase [Equine infectious anemia virus]	437	1057	51%	0.0	70.00%	AAA43004.1
<input type="checkbox"/> RecName: Full=Pol polyprotein; Contains: RecName: Full=Protease; AltName: Full=Retroviral; Contains: RecName: Full=Reverse transcriptase/ribonuclease H; Short=RT; AltName: F	436	1216	62%	0.0	69.71%	P11204.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1219	61%	0.0	71.76%	ADU02714.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1215	62%	0.0	69.71%	AAS5862.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1231	61%	0.0	71.76%	ADU02702.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1230	61%	0.0	71.47%	ADU02636.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1231	61%	0.0	71.47%	ADU02696.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1233	61%	0.0	71.47%	ADU02642.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	436	1215	62%	0.0	69.41%	BAB12110.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1235	61%	0.0	71.47%	ADU02654.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1235	61%	0.0	71.47%	ADU02660.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1214	62%	0.0	69.41%	BAB12104.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1242	61%	0.0	71.47%	ADU02690.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1234	61%	0.0	71.47%	ADK35840.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1234	61%	0.0	71.47%	AAK21112.1
<input type="checkbox"/> pol protein [Equine infectious anemia virus]	435	1213	62%	0.0	69.71%	ADG02702.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	435	1234	61%	0.0	71.47%	ADU02678.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	434	1228	61%	0.0	71.47%	ADK35834.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	434	1238	61%	0.0	71.47%	ADK35864.1
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	434	1239	61%	0.0	7	
<input type="checkbox"/> pol polyprotein [Equine infectious anemia virus]	434	1217	62%	0.0	6	

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_P11204

Questions/comments

Figura 22 A e B – Gráfico de identidade e lista de possíveis alinhamentos significativos do fragmento gerado com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 8 comparados contra sequências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.

>TAT

CTGCTGAACCTGGCTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAAGTTCAGAAAGTCTTCTGGA
GGTGTTCCTGGCCAGAGCCAAGGAASACAGGTAAGATGGGAGACCCATTGACTTGGAGCAAAGCG
CTCAGGAAGCTAGAGAAGGTGACGGTTTCGGGGTCTCAAAAATTGAGTACAGGAAATTGTAATTG
GGCGCTAAGTTTGGTGGATTTGTTTCATGACACCAACTTCACAAAAGAGAAAGACTGGCAATTGAG
GGATGTCAATCCATTGCTGGAAGACGTTTCTCAGACATTGTCAGGACTAGAAAGAGAAGCCTTTGA
AAAAACATGGTGGGCAATCTCTGCAGTAAAAATGGGACTACAGATTAATAATGCGGGAGATGGAA
AGGCATCTTTCCAAGTCTGAAAGCAAAATATGACAAAAGAGATACAGGTAACAAACAGCCTGAG
CCTCCAGAGGAATTTCCAATAATGATTGATGGGGCCGAAATAGGAATCCGTTGCACCCTTAACAC
CCAGAGGATACACCACCTGGGTAATACTATACAGCAAAATAATTTGTTAAATGAGGCAAGTGTA
AACTTGTGGAAATTTTGTGAGTATGACATCGGAAGAAATGAATGCATTTTCCGTTTGGTGG
TACCAGGACAAGCAGGACAAAACATGAGCCCTACTTGTTTACTAGACAAGATGGCTGAAGATT
GGGACAATAGGCATCCATTACCAAACCCACCCTTGGTGGCGCCGGCACAAGGACCTATTCTATGA
CGGCAAGATTTATTAGAGGGTTAGGAGTTCCTAGAGAAGTGCAGATGGAACCAGCCTTTGATCAGT
TCAGACAGACTTATAGACAGTGGATAATTGAGGCGATGACAGAAGGAATAAAAATAATGATTGGA
AAGCCTAAAGCTCAAAATATCAGGCAAGGCCCAAAGAGCCTTATCCGGAATTTGTAGACAGATT
ATTGTCCAAATAAAGAGTGAGGGACATCCCTCAGAGATAACAAAGTTTCTAACAGACACCTAAC
AATTCAGAAATGCAAATGAGGAATGTAGAAATGCTATGAGACATTTGAGGCCAGAAGATTCTTTAG
AGGAAAAGTTATATGCTTGTAGGGATATAGGCACGGTAAAACAAAAAATGCTGTTACTTGCAAAG
GCACTACAGACTGGACTGGCTGGTTCAATGAAGGGAGGTATTATAAAAGGAGGACCTCCAAGGGC
AAAACAACATGTTATAAATTGTGGAAGCCAGGACATCTGTCTAGCCAGTGTAGAGCACCTAAGG
TATGCTTTAAATGTAAGGAACCTGGACATTTCTCAAGGCCCTCCAAAAACGGGAAGAAGGGGG
CTCAGGGGAGGCCCCGAAGCAGACTTTCCCTGTACAGCAGAGTTCCCTCTGCAGAGAACAAGCAA
AGGAACACAGTTCCAACACAGAAGTGTATCCAGATTTAACTCAGATGAAACAGGAGTATTAGATT
GATACAATCGTCCCCAAGATCCAGAGGGTCTCTTTCTGATCAGTTTGTGGGAGTAACATATAACT
TACAAAAGAGAGCTGTCTGTCTAGTTTTCTTTAATGATACTCCTCTGAGTGTGTTACTGGATACAGG
AGCAGATACTTCCATTCTTAAGTATCGCACATTATAACAAGTTGAAATATAGACGGCAAAAATATC
AAGGTACAGGAATTGTAGGGGTTGGAGGGAATGTAGAAACATTTCTCCACTCATGTGACAATAAAA
AAGAAAGTGGATAGGCTTTTAACAAGAATGTTAGTAGCAGATATTCCAGTACTATTCTGAGACGG

GGGATCTAGCCTAAGAAGCTAGGGGTCCGATTGGTAATGGCACAACCTTTCAAAGAAATAACTCCA
AAAAAGATTAAAATAAAGGACGACTCAGCAGGGCCCAAATTCCTCAATGGCCCCTTACTAAGGA
AAAATTTGTTGAGGCCAAGGAAATAGTACAAAGACTATTATCAGAAGGTAAGATATCAGAAGCTA
GTAGTGAAAATCCGTATAATTCACCTCTGTGATAAGGAAAAAGTCTGGAAAATGGAGATTAAGTCT
TATACGAATTGAGGGCTTTAAATACAATTGTGAAATTGGAAGTCTGAGATATCTAGAGCATTACCACA
TCCAGGAGGGTTAATTACAAATAACCATATGACAGTGCTAGATATTGGAGATCCGTACCTCACTAT
TCCATTAGATCCAGAATTTAGATCCCAAAGAGCCTTACTGTTCCGTCCTTAAATCATCAGGAACA
GATAAAAGATATGTAGTGGAACGATTACCGACACTGTTTCTTTTGAGTCCATACATATATCAAAA
GACACTGCAAGAAATATTACAGGCATTTAGAGAAAGATATCCTGAAGTACAATTATATCAATATAT
GGATGATTTATTTATTGGGACTATCCGCCCTAAGGCACAACATAAAGAATTAATAAAGGAATTAAG
GACTGTTCTTTAGAAAAGGGTTCTAATCCACCAGATGACAAAGTACAGGAAGAAGCCCCTGACA
ATTGGCTTGGATATCAGTTGAAACCAAGTCCCGGAAGGTACAGAAAATGCAGTTGGAGATGGTCC
CTGAACACATAATTAATGATGTTCAAAAATTGATGGGAAATATAACATGGGTGCCTTTAAGGGTTC
CTGGATTAAGTGTAAAGCAAATAGCCGCTACCACTAAAGGCTGTTTAGATTTAAATCAAGAGGTGA
CTCGGACCGAAGAAGCCCAAAAAGAATTAGAGGAAAATAATGAAAAAATCAGAAAATGTTTAGAG
CCCACAATCTTCTCATCCAAAAGAAGAAATAATATGTGAAATTGAGCTTACAAAAAATTATGAAGC
AATATATATGATAAAAACAGCCACAAGGAATATTGTGGGCAGGAAAAAAGATCATGAAGGCAATA
AGGGGTGGTCTGCAGCAAAAATTTAATGTTATGGATACAGGCCCTAACAACTACTACAGCATGTGG
CAACAGAAAGCATTACTAGAGTAGGAGTCTGTCCAAAATTTAAAGTGCCTTCACTAAAGAAATGG
GTGGAGTATCCAACAGCCGGTATAACAATATATACTGATCTGGGAGAAAGGAATGGAGAAGGAAT
AGCAGCCTATGTGACTAGTGACGGAAAACTAAACAGAGACAGTTAGGTCTTACTACTCATCAGG
CTGCTGAAAGAATTGCTATACAAATGGCTTTGGAAGACATTAGGGATAAACAAGTAAATATAGTG
ACAGACAGTTATTATTGTTGGAAAAATATAACAGATTACAGAAGGATTAGGATTAGAGGGACCAG
ATAGCCCCTGGTGGCTATAATATGATTTTCCCTTGTCTCCTGCTCTCTGTAATATACAGGATAAAG
ATGCAGTATATTTTCGCATGGGTGCCAGGTCACAAGGGCATATATGGTAATCAATTGGCAGATGATG
CAACTAAAATAGTTCAAGAAATAATGATAGCTTATAAAGGAACACAAATAAAAGAGAAAAGAGAT
GAAGATGCAGGGTTTGATTTCTGCATTCCATATGACATGACAATAAAGGTTTTGGAGACAAAATA
ATATCCACAGATGTAAGAATTCAAGTGCCTCTTAATAGTTTTGGATGGGTCACTGGTAAATCATCA
ATGGCTAGGCCAGACCTCTTATCTAATGGAGGGATAATTGATGAAGGATATACAGGGGAAATACA
GGTAATATGCACCAATATTGGCAAAAGTAATCTCAAGTTGTCTGAGGGACAAAAGTTTGCGCAATT
TGTCAGTCTACAACATCACTTCACTTCATTATCTTTAGTCATTGCGTCTAAATGGAATGCGTCTTAA
AATTGGATAGCTTTAGACCTAGAAGGGATGCAAGTAAAGGTTGAGAGCCATTACCCTCATCTGGTG
TCTCAAACCCCATAAAATAAATTCCTCTTTTCTTTGGCCTGGACATAGAAAAGGAACCACTTTCT
CTTTATAATGTAAAATCCATTAACATATGCCAGAGAATTCAGTTTGAATCTTTGAAATAAAATCT
CCCAAAAAAGTATTAATAATGATGGCAATAATGCTAGCTAAATGCCAATAAAATAATCTACCATT
GTTTTTAAGTAAATAAGCACGATCATTGCACACAGATAATGGCACAATTTTCATAGCTGACTCAGT
ACAAAATTTGCTGATTCTATCTGTCTCCTTACTCTGTGTTTTGTGATCCCTAAAAATAACACACACA
ACAGGGATACCAAAAATAACACACACAACAGGGATACCTTATCACCCGAAAGTCAAGGTATAGT
AGAAAGAGCTAATAGAACATTAAGAAGAGAAAATTCAAAGTCATAGAGACAATACCCAGACATTAG
AAGCGCTTTRCAACTTGCCCTCATTACTTGTAACAA

A

BLAST® » blastx » RID-7B258EFV016

U.S. National Library of Medicine | NCBI National Center for Biotechnology Information

Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Job title: TAT

RID: 7B258EFV016 (Expires on 05-08 04:44 am)

Query ID: lcl|Query_37274

Description: TAT

Molecule type: dna

Query Length: 4436

Database Name: nr

Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

Program: BLASTX 2.13.0+

Other reports: Search Summary Taxonomy reports

Graphic Summary

Show Conserved Domains

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

RF #1: active site, nuclear acid binding site, ATP binding site, transfer interface, transferase

Super-families: Gag_p24, RT-like superfamily

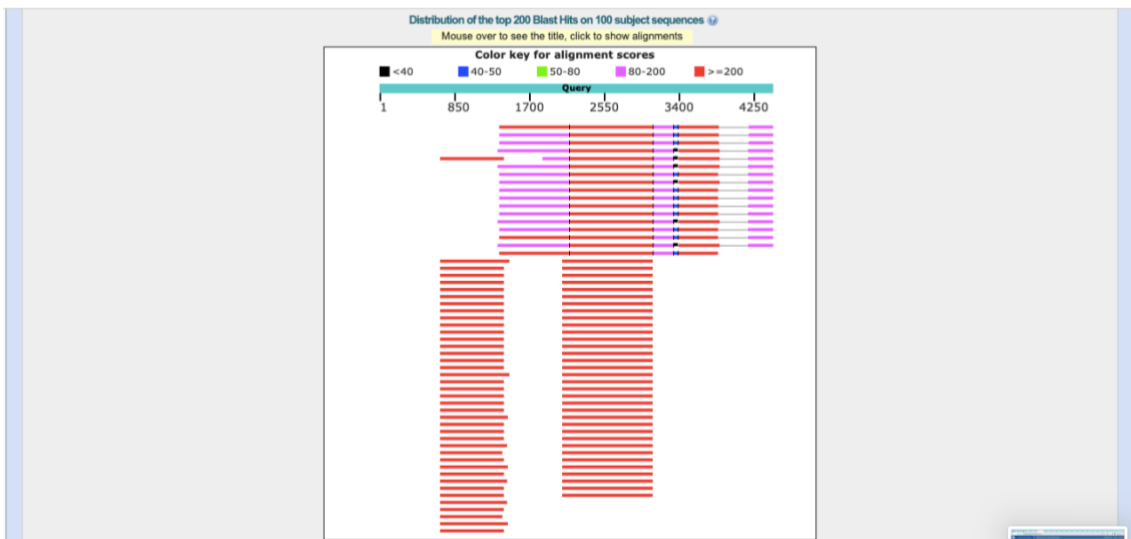
RF #2: RT-like superfamily

RF #3: Gag_p15

Specific hits: Gag_p15

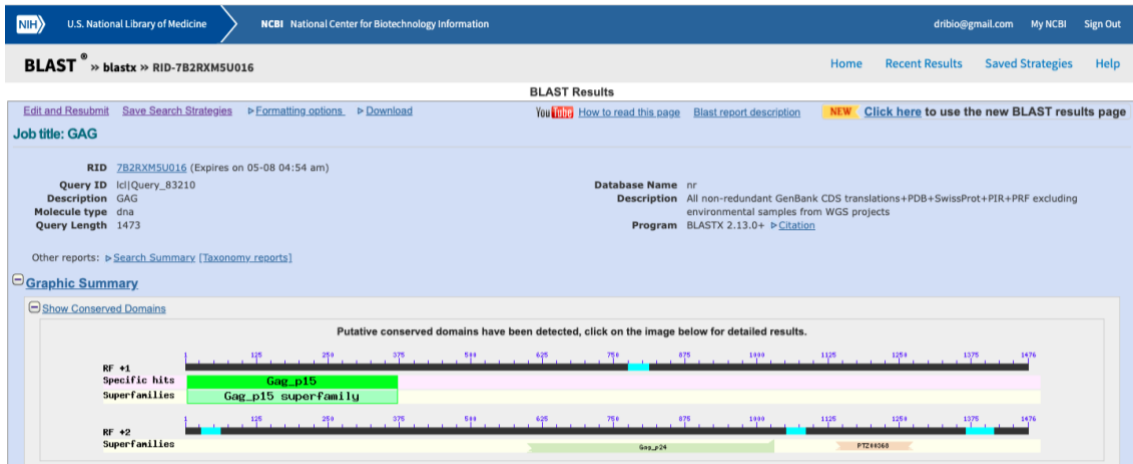
Super-families: Gag_p15 superfamily

B

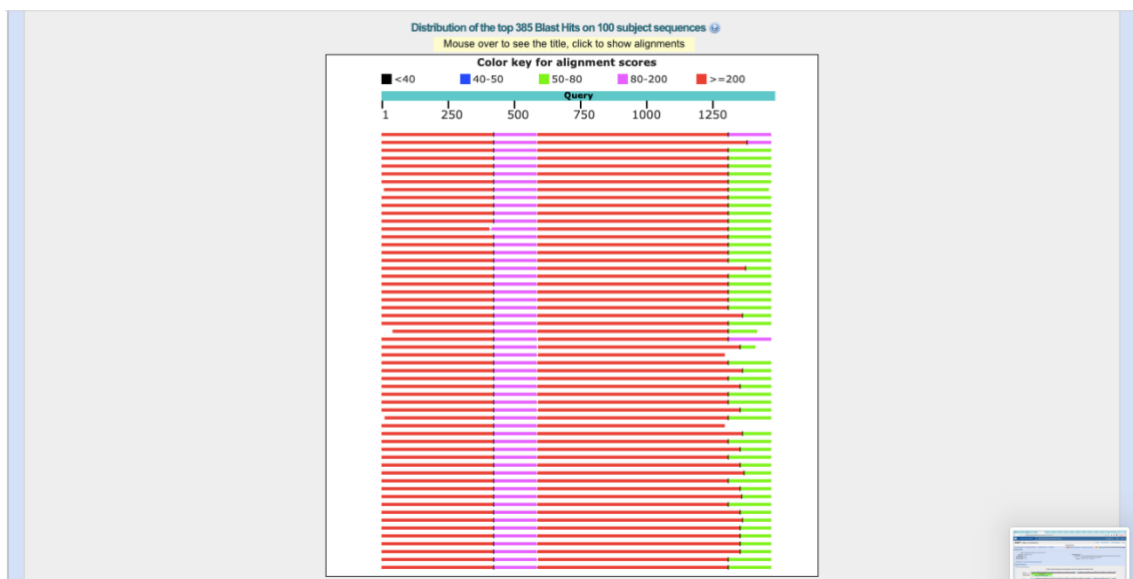


GGAAGAAATGAATGCATTTTCCGTTTTGGTGGTACCAGGACAAGCAGGACAAAAACATGAGCCCT
 ACTTGTTTTACTAGACAAGATGGCTGAAGATTGGGACAATAGGCATCCATTACCAAACCCACCCTT
 GGTGGCGCCGGCACAAGGACCTATTCCTATGACGGCAAGATTTATTAGAGGGTTAGGAGTTCCTAG
 AGAAGTGCAGATGGAACCAGCCTTTGATCAGTTCAGACAGACTTATAGACAGTGGATAAATTGAGG
 CGATGACAGAAGGAATAAAAATAATGATTGAAAGCCTAAAGCTCAAATATCAGGCAAGGCCCC
 AAAGAGCCTTATCCGGAATTTGTAGACAGATTATTGTCCCAAATAAAGAGTGAGGGACATCCCTCA
 GAGATAACAAAGTTTCTAACAGACACCTTAAACAATTCAGAATGCAATGAGGAATGTAGAAATGC
 TATGAGACATTTGAGGCCAGAAGATTCTTTAGAGGAAAAGTTATATGCTTGTAGGGATATAGGCAC
 GGTAACAACAAAAATGCTGTTACTTGCAAAGGCACTACAGACTGGACTGGCTGGTTCAATGAAGG
 GAGGTATTATAAAAGGAGGACCTCCAAGGGCAAACAACATGTTATAATTGTGGAAAGCCAGGA
 CATCTGTCTAGCCAGTGTAGAGCACCTAAGGTATGCTTTAAATGTAAGGAACCTGGACATTTCTCA
 AGGCCCTCCAAAAACGGGAAGAAGGGGGCTCAGGGGAGGCCCCGAAAGCAGACTTTCCTGTGA
 CAGCAGAGTTCCTCTGCAGAGAACAAGCAAAGGAACACAGTTCCAACACAGAACTTGTATCCAGA
 TTTAACTCAGATGAAACAGGAGTATTAGATTGATAACAATCGTCCCCCAAGATCCAGAGGGTCTCTT
 TCTGATCAGTTTGTGGGAGTAACATATAACTTAC

A



B



C

Descriptions

Sequences producing significant alignments:
 Select: All None Selected: 0
 Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	429	904	98%	0.0	89.21%	QIC50018.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	429	928	98%	0.0	83.71%	QIC50017.1
<input type="checkbox"/> gag polyprotein [Equine infectious anemia virus]	416	835	98%	0.0	86.72%	QFE31730.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	414	823	98%	0.0	85.06%	AHL29044.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	414	834	98%	0.0	85.48%	AMQ10495.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	412	830	98%	0.0	85.48%	AMQ10497.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	412	826	98%	0.0	85.06%	AMQ10500.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	412	816	97%	0.0	85.48%	AMQ10496.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	412	831	98%	0.0	84.23%	ABQ28726.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	411	825	98%	0.0	85.06%	AMQ10494.1
<input type="checkbox"/> gag polyprotein [Equine infectious anemia virus]	411	818	98%	0.0	85.89%	AF980123.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	410	827	98%	0.0	85.48%	AHL29041.1
<input type="checkbox"/> gag polyprotein [Equine infectious anemia virus]	410	811	98%	0.0	85.06%	AE980122.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	410	827	98%	0.0	85.06%	AMQ10498.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	410	826	98%	0.0	85.06%	AMQ10490.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	409	826	98%	0.0	85.06%	AMQ10491.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	409	825	98%	0.0	85.06%	AMQ10497.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	409	813	98%	0.0	79.85%	ADK38792.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	409	823	98%	0.0	85.06%	AMQ10498.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	409	821	98%	0.0	85.06%	ABQ28724.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	409	827	98%	0.0	85.06%	AMQ10493.1
<input type="checkbox"/> gag protein [Equine infectious anemia virus]	408	825	98%	0.0	85.06%	AMQ10492.1

Questions/comments

D

Download GenPept Graphics sort by: E value

gag protein [Equine infectious anemia virus]
 Sequence ID: QIC50018.1 Length: 487 Number of Matches: 4

Range 1: 193 to 433 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
429 bits(1103)	0.0	Compositional matrix adjust.	215/241(89%)	226/241(93%)	3/241(1%)	+2

```

Query 584 ALLVLDKHAEDNDHREPLNPFPLVAFAGQFIPHTARFINGLGVFREVQEPAFDQFROT 763
Sbjct 193 V..D...I..... 252

Query 764 YRQWIEANTDGIKIKIKFRAGNINQGFPEPFYFDVRLLSQIKSGHPIETKFLTDT 943
Sbjct 253 ..... 312

Query 944 LTIQMANECNHAMRHLPEDSLEELVACSDTGVGelllkalqTGLAGMKGGII 1123
Sbjct 313 .....M.F...A..... 372

Query 1124 KGGPRARQTCYKCKPGLHSQCHAFKVFCKECPGHFS---RPLQTRRGLRGPFES 1294
Sbjct 373 .....KCKA..P..RQ..AQ..R..QR 432

Query 1295 R 1297
Sbjct 433 Q 433
  
```

Range 2: 1 to 141 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
269 bits(688)	0.0	Compositional matrix adjust.	130/141(92%)	136/141(96%)	2/141(1%)	+1

```

Query 1 MDDLTVNFKALKLEKLVTVSGQKLSGNCWALSLVLFNDRTRFEKDWLKDVPILL 180
Sbjct 1 .....R.....T..... 69

Query 181 EDVDFQGLDLKELAFETRWALSAVNLGQINMGDQASPLKATYDERTDFQDFEP 360
Sbjct 61 .....V..R..R..... 120

Query 361 PEEFFINIGAGHRN--PLRP 417
Sbjct 121 ...Y.....PR..T. 141
  
```

Figura 24 A, B C e D - Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene gag, gerado com o método de sequenciamento didesoxi (Sanger F., 1980) dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 8 comparados contra sequências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.

>POL

```

AAAACGGGAAGAAGGGGGCTCAGGGGAGGCCCCGAAAGCAGACTTCCCTGTACAGCAGAGTTCC
TCTGCAGAGAACAAGCAAAGGAACACAGTTCCAACACAGAACTTGTATCCAGATTTAACTCAGAT
GAAACAGGAGTATTAGATTGATAACAATCGTCCCCCAAGATCCAGAGGGTCTCTTTCTGATCAGTTT
GTGGGAGTAACATATAACTTACAAAAGAGAGCTGTCTGTCTAGTTTTCTTTAATGATACTCCTCTGA
GTGTGTTACTGGATACAGGAGCAGATACTTCCATTCTTAACTATCGCACATTATAACAAGTTGAAA
TATAGACGGCAAAAATATCAAGGTACAGGAATTGTAGGGGTTGGAGGGAATGTAGAAACATTCTC
  
```

CACTCATGTGACAATAAAAAAGAAAGTGGATAGGCTTTTAAACAAGAATGTTAGTAGCAGATATTCC
AGTGACTATTCTGAGACGGGGGATCTAGCCTAAGAAGTGGGGTCCGATTGGTAATGGCACAACCTT
TCAAAAAGAAATAACTCCAAAAAAGATTAATAAAGGACGACTCAGCAGGGGCCAAAATTCCTCA
ATGGCCCCTTACTAAGGAAAAATTTGTTGAGGCCAAGGAAATAGTACAAAGACTATTATCAGAAG
GTAAGATATCAGAAGCTAGTAGTGAAAATCCGTATAATTCACCTCTGTGATAAGGAAAAAGTCTGG
AAAATGGAGATTAAGTCTTATACGAATTGAGGGCTTTAAATACAATTGTGAAATTGGAAGTCTGAGAT
ATCTAGAGCATTACCACATCCAGGAGGGTTAATTACAAATAACCATATGACAGTGCTAGATATTGG
AGATCCGTACCTCACTATTCCATTAGATCCAGAATTTAGATCCCAAAGAGCCTTTACTGTTCCGTCC
TTAAATCATCAGGAACAGATAAAAGATATGTAGTGGAACGATTACCGACACTGTTTCCTTTTGAGT
CCATACATATATCAAAAAGACACTGCAAGAAATATTACAGGCATTTAGAGAAAAGATATCCTGAAGT
ACAATTATATCAATATATGGATGATTTATTTATTGGGACTATCCGCCCTAAGGCACAACATAAAGA
ATTAATAAAGGAATTAAGGACTGTTCCCTTTAGAAAAGGGTTCTAATCCACCAGATGACAAAGTACA
GGAAGAAGCCCCTGACAATTGGCTTGATATCAGTTGAAACCAAGTCCCGGAAGGTACAGAAAA
TGCAGTTGGAGATGGTCCCTGAACACATAATTAATGATGTTCAAAAATTGATGGGAAATATAACAT
GGGTGCCTTTAAGGGTTCCTGGATTAAGTAAAGCAAAATAGCCGCTACCACTAAAGGCTGTTTAG
ATTTAAATCAAGAGTGACTCGGACCGAAGAAGCCAAAAAGAATTAGAGGAAAAATAATGAAAA
AATCAGAAATGTTTAGAGCCCAATCTTCTCATCCAAAAGAAGAAATAATATGTGAAATTGAGCT
TACAAAAAATTATGAAGCAATATATATGATAAAAACAGCCACAAGGAATATTGTGGCAGGAAAA
AGATCATGAAGGCAAATAAGGGGTGGTCTGCAGCAAAAAATTTAATGTTATGGATACAGGCCCTA
ACAATACTACAGCATGTGGCAACAGAAAGCATTACTAGAGTAGGAGTCTGTCCAAAATTTAAAGT
GCCTTTCACTAAAGAAATGGGTGGAGTATCCAACAGCCGGTATAACAATATATACTGATCTGGGAG
AAAGGAATGGAGAAGGAATAGCAGCCTATGTGACTAGTGACGGAAAAACTAAACAGAGACAGTT
AGGTCTTACTACTCATCAGGCTGCTGAAAGAATTGCTATACAAATGGCTTTGGAAGACATTAGGGA
TAAACAAGTAAATATAGTGACAGACAGTTATTATTGTTGGAAAAATATAACAGATTACAGAAGGA
TTAGGATTAGAGGGACCAGATAGCCCCTGGTGGCCTATAATATGATTTTCCCTTGTCTCCTGCTCTC
TGTAATATACAGGATAAAGATGCAGTATATTTTCGCATGGGTGCCAGGTCACAAGGGCATATATGGT
AATCAATTGGCAGATGATGCAACTAAAATAGTTCAAGAAATAATGATAGCTTATAAAGGAACACA
AATAAAGAGAAAAGAGATGAAGATGCAGGGTTTGATTTCTGCATTCATATGACATGACAATAA
AGGTTTTGGAGACAAAAATAATATCCACAGATGTAAGAATCAAGTGCCTCTTAATAGTTTTGGAT
GGGTCACTGGTAAATCATCAATGGCTAGGCCAGACCTCTTATCTAATGGAGGGATAATTGATGAAG
GATATACAGGGGAAATACAGGTAATATGCACCAATATTGGCAAAAAGTAATCTCAAGTTGTCTGAG
GGACAAAAGTTTTGCGCAATTTGTGAGTCTACAACATCACTTCACTTCATTATCTTTAGTCATTGCGT
CTAAATGGAATGCGTCTTAAAATTGGATAGCTTTAGACCTAGAAGGGATGCAAGTAAAGGTTGAG
AGCCATTACCCTCATCTGGTGTCTCAAAACCCATAAAAATAAATTCCTCTTTTCTTTGGCCTGGAC
ATAGAAAAGGAACCACTTTCTCTTTATAATGTAAACTCCATTAAACATATGCCAGAGAATTCAAGT
TTGAATCTTTGAAATAAAATCTCCAAAAAAGTATTAATAAATGATGGCAATAATGCTAGCTAAAT
GCCAATAAATAATCTACCATTGTTTTAAGTAAATAAGCACGATCATTGCACACAGATAATGGCA
CAAATTTATAGCTGACTCAGTACAAAATTTGCTGATTCTATCTGTCTCCTTACTCTGTGTTTTGTGA
TCCCTAAAAATAACACACACAACAGGGATACCAAAAAATAACACACACAACAGGGATACCTTATCA
CCCGAAAGTCAAGGTATAGTAGAAAAGAGCTAATAGAACATTAAGAAGAGAAAAATTCAAAGTCATA
GAGACAATACCCAGACATTAGAAGCGGCTTTRCACTTGCCCTCATTACTTGTAAACAAAGGGAGGG
AAAGTAAGGAGACCATGGAAGGACAAACACCATGGGAAGTATTTAGTGCCAGTGGATGACAAGAC
ATACATGCTGAATTATTATTACAGCAAGCAAAATCCTCTAAAAAATTTTGTCTTATAAAAATCCCTG
GTGAGTCTGACTGGAAAAACCATTAAGTATTGTGGAAGGGTGTGTTGCTGTAGTGGTCAATGA
TGAAGGAAAGGGGATCATTGCTGTGCCTCTGACCAGACCTGAATTGTTAATGAGGCCACATTGAGT
ATTGTTCCAGGCAGAGCCACCAGTCAACTTCCATTGTCAGCAGTGCCTCCCAAGATCCTTGGGGAT
TGACTACCTTACACATGACTCTTCATTAAGAAGAAGAATAAACAGAGGCCAGAAGGCTATTTCATCA
GGGGAGACAACCTCAGTACTTGTATAAGGTTTTGGTGTATGGGTTTATTTGGAAAGGGGGTAACAT
GGTCAGCATTGCGTTCTATGG

D

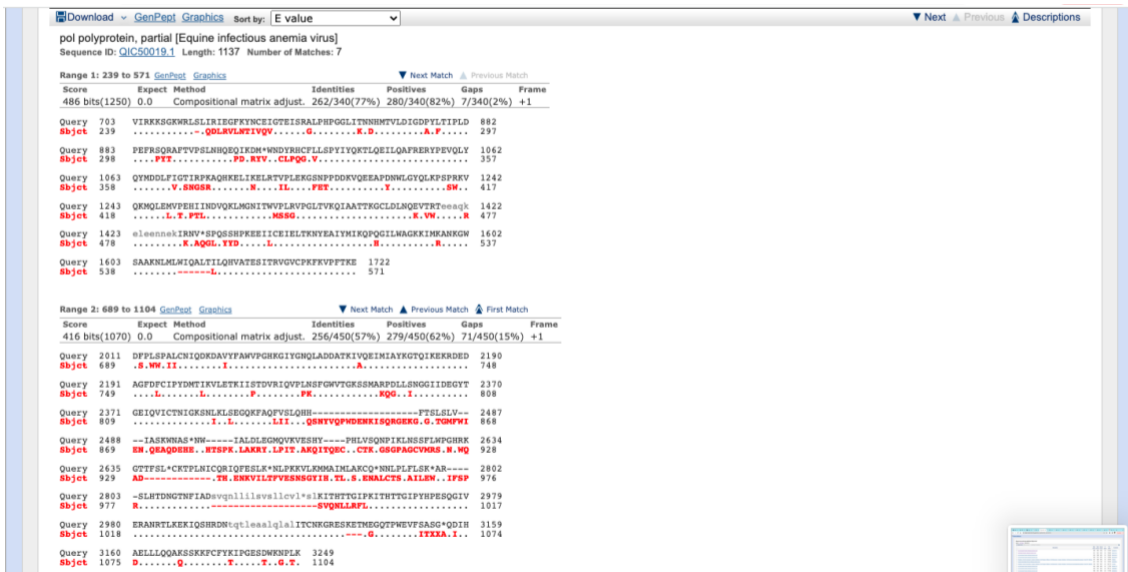
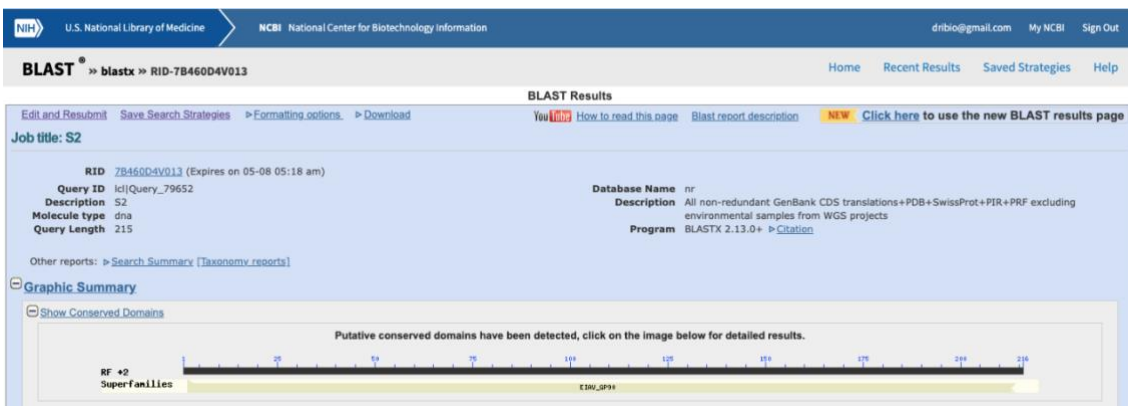


Figura 25 A, B C e D - Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene pol, gerado no sequenciamento sanger dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 8 comparados contra seqüências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.

>S2

CCTGAAAGAAGATCCAGAAGAAAAGGCAAGGAAGAGAAACAATGACTGGTGGGAAGATAGGTATG
TTCATGCTATGTTTGATGGGAACAACAGGAGGAATACTCTGGTGGTATGAAGGTGTGGCACATCCA
CGTTATATAGGATTAATACTGTTGGTGGGAAATTAGAAGAATCTGGGATGACTAGTGCTATAGAA
TGTGGGGTACTTTTCCTG

A



B



C

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> env protein [Equine infectious anemia virus]	154	154	99%	1e-41	100.00%	QIC50021.1
<input type="checkbox"/> env protein [Equine infectious anemia virus]	136	136	99%	5e-35	87.32%	QIC50013.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	7e-30	72.73%	AFP46189.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	7e-30	72.73%	AFP46185.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46201.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46187.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46191.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46199.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46213.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46341.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	8e-30	72.73%	AFP46209.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	9e-30	72.73%	AFP46217.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	119	119	92%	1e-29	72.73%	AFP46193.1
<input type="checkbox"/> envelope glycoprotein [Equine infectious anemia virus]	120	120	97%	2e-29	72.86%	QHD59416.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	118	118	92%	2e-29	72.73%	AFP46395.1
<input type="checkbox"/> env polyprotein [Equine infectious anemia virus]	120	120	99%	2e-29	78.87%	QBC73613.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	118	118	92%	3e-29	71.21%	AFP46403.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	118	118	92%	3e-29	71.2	
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	118	118	92%	3e-29	71.2	
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	118	118	92%	3e-29	71.2	
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	118	118	92%	3e-29	71.21%	AFP46407.1
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	117	117	92%	3e-29		
<input type="checkbox"/> envelope protein [Equine infectious anemia virus]	117	117	92%	4e-29		

Questions/comments

D

The screenshot displays three BLASTx alignment results. Each result includes a header with 'env protein [Equine infectious anemia virus]', a sequence ID, and a length. Below each header is a table with columns: Score, Expect, Method, Identities, Positives, Gaps, and Frame. The first alignment (QIC50021.1) shows 100% identity. The second (QIC50013.1) shows 87% identity. The third (AFP46189.1) shows 73% identity. Each alignment also includes a 'Query' and 'Sbjct' section with amino acid sequences and their positions.

Figura 26 A, B C e D - Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene s2, gerado no sequenciamento sanger dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 8 comparados contra sequências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.

>ENV

```

CAAGGAAGAGAAACAATGACTGGTGGGAAGATAGGTATGTTTCATGCTATGTTTGATGGGAACAACA
GGAGGAATACTCTGGTGGTATGAAGGTGTGGCACATCCACGTTATATAGGATTAATTACTGTTGGT
GGGAAATTAGAGAATCTGGGATGACTAGTGCTATAGAATGTTGGGGTACTTTTCTGGATGTAGA
CCATTTACTAACTATTTTAGCTACGAGACTAACAGA ACTATAACAGGAAACAATGACACTGCTACA
TTATTAGAGTCCTATAATAGNNTGTGTACAGATAGTGATCATTGTCAASACTATGAGTGC GAAAGG
GTCCGATTAATGGGAATTTTAGTGATAGAATAAGTGTGGAGGATAATAATAATAGCACAAATAA
TGATTTAGATAAAAACAACATGTACAGATAGTGATCATTGTCAAGAATATGAGTGTAGAAACGTAC
AACTGACTGGTAATGGGTTAAAAGTGAATATAAGATACAATACAGCACTTGATACAGCTTATTGGA
ATTTCAAATGGTTGGTATGTAATCAA ACTGAGGACTAAAAGACAATTCTTATTCCAGAAGAAGAAA
TGGTACAGAGTGACAATATGAATATAACAAATAAAAACAAGTCAGCAAGCATAAGCACAGTAGTAA
CCATTCGACCCCAAAAACATCTACGCTTTAATATGCAACAGACTGCACACTCATCATAACTAT
ATCAGCTCTCACAGACACGACCATTCCTCGCCGACCCAGATCAGAGAAACACAACAAGAAGACGCA
CAACACGACACGACGACACAGAGAAACGACACTACCAAAACACAACGACACACACTTCAACAGAC
CGCAGTCTGAGTAAAGACCATCGCCCCGACTTGGGCCCTAATGAATATAACGACACATGGGCA
AAAATAAAACATTGTCCAATGGACTTGTGTATGGGCTGCATCCTATTAGGTTATGTGTACAGCCA
CCATTTTTTCTGGTAAGAAAAGAAGATAATCATAGCCGCACACTTAGTAATTGTGGTCCACAAATA
TCATTAGGGATATTAGATAGCAATATATAAGATCAGTTTAAAGGCTGTTGTAAGGGAGGTTAACTGC
ACTGTGGCTAAAATAGTTTTTCA TTTTAATGACTATTCTGGACAGTTTATAAGTCCTATATTTTATCA
ATGTAATCTTAGCCTAACACCTTGT AATAGGACAGATTCACCAGTAAGTATTATCAGATATGATGA
GGACACTGTTGAATATTTGATAAGAAACACTGTTGAATATTTGATATGCAAGGCCACAGACTTCAC
TGAAAAGAGTCTCCATGTGGGCCAGAGTGTCAAAGAACCCTCCATGGAGAAAGAACTGGAGCCG
GTTCTTAGGCAATCTTCACTTCTGCCAGCCAGCCATAGCAAAAGACCGAACCACAGCTTCTGCT
TCTTGACTTCTGAAAGGTGACTTGTCTCTTGCCGGGCTTGTCTCCCTCTCTGCTGTTCTCTAAAGGG
AGTAAAACAATAATACAGATGCAGGTAATTT

```

A

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information dnbio@gmail.com My NCBI Sign Out

BLAST » blastx » RID-7BAK0P0X013 Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download YouTube How to read this page Blast report description NEW Click here to use the new BLAST results page

Job title: ENV

RID: 7BAK0P0X013 (Expires on 05-08 07:08 am)

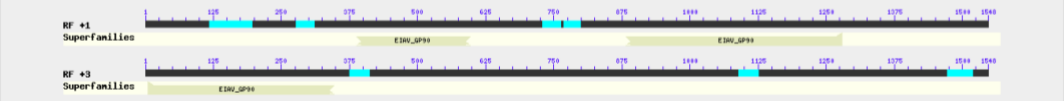
Query ID: Id|Query_44741 Database Name: nr
Description: ENV Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
Molecule type: dna Program: BLASTX 2.13.0+ Citation
Query Length: 1546

Other reports: Search Summary Taxonomy reports

Graphic Summary

Show Conserved Domains

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.



B



C

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	env protein [Equine infectious anemia virus]	261	530	61%	1e-73	100.00%	Q1C50021.1
<input type="checkbox"/>	env protein [Equine infectious anemia virus]	247	576	65%	1e-68	77.42%	Q1C50013.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	181	338	48%	2e-49	66.14%	ACS94954.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	180	341	48%	3e-49	66.14%	ACS94955.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	186	385	66%	6e-49	66.93%	AFP46409.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	186	384	66%	6e-49	66.93%	AFP46407.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	184	381	65%	2e-48	66.93%	AFP46359.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp90 [Equine infectious anemia virus]	180	344	49%	2e-48	63.36%	AAT02591.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein gp90 [Equine infectious anemia virus]	180	344	49%	2e-48	63.36%	AAS05407.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein gp90 [Equine infectious anemia virus]	179	342	49%	3e-48	63.36%	AAT02594.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	184	379	66%	3e-48	66.14%	AFP46405.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	177	338	48%	4e-48	65.35%	ACS94967.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	377	62%	4e-48	66.14%	AFP46371.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	379	66%	5e-48	66.14%	AFP46403.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	385	62%	6e-48	66.14%	AFP46367.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein gp90 [Equine infectious anemia virus]	179	347	49%	6e-48	62.41%	AAS05329.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	376	58%	7e-48	66.14%	AFP46407.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	383	62%	7e-48	66.14%	AFP46371.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	377	63%	7e-48	66.14%	AFP46371.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	375	62%	7e-48	66.14%	AFP46371.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	375	58%	7e-48	66.14%	QDB84432.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	183	377	64%	7e-48	66.14%	QDB84432.1

Questions/comments

D

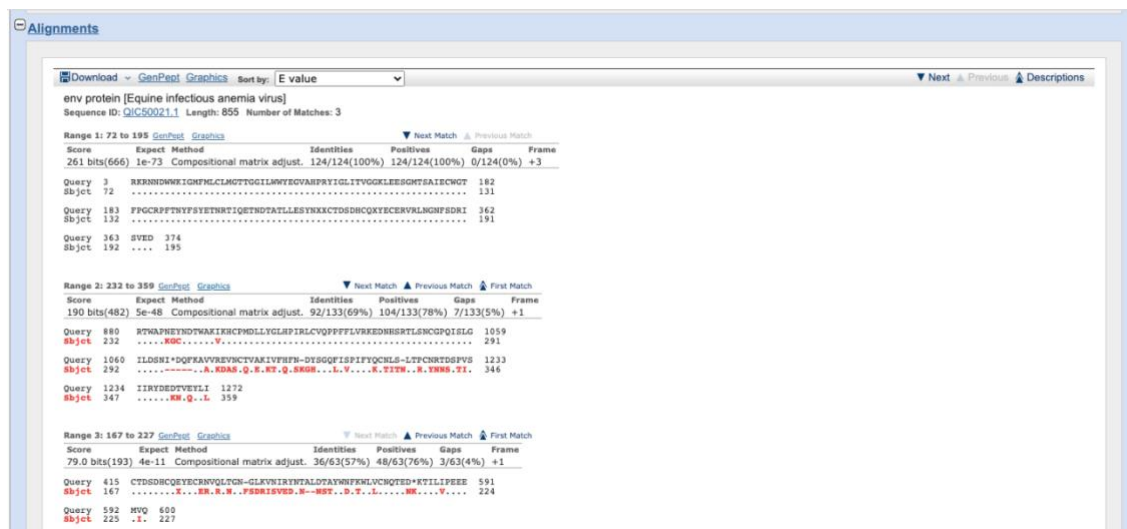


Figura 27 A, B C e D - Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene env, gerado no sequenciamento sanger dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 8 comparados contra seqüências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.

>REV

CAAGGAAGAGAAACAATGACTGGTGGGAAGATAGGTATGTTTCATGCTATGTTTGATGGGAACAACA
GGAGGAATACTCTGGTGGTATGAAGGTGTGGCACATCCACGTTATATAGGATTAATTACTGTTGGT
GGGAAATTAGAAGAATCTGGGATGACTAGTGCTATAGAATGTTGGGGTACTTTTCCTGGATGTAGA
CCATTTACTAATAATTTAGCTACGAGACTAACAGAATAACAGGAAACAATGACACTGCTACA
TTATTAGAGTCCATAATAGNNTGTGTACAGATAGTGATCATTGTCAASACTATGAGTGCGAAAGG
GTCCGATTAATGGGAATTTTAGTGATAGAATAAGTGTGGAGGATAATAATAATAGCACAAATAA
TGTATTTAGATAAAAACAACATGTACAGATAGTGATCATTGTCAAGAATATGAGTGTAGAAACGTAC
AACTGACTGGTAATGGGTTAAAAGTGAATATAAGATAACAATACAGCACTTGTACAGCTTATTGGA
ATTTCAAATGGTTGGTATGTAATCAAAGTGGACTAAAAGACAATTCTTATTCCAGAAGAAGAAA
TGGTACAGAGTGACAATATGAATATAACAATAAAAACAAGTCAGCAAGCATAAGCACAGTAGTAA
CCATTCGACCCCAAAAACATCTACGCTTTAATATGCAACCAGACTGCACTCACTCATCACTAAT
ATCACGTCTCACAGACACGACCATTCTCGCCGACCCAGATCAGAGAAACACAACAAGAAGACGCA
CAACACGCACCACGCGACACAGAGAAACGACACTACCAAACACAACGACACACACTTCAACAGAC
CGCAGTCTGAGTAAAGACCATCGCCCCGCACTTGGGCCCTAATGAATATAACGACACATGGGCA
AAAATAAAACATTGTCCAATGGACTTGTGTATGGGCTGCATCCTATTAGGTTATGTGTACAGCCA
CCATTTTTCTGGTAAGAAAAGAAGATAATCATAGCCGCACACTTAGTAATTGTGGTCCACAAATA
TCATTAGGGATATTAGATAGCAATATATAAGATCAGTTTAAAGGCTGTTGTAAGGGAGGTTAACTGC
ACTGTGGCTAAAATAGTTTTTCATTTAATGACTATTCTGGACAGTTTATAAGTCCTATATTTTATCA
ATGTAATCTTAGCCTAACACCTTGTAAATAGGACAGATTCACCAGTAAGTATTATCAGATATGATGA
GGACACTGTTGAATATTTGATAAGAAACACTGTTGAATATTTGATATGCAAGGCCACAGACTTCAC
TGAAAAGAGTCTCCATGTGGGCCAGAGTGTCAAAGAACCCTCCATGGAGAAAGAACTGGAGCCG
GTTCTTAGGCAATCTTCACTTCTGCCAGCCAGCCATAGCAAAAAGACCGAACCACAGCTTCTGCT
TCTTGACTTCTGAAAGGTGACTTGTCTCTTGGCGGGCTTGTCTCCCTCTCTGCTGTTCTCTAAAGGG
AGTAAAACAATAATACAGATGCAGGTAATTTTTCATGTGTAGTACAAACTTTTGGAAAAATAGGA
CAGGCACATATAGAGTTACCCAGAAACAATAAAAAGGATAAAGAGAGAACAATAACACACAGTATAA
TTGTTCAATAATAATCAGACAGAGTTAAAAGAATTGAAATTTGATAAAAAGGTTCCGGTATTACTCC
TATTCCTATTACTTCTCAGGCTAACACAGGATAATTAGATACAAAAGAGATTTTGGAAATATCAGC
AATAGTGGCGCAATAGTGGCTGCAACCGCTATTGCTGCTAGTGCTACCATGTCTTATATGCTTTG
ACTGAAGCAAGTAAAGTTAGTAATGCCATGAATCATACTTTGAGGTAGAGAATAACACAATCCA

TGCAACAGAGATGATAGAAAAACAAATGCATATATTATATGCAATGATTCTTCAGACCCATGCAGA
 TGCCAGTTACTAAAAGAAAGACAAAAAATAGATGAAACATTTAATTTGATAGGGTGTGTTGAAA
 GATCACATACATTCTGTCATACTGGACATCCATGGAATGATTCTTGGGGACAATTAATGACTCAA
 CACAATGGGGATGACTGGGTAAGCAAAATGGAAGATTTAAATCAAGAGATACTAACTACACTTCA
 TGGAGCTAGGAACAATTTGGCACAATCCATGATAACAT

A

The screenshot shows the NCBI BLAST interface. At the top, it identifies the user as 'dribio@gmail.com' and the search as 'BLAST » blastx » RID-7BB1DGMD01N'. The job title is 'REV'. The query details are: RID: 7BB1DGMD01N (Expires on 05-08 07:15 am), Query ID: lcl|Query_685991, Description: REV, Molecule type: dna, Query Length: 2209. The database used is 'nr' (non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF). The program used is 'BLASTX 2.13.0+'. A 'Graphic Summary' section is visible, showing 'Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.' It displays two reference frames (RF +1 and RF +3) with protein domain annotations like E18U_S994 and E18U_S993.

B



C

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	env protein [Equine infectious anemia virus]	369	909	68%	1e-111	100.00%	QIC50021.1
<input type="checkbox"/>	env protein [Equine infectious anemia virus]	303	887	72%	7e-87	82.14%	QIC50013.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	726	73%	7e-84	77.49%	ACY07746.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	725	75%	8e-84	77.49%	ACY07761.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	722	73%	8e-84	77.49%	ACY07747.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	722	73%	8e-84	77.49%	ACY07761.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	724	73%	9e-84	77.49%	ACY07737.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	730	73%	1e-83	77.49%	ACY07749.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	733	73%	1e-83	77.49%	ACY07765.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	721	73%	1e-83	77.49%	ACY07763.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	290	721	73%	3e-83	77.49%	ACY07742.1
<input type="checkbox"/>	envelope polyprotein [Equine infectious anemia virus]	287	719	74%	4e-83	75.63%	ADU02863.1
<input type="checkbox"/>	envelope polyprotein [Equine infectious anemia virus]	286	727	73%	6e-83	78.84%	ADU02851.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	287	717	75%	6e-83	76.96%	ACY07758.1
<input type="checkbox"/>	envelope glycoprotein [Equine infectious anemia virus]	287	724	72%	7e-83	77.37%	QHD58421.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein [Klebsiella pneumoniae]	285	416	43%	9e-83	76.56%	WP_159188235.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	286	718	73%	1e-82	76.84%	ACY07745.1
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	286	720	73%	1e-82	76.84%	
<input type="checkbox"/>	envelope polyprotein [Equine infectious anemia virus]	285	723	73%	1e-82	78.31%	
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	286	717	73%	1e-82	76.84%	
<input type="checkbox"/>	envelope protein [Equine infectious anemia virus]	286	721	75%	2e-82	75.92%	ACY07767.1
<input type="checkbox"/>	envelope polyprotein [Equine infectious anemia virus]	285	721	73%	2e-82	76.84%	

Questions/comments

D

Alignments

Download GenPept Graphics Sort by: E value

env protein [Equine infectious anemia virus]
Sequence ID: QIC50021.1 Length: 855 Number of Matches: 4

Range 1: 362 to 559 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
369 bits(946)	1e-111	Compositional matrix adjust.	198/198(100%)	198/198(100%)	0/198(0%)	+3
Query 1521	1700
Sbjct 362	421
Query 1701	1880
Sbjct 422	481
Query 1881	2060
Sbjct 482	541
Query 2061	2114
Sbjct 542	559

Range 2: 72 to 195 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
270 bits(691)	8e-75	Compositional matrix adjust.	124/124(100%)	124/124(100%)	0/124(0%)	+3
Query 3	182
Sbjct 72	131
Query 183	362
Sbjct 132	191
Query 363	374
Sbjct 192	195

Range 3: 232 to 359 GenPept Graphics

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
190 bits(482)	2e-46	Compositional matrix adjust.	92/133(69%)	104/133(78%)	7/133(5%)	+1
Query 880	1059
Sbjct 232	291
Query 1060	1233
Sbjct 292	346
Query 1234	1272
Sbjct 347	359

Figura 28 A, B C e D - Gráfico de identidade, lista de possíveis alinhamentos, gráfico de detecção de domínios conservados e alinhamento dos aminoácidos produzidos no Blastx do gene rev, gerado no sequenciamento sanger dos amplicons da reação de PCR usando os iniciadores propostos na tabela 8 comparados contra seqüências do genoma do EIAV depositadas no GenBank.

A partir dos dados gerados no NGS, concluímos que havia uma alta relação filogenética entre os fragmentos produzidos no sequenciamento quando comparadas às amostras brasileiras do EIAV POCONÉ-BRA1 (MN MN560970.1) e POCONÉ-BRA2 (MN560971.1). Com este achado foi possível desenhar iniciadores específicos para preencher as regiões não sequenciadas da amostra 122B, completando assim, por meio de sanger, o sequenciamento da amostra. Como esta amostra foi isolada de jumento fêmea, temos um resultado inédito já que não há, até o momento, nenhum registro de sequência completa do genoma do EIAV isolado de jumento disponível nos bancos de dados.

Esta nova sequência foi enviada ao Genbank depositada no banco de dado sob o código de referência ON615427.

É necessário informar e esclarecer que a técnica de sequenciamento com sondas enriquecidas do DNA proviral do EIAV constitui uma tarefa muito difícil, uma vez que o genoma dos equídeos passa a ser critério de confusão e porque muito dificilmente poderíamos sequenciar de forma completa o genoma viral integrado. Devemos, pois, pensar que os genes estejam endogenizados e apresentam diversos SNPs naturalmente adquiridos de eventos mutacionais nos ciclos celulares de replicação das células infectadas. Além disso o DNA proviral pode integrar-se nas regiões de hotspot do genoma do hospedeiro, o que aumentaria a chance de ocorrência de polimorfismos nas sequências do vírus. Por isso, é importante ressaltar que juntamente à análise do NGS e posteriormente ao sequenciamento sanger, foi necessário um estudo aprofundado dos genes e algumas regiões foram preditas a partir do alinhamento com as amostras brasileiras do EIAV. Isso representa bem a importância de aumentarmos nosso conhecimento acerca dos isolados brasileiros do vírus, mais uma vez lembrando que a clonalidade regional deste vírus ficou evidente neste estudo.

Vale ressaltar, portanto, que o sequenciamento massivo e paralelo dos isolados de EIAV teria maior chance de sucesso se realizado a partir do RNA viral obtido do sangue dos equídeos.

As análises do resultado da sequência completa da amostra 122B foi possível identificar os genes *tat*, *gag*, *pol*, *s2*, *env*, *rev* e a região UTR na posição 3`terminal. Foram descritas 7 ORFs (Figuras 23 (A, B, C e D); 24 (A, B, C e D); 25 (A, B, C e D); 26 (A, B, C e D); 27 (A, B, C e D) e 28 (A, B, C e D) do Anexo 3.

Para cada região gênica identificada nos alinhamentos, foi feito a análise de transcrição dos nucleotídeos (Blasn) e a análise do resultado da possível tradução desta sequência em mRNA (Blastx). Em todas as sequencias foram identificados motivos conservados de proteínas que

constituem o genoma do EIAV. E todas as análises de Blastx e Blastn identificaram percentual de identidade maior que 95% sempre relacionadas as amostras BRA1 e BRA2 dos isolados brasileiros de EIAV. Mais uma vez podemos estabelecer a relação filogenética entre as amostras brasileiras do EIAV e sua clonalidade regional, o que já foi descrito e discutido em diversos trabalhos

As ORFs 1 e 2 correspondem à região do gene gag com 1191 nucleotídeos e codificam 395 aminoácidos da poliproteína. Quando comparadas com as sequências mundiais, as sequências gag 122B apresentou identidade maior que 90% com as amostras BRA1 e BRA2. (Figuras 23 (A, B, C e D) e 24 (A, B, C e D)).

As ORFs 3 e 4 corresponde ao gene pol, que apresenta 888 nucleotídeos que codificam 374 aminoácidos. Comparadas às demais sequência disponíveis e usadas neste estudo a observamos identidade de 70 a 76% contra os isolados BRA1 e BRA2. (Figuras 25 (A, B, C e D) e 26 (A, B, C e D)).

As ORFs 5, 6 e 7 correspondem à sequência do gene env e apresenta 2061 nucleotídeos e 685 aminoácidos. Este gene apresentou similaridade de 77,12%, entre as sequências BRA1 e BRA2 e pelo menos 57,33% de identidade com outras amostras. ((Figura 28 (A, B, C e D)).

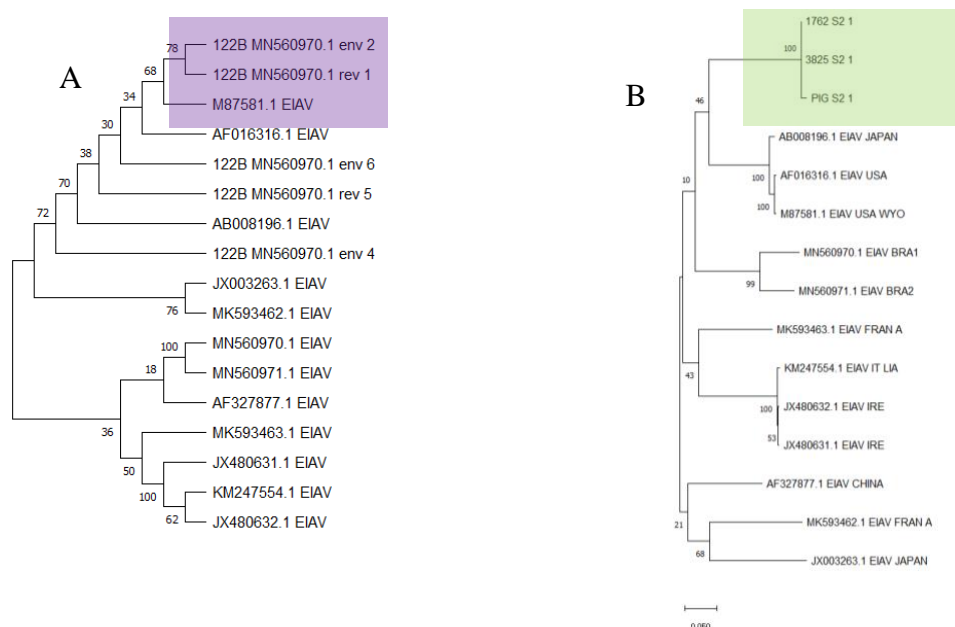
A sequência completa foi comparada às amostras de EIAV disponíveis em bancos de dados, e foi realizada a análise filogenética entre as sequências completas e seus genes como representado na figura 22 e discutidas a seguir.

5.5- RESULTADO DA ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS FRAGMENTES GERADOS PELO NGS DAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DE EIAV E DA COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE EIAV E A SEQUÊNCIA COMPLETA ON615427

A análise filogenética dos fragmentos dos genes sequenciados pelo NGS foi calculada pelo modelo Maximum Composite Likelihood com gamadistribuição (parâmetro de forma = 5). As árvores filogenéticas foram reconstruídas usando o método de Máxima Verossimilhança, modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura-Nei, considerando distribuição gama (5 categorias), e sítios invariáveis, implementado na versão MEGA versão 7.1 (Molecular

Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020). Para cada fragmento de genes gerado no NGS dos genes env, ver, pol, gag e S2 dos isolados 122B, C4, 1762, 3285, PIG, 62 e polêmica foi realizado o alinhamento com as mesmas sequências de cada gene dos isolados cujas sequências estão disponíveis em bancos de dados. As sequências usadas nesta fase do estudo foram Liaoning (AF327877); Irlanda (JX480631); Miyazaki-2011A (JX003263); Wyoming (AF033820); Poconé BRA1 (MN560970.1) e Poconé BRA2 (MN560971.1); França (KT764951.1); ITA DE (KM247554.1) e ITA SA (KM247555); UK (MH580897.1); CORNWALL (MH580898.1); V70 (AB008196.1); CL22 (M87581.1); EIAVUK (AF016316.1); BAUGARD (MK593462.1) e EC1 Gard (MK593463.1).

Os resultados desta análise estão descritos nas figuras 20 A, B, C, D e E.



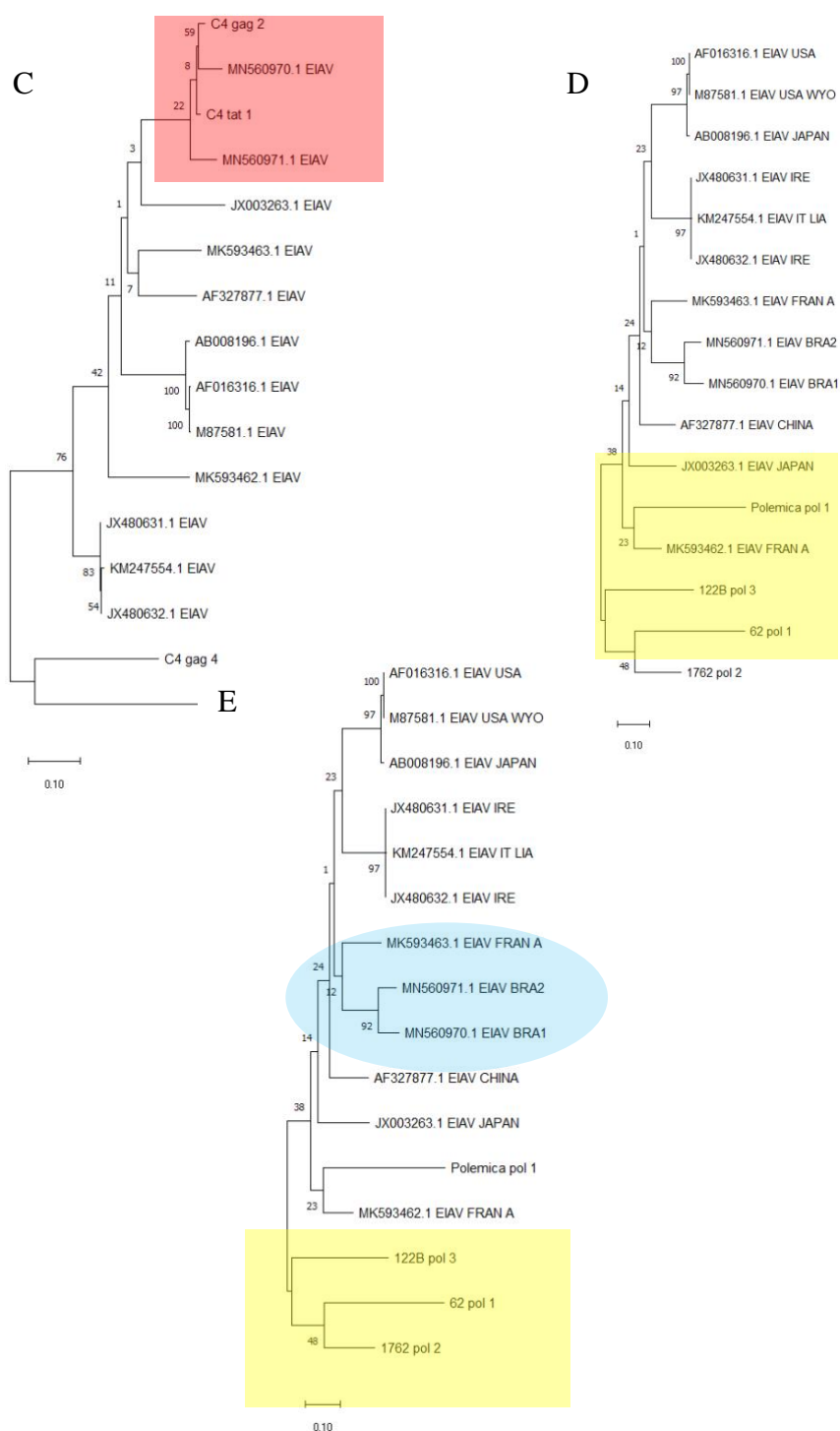


Figura 20 A, B, C e E – Árvores filogenéticas da relação entre os fragmentos dos genes do EIAV – genes rev, env, pol gar e s2 das amostras brasileiras 62, PIG, Polêmica, C4 1762 e 3825 obtidos a partir do NGS das amostras e as demais sequências dos genes disponíveis no GenBank. Os números de acesso do GenBank são: Liaoning (AF327877); Irlanda (JX480631); Miyazaki-2011A (JX003263); Wyoming (AF033820); Poconé BRA1 (MN560970.1) e Poconé BRA2 (MN560971.1); França (KT764951.1); ITA DE (KM247554.1) e ITA SA (KM247555); UK (MH580897.1); CORNWALL (MH580898.1); V70 (AB008196.1); CL22 (M87581.1); EIAVUK (AF016316.1); BAUGARD (MK593462.1) e EC1 Gard (MK593463.1).

Em A temos a demonstração da relação filogenética demonstrada entre os fragmentos dos genes env e rev do isolado 122B e os isolados brasileiros do EIAV (MN560970 e MN560971). A cor lilás foi usada para destacar essa relação. Em B, destacado em verde, observa-se a relação filogenética entre os fragmentos do gene S2 das amostras 62, 1762 e 3285 e o mesmo gene dos isolados brasileiros do vírus, bem como a aproximação com as amostras japonesas e americanas do EIAV. Na figura 20C, em destaque na cor vermelha, é possível observarmos a relação filogenética entre os fragmentos do gene gag e tat da amostra C4 e os isolados brasileiros do EIAV. Em D podemos observar a relação filogenética entre os fragmentos do gene pol dos isolados 122B, 62 Polêmica e 1762 com o mesmo gene de isolados franceses de EIAV. Essa relação está destacada em amarelo. Em E podemos observar a relação filogenética entre outros fragmentos do gene Pol referentes a outras regiões do mesmo gene e os isolados franceses do vírus. A relação filogenética entre os isolados brasileiros estão destacados em azul (relação entre os isolados brasileiros MN560971 e MN560970 e o isolado francês MK503463) e amarelo (relação filogenética entre os fragmentos dos isolados 122B, 62 e 1762 e o isolado francês MK50362).

A análise filogenética construída para comparação da sequência completa ON615427 com as demais sequências de EIAV indicadas acima foi construída pelo método neighbor joining com valores de bootstrap determinados ao longo de 1000 interações.

O resultado apresentado está apresentado na figura 21. O cálculo da distância genética entre os isolados cujos genomas foram analisados neste trabalho, estão apresentados na tabela 13 e foram realizados por meio do programa por meio do programa MEGA ((Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020) com os mesmos parâmetros usados na construção das árvores filogenéticas.

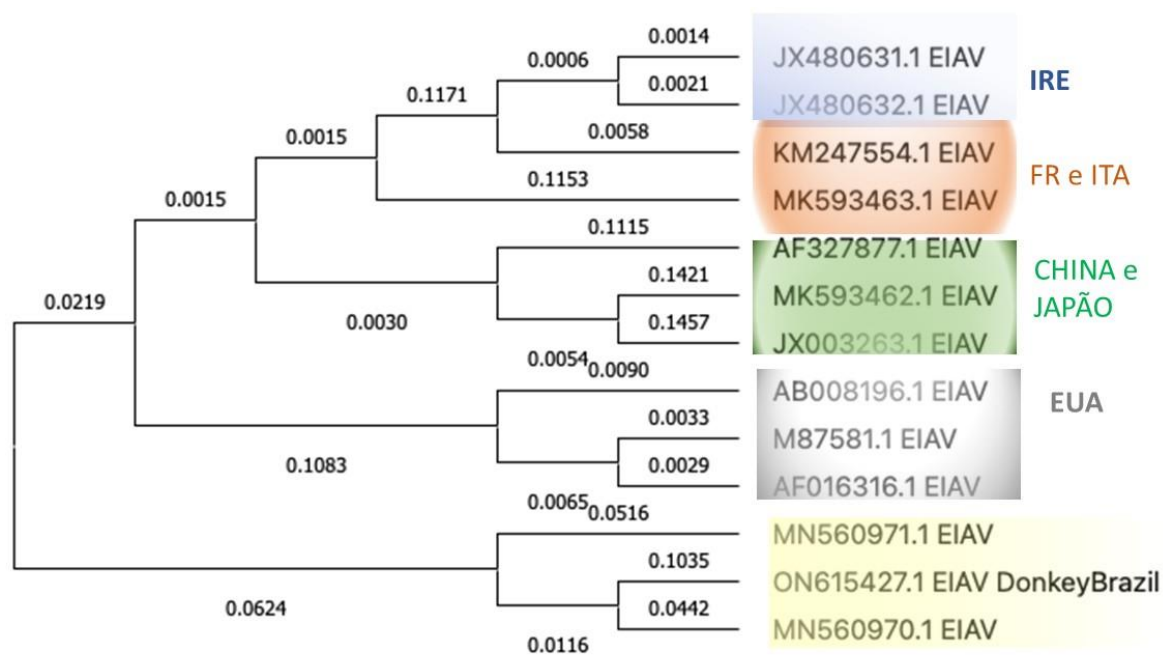


Figura 21 – Análise filogenética de sequências genômicas de EIAV. Uma árvore filogenética de sequências provirais completas alinhadas (ClustalW) foi construída pelo método neighbor joining com valores de bootstrap determinados ao longo de 1000 iterações. Os comprimentos dos ramos são proporcionais à distância existente entre as sequências. Os números de acesso do GenBank são: Liaoning (AF327877); Irlanda (JX480631 e JX480632); Miyazaki-2011A (JX003263); Wyoming (M87581.1); Poconé BRA1 (MN560970.1) e Poconé BRA2 (MN560971.1); França (MK593463.1 e MK593462.1); ITA DE (KM247554.1); Japão (AB008196.1); EIAVuk (AF016316.1).

Tabela12: Resultado da análise da distância genética entre o isolado ON615427 e as sequências disponíveis no GenBank.

	X80448	JX003263	MH580898	AF327877	ON615427	MN560971	MN560970	AB008196	AF016316	EIACGIP	AF033820	JX480631	KM247555	KM247554	MK593462	MK593463	KT764951
X80448		0.486	0.458	0.462	0.454	0.405	0.401	0.396	0.381	0.386	0.381	0.415	0.415	0.415	0.476	0.450	0.466
JX003263	0.486		0.291	0.265	0.357	0.280	0.281	0.274	0.273	0.273	0.274	0.286	0.285	0.287	0.287	0.277	0.234
MH580898	0.458	0.291		0.254	0.327	0.246	0.252	0.258	0.254	0.255	0.255	0.256	0.256	0.258	0.281	0.243	0.241
AF327877	0.462	0.265	0.254		0.323	0.249	0.258	0.239	0.240	0.239	0.242	0.237	0.237	0.238	0.266	0.233	0.220
ON615427	0.454	0.357	0.327	0.323		0.162	0.148	0.296	0.293	0.294	0.293	0.319	0.319	0.322	0.355	0.311	0.234
MN560971	0.405	0.280	0.246	0.249	0.162		0.113	0.259	0.260	0.261	0.261	0.258	0.260	0.261	0.282	0.248	0.221
MN560970	0.401	0.281	0.252	0.258	0.148	0.113		0.260	0.260	0.261	0.261	0.262	0.266	0.268	0.289	0.252	0.212
AB008196	0.396	0.274	0.258	0.239	0.296	0.259	0.260		0.019	0.018	0.019	0.239	0.242	0.243	0.270	0.238	0.222
AF016316	0.381	0.273	0.254	0.240	0.293	0.260	0.260	0.019		0.006	0.005	0.240	0.240	0.241	0.275	0.240	0.220
EIACGIP	0.386	0.273	0.255	0.239	0.294	0.261	0.261	0.018	0.006		0.003	0.239	0.242	0.243	0.274	0.241	0.220
AF033820	0.381	0.274	0.255	0.242	0.293	0.261	0.261	0.019	0.005	0.003		0.242	0.242	0.243	0.276	0.244	0.220
JX480631	0.415	0.286	0.256	0.237	0.319	0.258	0.262	0.239	0.240	0.239	0.242		0.008	0.008	0.271	0.238	0.220
KM247555	0.415	0.285	0.256	0.237	0.319	0.260	0.266	0.242	0.240	0.242	0.242	0.008		0.007	0.271	0.238	0.225
KM247554	0.415	0.287	0.258	0.238	0.322	0.261	0.268	0.243	0.241	0.243	0.243	0.008	0.007		0.273	0.240	0.221
MK593462	0.476	0.287	0.281	0.266	0.355	0.282	0.289	0.270	0.275	0.274	0.276	0.271	0.271	0.273		0.267	0.214
MK593463	0.450	0.277	0.243	0.233	0.311	0.248	0.252	0.238	0.240	0.241	0.244	0.238	0.238	0.240	0.267		0.030
KT764951	0.466	0.234	0.241	0.220	0.234	0.221	0.212	0.222	0.220	0.220	0.220	0.220	0.225	0.221	0.214	0.030	

As árvores filogenéticas foram construídas com base no alinhamento de cada gene analisado: gag, env e pol, bem como a sequência completa em relação as sequências disponíveis no GenBank. Em todas as análises filogenéticas foi possível verificar a presença de clados bem delimitados das sequências virais de cada região (Europa, China, Japão, Estados Unidos da América e Brasil). As sequências da China, Japão, Estados Unidos e Europa (Itália e Irlanda) compartilham aproximadamente 80% de identidade, formando quatro clados separados, sugerindo uma evolução independente de um ancestral comum (Capomaccio et al., 2012a; Issel et al., 2014; Cappelli et al., 2017).

A partir da análise da árvore filogenética da árvore construída a partir dos fragmentos dos genes do EIAV pelo NGS observamos que exceto pelos fragmentos denominados env 6 e rev 5 do isolado 122B que se encontram no mesmo clado das amostras V70, EIAVUK e CL22, todos os outros fragmentos encontram-se no mesmo clado das amostras brasileiras do EIAV (BRA1 e BRA2). Esse resultado corrobora os resultados de trabalhos anteriores sobre a relação filogenética entre os isolados brasileiros de EIAV (Cursino et al., 2019; Malossi et al., 2021).

A análise da árvore filogenética construída a partir da sequência 122B completa (Genbank: ON615427) e as demais sequências disponíveis verificamos, mais uma vez, a presença de clados bem definidos e a amostra ON615427 agrupou-se com as amostras brasileiras do vírus e estão distantes filogeneticamente das demais amostras. Embora a amostra tenha sido isolada de um jumento, ainda sim houve alta taxa de identidade e similaridade entre os isolados. Além disso, foi possível inferir que isolado ON615427 está mais próximo filogeneticamente do isolado BRA1 (número de referência no GenBank MN560970.1). Os resultados obtidos pelo cálculo da distância genética a partir da construção da árvore filogenética mostra uma aproximação entre os isolados brasileiros do vírus, seguida de uma maior distância observada entre os isolados brasileiros e isolados Miyazaki-2011A (GenBank accession number JX003263) (Dong et al., 2013).

Todos os resultados obtidos pelas análises filogenéticas corroboram os resultados de trabalhos anteriores que mostram a clonalidade regional do EIAV (Cook et al., 2019; Dias Costa et al., 2021; Deshiere et al., 2019; Cursino et al., 2018).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de movimentarem uma indústria milionária em todo o mundo e de representarem força de trabalho em muitas regiões, os equinos, muares e asininos continuam sujeitos a doenças negligenciadas como, por exemplo, a Anemia Infecciosa Equina (AIE). As dificuldades encontradas no desenvolvimento de testes moleculares e formas de prevenção e tratamento são reais, uma vez que o alto nível de mutações desse vírus ocasionou o surgimento de populações complexas de vírus geneticamente relacionados, mas não idênticos (quasispecies) e distintas em relação à região em que estão ou foram isoladas. As informações genéticas, ainda bem escassas de sobre os isolados brasileiro do EIAV tornam nossa tarefa ainda mais difícil. Mas, com este trabalho conseguimos contribuir com informações genéticas de uma amostra de EIAV isolada de um jumento – uma amostra inédita nos bancos de dados atuais. Conseguimos ainda por meio do NGS de amostras brasileiras do vírus detectar uma região muito conservada que compartilha alta similaridade e identidade entre todas as amostras até então listadas no GenBank. Assim foi possível desenhar um ensaio de qPCR usando SybrGreen que apresentou alto poder de detecção da Anemia Infecciosa Equina quando comparada aos dados dos testes sorológicos (IDGA e Elisa) realizados com essas amostras. Esperamos assim contribuir para a realização de um diagnóstico mais assertivo da AIE e para o controle disseminação da doença no nosso país, já que a detecção do agente viral poderia ocorrer ainda nos primeiros momentos da infecção. Esses resultados devem ainda contribuir para o desenvolvimento de uma futura vacina ou mesmo a na detecção de alvos moleculares que poderiam ser usados em tratamentos direcionados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo*, v.58, p.141-148, 2006.

APPLIED BIOSYSTEMS, User Bulletin #2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Disponível em: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf. Acesso em: julho de 2015.

ARAGUAIA, M. Portal da Educação. Disponível em <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/burro.htm>. Acesso em janeiro de 2022.

BOLFA, P. F.; LEROUX, C.; PINTEA, A. et al. Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *Vet*, v.192, n.3, p.449–54, 2012.

BOLFA, P. F.; NOLF, M.; CADORE, J. L. et al. Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Vet Res*, v. 44, n.113, 2013.

BOLFA, P.; BARBUCEANU, F. LEAU, S.-E et al. Equine infectious anaemia in Europe: Time to reexamine the efficacy of monitoring and control protocols *Equine Veterinary Journal*, p. 1-3, 2015.

BORGES, A. M.; SILVA, L. G.; NOGUEIRA, M. F. et al. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Pocone municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in veterinary science*, 95(1):76-81, 2013.

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

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

BRINDLEY, M. A.; ZHANG, B.; MONTELARO, R. C.; MAURY, M. Na Equine infectious anemia virus variant superinfects cells through novel receptor interactions. *J. Virol*, v. 82, p. 9425 – 9432, 2008.

BUCHFINK, B., Xie, C., Huson, D.H., Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, v.12, p. 49-50, 2015

BURDEN, F.; THIEMANN, A. Donkeys are different. *J. Equine Vet. Sci.* **2015**, 35, 376–382.

MATTHEWS, N.; VAN LOON, J.P.A.M. Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. *Equine Vet. Educ.* **2013**, 25, 47–51.

FAO. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> (accessed on 11 May 2020).

CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COOK, R.F. et al. Molecular detection, Epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of Equine Infectious Anemia Virus. *L. Clin. Microbiol.* V.49, n.1, p.27-33, 2011.

CAPPELLI 2017

CARPENTER, S.; CHESEBRO, B. Change in host cell tropism associated with “in vitro” replication of equine infectious anemia virus, *J. Virol.* v.63, p.2492–2496, 1989.

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

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; NUSBAUM S. R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *American Journal of Veterinary Research*, v.33, n.1, p.11-18, 1972.

COOK, R. F.; BERGER, S. L.; RUSHLOW, K. E. et al. Enhanced Sensitivity to Neutralizing Antibodies in a Variant of Equine Infectious Anemia Virus Is Linked to Amino Acid Substitutions in the Surface Unit Envelope Glycoprotein. *J. of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1493 – 1499, 1995.

COOK, R. F.; LEROUX, C.; COOK, S. J. et al. Development and Characterization of an “In Vivo” Pathogenic Molecular Clone of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*. v.72, n.2, p.1383-1393. 1998.

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

COOK, R. F.; COOK, S. J.; Li, F. et al. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol Meth.*; v.105, p.171-179, 2002.

COOK, R. F.; COOK, S. J.; BERGER, S. L. et al. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virology*, n. 313, p. 588-603, 2003.

COOK, R. F.; COOK S. J.; ISSEL, C. J. Infectious diseases of the horse: Equine Infectious Anemia. In. MAIR, T.S. and HUTCHINSON R.E. *Eq. Vet. J. Cambridgeshire*, p. 56-70, 2009.
COOK, R. F.; LEROUX C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Vet. Microbiol.* v.167 n. 1-2, p.181-204, 2013.

COSTA, L. R.; SANTOS, I. K.; ISSEL, C. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha production and disease severity after immunization with enriched major core protein (p26) and/ or infection with equine infectious anemia virus. *Vet Immunol Immunopathol*, v.57, n. 1–2, p.33–47, 1997.

COVALEDA, L.; FULLER, F. J.; PAYNE, S. L. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine response in infected macrophages. *Virology*, v. 397, p. 217 – 223, 2010.

CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious, anemia virus infection and immunity. *Viruses*, v. 5, n. 12, p. 2963–2976, 2013.

CRAIGO, J. K.; DURKIN, S.; STURGEON, T. J. et al. Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. *Vaccine*, v.25, n.5, p.834–45, 2007.

CULLINANE, A.; QUINLIVAN, M.; NELLY, M. et al. Diagnosis of equine infectious anemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet. Rec.*; v.161, p. 647-652, 2007.

DESROSIERS, R. C. Nonhuman lentiviruses. In.: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2215, 2007.

DONG, J. B.; ZHU, W, COOK, R. F. et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch. Virol.*; v.157, n.11, p.2105-2111, 2012.

DONG, J.B., ZHU, W., COOK, F.R., GOTO, Y., HORII, Y. AND HAGA, T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. *J. Gen. Virol.* 94 (PT 2), 360-365 (2013)

FIDALGO-CARVALHO, I.; CRAIGO, J.; BARNES, S. et al. Characterization of an equine macrophage cell line: application to studies of eiaV infection. *Vet Microbiol.*, v.14; n. 136 (1-2), p.8–19, 2009.

FOIL, L. D; ADAMS, W. V; MCMANUS, J. M.; ISSEL, C. J. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 24(6):613-616, 1987.

HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; LICHTENSTEIN, D. L. et al. Maturation of the Cellular Anemia Virus Is a Complex and Lengthy Process. *Journal of Virology*. v.71, n.5, p.3840-3852, 1997.

HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; FALO, L. D. et al. A Particulate Viral Protein Vaccine Reduces Viral Load and Delays Progression to Disease in Immunized Ponies Challenged with Equine Infectious Anemia Virus. *Virology*. n.254, p.37-49, 1999.

HAMMOND, S. A.; RAABE, M. L.; ISSEL, C. J. et al. Evaluation of antibody Parameters as Potential Correlates of Protection or Enhancement by Experimental Vaccines to Equine Infectious Anemia Virus. *Virology*. n.262, p.416-430. 1999.

HAMMOND, S. A.; LI, F.; MCKEON, B.M. et al. Immune Responses and Viral Replication in Long-Term Inapparent Carrier Ponies Inoculated with Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 5968-5981, 2000.

HARROLD, S. M.; COOK, S.; COOK, F. et al. Tissue Sites of Persistent Infection and active Replication of Equine Infectious Anemia Virus during Acute Disease and Asymptomatic Infection in Experimentally Infected Equids. *Journal of Virology*, v.74, n.7, p. 3112-3121, 2000.

HINES, R.; MAURY, W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus, *J. Virol. Methods* v.95, p.47–56, 2001.

HUANG, X. and MADAN, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**, 868-877.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, v. 6, p. 279 – 284, 2005.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em <https://ictv.global/>. Último acesso em setembro de 2022.

IBEqui - Instituto Brasileiro de Equideocultura , 2022. Disponível em <https://ibequi.com>. Último acesso em 06 de setembro de 2022.

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

ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V. J. Detection of equine infectious anemia virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, n.3, p. 276-278, 1982.

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

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

ISSEL, C. J.; COOK, S. J.; COOK, R. F. et al. Optimal paradigms for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Eq. Vet. Sci.*; n.19, v.11, p.728-732, 1999.

ISSEL, C. J.; SCICLUNA, M. T.; COOK, S. J. et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Rec.*; v. 172 n.8 210, 2012.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; MEALEY, R. H. et al. Equine Infectious Anemia in 2014: Live with it or eradicate it? *Vet Clin Equine*, v.30, p.561-577, 2014.

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

KONO, Y.; KOBAYASHI, K. Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* v.10, p.106–112, 1970.

KONO, Y.; YOSHINO, T. Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures, *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo) 14, 155–162, 1974.

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FURUNAGA, Y. et al. Recrudescence of Equine Infectious Anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*; v.16, p. 8-15, 1976.

KOONIN, E.V., DOLJA, V.V., KUPROVIC, M., VARSANI, A., WOLF, Y.I., YUTIN, N., ZERBINI, F.M., KUHN, J.H., Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol Mol Biol Rev.* 84(2): e00061-19, 2020.

LEROUX, C.; CADORE, J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary research.* v. 35, n.4, p.485-512, 2004.

LI, F.; LEROUX, C.; CRAIGO, J. K. et al. The S2 gene equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. *Journal of Virology*, v. 74, n.1, p. 573-579, 2000.

LI, F.; PUFFER, B.A.; MONTELARO, R. The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus Is Dispensable for Viral Replication “In Vitro”. *Journal of Virology.* v.72, n.10. 1998.

LIN, Y. Z.; CAO, X. Z.; LI, L. et al. The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression. And apoptosis in macrophages. *Virus Research*, v. 160, p. 274 – 282, 2011.

LIN, Y.Z.; YANG, F.; ZHANG, S.Q. et al. The soluble form of the EIAV receptor encoded by an alternative splicing variant inhibits EIAV infection of target cells. *Plos one.* v.8, n.11, 2013.

LIU, Q.; MA, J.; WANG, X. F. et al. Infection with equine infectious anemia virus vaccine strain EIAV DLV121 causes no visible histopathological lesions in target organs in association with restricted viral replication and unique cytokine response. *Vet. Immunol. And Immunopathol.*; v. 170, p. 30 – 40, 2016.

LIU, Q.; WANG, X. F.; MA, J. et al. Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Integration in the Horse Genome. *Viruses*, v. 7, p. 3241 – 3260, 2015.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J. et al. Regulation of macrophage activation. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 60, 2334–2346, 2003.

MA, J.; WANG, S. S.; LIN, Y. et al. An attenuated EIAV strain and its molecular clone strain differentially induce the expression of Toll-like receptors and type-I interferons in equine monocyte-derived macrophages. *Vet. Microbiol.*; v. 166, p. 263- 269, 2013.

MALOSSI, C.D., FIORATTI, E.G., CARDOSO, J.F., MAGRO, A.J., KROON, E.G., AGUIAR, D.M., BORGES, A.M.C.M., NOGUEIRA, M.F., ULLMANN, L.S. ARAUJO, J.P. JR. High Genomic Variability in Equine Infectious Anemia Virus Obtained from Naturally Infected Horses in Pantanal, Brazil: An Endemic Region Case. *Viruses* 12 (2), E207 (2020)

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. *Journal of Biomedical Science*. n.5, p.11-23. 1998. (a)
- MAURY, W.; OAKS, J. L.; BRADLEY, S. Equine Endothelial Cells Support Productive Infection of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*. v.72, n.11, p.9291-9297. 1998. (b)
- 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.
- MEALEY, R. H.; SHARIF, A.; ELLIS, S. A. et al. Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD81 lymphocytes in equine infectious anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Virology*; v.339, n.1, p.110–26, 2005.
- MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.). *The retroviridae*. New York: Plenum Press, v.2, Cap.5, p.257-359, 1993.
- MONTELARO, R. C.; COLE, K. S.; HAMMOND, S. A. Maturation of Immune Responses to Lentivirus Infection: Implications for AIDS Vaccine Development. *AIDS Research and Human Retroviruses*. v.14, s.3, 1998.
- MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus, *J. Biol. Chem.*; v.259, p.10539–10544, 1984.
- NAGARAJAN, M. M.; Simard, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, v.94 n.1-2p. 97-109, 2001.
- OAKS, J. L.; MCGUIRE, T. C.; ULIBARRI, C. et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection, *J. Virol*. v.72, p.7263–7269, 1998.
- OAKS, J. L.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T. B.; Endothelial cell infection “in vivo” by equine infectious anaemia virus, *J. Gen. Virol*. v.80, p.2393– 2397, 1999.
- PERRYMAN, L. E.; MCGUIRE, T. C.; BANKS, K. L. et al. Decreased C3 levels in a chronic virus infection: equine infectious anemia. *J Immunol*, v.106, n.4, p.1074–8, 1971.
- 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, n.8, p.3073–6, 1988.
- PETROPOULOS, C.J. Appendix 2: Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps. (in) Coffin, J.M. (Ed.); *RETROVIRUSES: 757*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA (1997)

QUINLIVAN, M.; COOK, R. F.; CULLINANE, A. 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. *The Veterinary record*, p.160, n.18, p.611-618, 2007.

QUINLIVAN, M., COOK, F., KENNA, R., CALLINAN, J.J. and CULLINANE, A. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. *J. Gen. Virol.* 94 (PT 3), 612-622 (2013)

REIS, J. K. P.; DINIZ, R. S.; HADDAD, J. P. et al. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *J. Virol Meth.*; v. 180, n. 1-2, p. 62-67, 2012.

REIS, J. K. P.; COOK, R. F. Anemia Infecciosa Equina: um problema ainda a ser resolvido. *Revista Vez em Minas. Ano XXIII*, v.23, Out./Nov./Dez.; 2014.

RICOTTI, S., GARCIA, M.I., VEAUTE, C., BAILAT, LUCCA, E., COOK, S.J., SOUTULLO, A., Serologically silente, occult equine infectious anemia vírus (EIAV) infections in horses. *Vet. Microbiology.* 2016, 187, 41-49.

RWAMBO, P. M.; ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V. et al. Equine infectious anemia virus (EIAV) humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Arch Virol*, v.111, n. 3-4, p.199-212, 1990.

RWAMBO, P. M.; ISSEL; C. J.; HUSSAIN, K. A. et al. "In vitro" isolation of a neutralization escape mutant of equine infectious anemia virus (EIAV). *Arch Virol*, v. 111(3-4), 275-80, 1990.

SCICLUNA, M. T.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F. et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Vet. Microbiol.* v. 165, n. 1-2, p.123-34, 2013.

STECHE G, TAMURA K, and KUMAR S (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology a Evolution* (<https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>).

SCOTT, V. L.; BOUDREAUX, C. E. B. S.; LOCKERTT, N. N. M. S. et al. Cytokine Dysregulation in Early- and Late-Term Placentas from Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-infected Cats. *Am. J. Reprod. Immunol.*; v. 65, n. 5, p. 480 – 491, 2011.

SELLON, D.C. Equine infectious anemia. *Vet. Clin. N. Am. Equine Practice.*; v.9, n.2, p.321-336, 1993.

SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res.* v.32, 111, 1993.

SELLON, D.C.; RUSSELL, K.E.; MONROE, V.L.; et al. Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. *Res.Vet. Sci.* v.66, 77, 1998.

SHEN, R.X. Development and use of an equine infectious anemia Donkey leucocyte attenuated vaccine. *Proceedings of the international symposium on immunity of equine infectious anemia*, 1983.

SHEN, R.; WANG, Z. Development and use of an equine infectious anemia donkey leukocyte attenuated vaccine. EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives. American Quarter Horse Association, Amarillo, pp 135–148, 1985.

SILVA, C. F.; PEQUENO, N. F.; CLEMENTINO, I. J. et al. Frequency of equine infectious anemia in equine in the states of Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará, Northeastern Brazil during 2010. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, n.1, p.12-17, 2013.

SIMON, V.; BLOCH, N.; LANDAU, N. R. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol.*; v. 16, n. 6, p. 546 – 553, 2015.

TORIBIO, R.E. Dear Donkey and Mule: You Deserve More Appreciation and Better Medicine. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2019**, 35, 13–14. [[CrossRef](#)]

TU, Y.B., ZHOU, T., YUAN, X.F., QIU, H.J., XUE, F., SUN, C.Q., WANG, WU, D.L., PENG, J.M., KONG, X.G. and TONG, G.Z. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus

Arch. Virol. 152 (1), 209-218 (2007).

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

YIN, X.; HU, Z.; GU, Q. et al. Equine tetherin blocks retrovirus release and its activity is antagonized by equine infectious anemia virus envelope protein. *J Virol*; v.88, n.2, p.1259–70, 2014. (a)

YIN, X.; GUO, M.; GU, Q. et al. Antiviral potency and functional analysis of tetherin orthologues encoded by horse and donkey. *Virology Journal*, v.11, n. 151, 2014. (b)

ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J. et al. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.28, p.9918–23, 2005.

ZHANG, B.; SUN, C.; JIN, S. et al. Mapping of equine lentivirus receptor 1 residues critical for equine infectious anemia virus envelope binding. *J. Virol.* v. 82, p. 1204-13, 2008.


ZHENG, Y.H.; SENTSU, H.; NAKAYA, T. et al. “In vivo” dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes: insertions/duplications at the principal neutralizing domain. *J Virol*, v.71, n.7, 5031–9, 1997.

ZHENG, Y. Q.; JEANG, K. T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, v. 9, n. 112, 2012.

ZIELONKA, J.; BRAVO, I. G.; MARINO, D. et al. Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. *Journal of virology*; v.83, p.7547-7559, 2009.

8. ANEXOS

ANEXO A – Sondas indexadas e suas referências no uso da plataforma Illumina

		<small>custom oligos • qPCR • next generation sequencing • RNAi • genes & gene fragments • CRISPR genome editing</small>		
Well position	Primer name	i5 index (HiSeq® 2000/2500, MiSeq®, NovaSeq® Illumina systems)	i5 index (HiSeq 3000, 4000, X, NextSeq®, MiniSeq®, iSeq® Illumina systems)	i7 index (all Illumina systems)
A1	xGen UDI Primer Pair, Index 1	ATATGCGC	GCGCATAT	CTGATCGT
B1	xGen UDI Primer Pair, Index 2	TGGTACAG	CTGTACCA	ACTCTCGA
C1	xGen UDI Primer Pair, Index 3	AACCGTTC	GAACGGTT	TGAGCTAG
D1	xGen UDI Primer Pair, Index 4	TAACCGGT	ACCGGTTA	GAGACGAT
E1	xGen UDI Primer Pair, Index 5	GAACATCG	CGATGTTC	CTTGTCGA
F1	xGen UDI Primer Pair, Index 6	CCTGTAG	CTACAAGG	TTCCAAGG
G1	xGen UDI Primer Pair, Index 7	TCAGGCTT	AAGCCTGA	CGCATGAT
H1	xGen UDI Primer Pair, Index 8	GTTCCTGT	ACGAGAAC	ACGGAACA
A2	xGen UDI Primer Pair, Index 9	AGAACGAG	CTGTTCT	CGGCTAAT
B2	xGen UDI Primer Pair, Index 10	TGCTTCCA	TGGAAGCA	ATCGATCG
C2	xGen UDI Primer Pair, Index 11	CTTCGACT	AGTCGAAG	GCAAGATC
D2	xGen UDI Primer Pair, Index 12	CACCTGTT	AACAGGTG	GCTATCCT
E2	xGen UDI Primer Pair, Index 13	ATCACACG	CGTGTGAT	TACGCTAC
F2	xGen UDI Primer Pair, Index 14	CCGTAAGA	TCTTACGG	TGGACTCT
G2	xGen UDI Primer Pair, Index 15	TACGCCCT	AAGGCGTA	AGAGTAGC
H2	xGen UDI Primer Pair, Index 16	CGACGTTA	TAACGTCC	ATCCAGAG
A3	xGen UDI Primer Pair, Index 17	ATGCACGA	TCGTGCT	GACGATCT
B3	xGen UDI Primer Pair, Index 18	CCTGATTG	CAATCAGG	AACTGAGC
C3	xGen UDI Primer Pair, Index 19	GTAGGAGT	ACTCTAC	CTTAGGAC
D3	xGen UDI Primer Pair, Index 20	ACTAGGAG	CTCTAGT	GTGCCATA
E3	xGen UDI Primer Pair, Index 21	CACTAGCT	AGCTAGTG	GAATCCGA
F3	xGen UDI Primer Pair, Index 22	ACGACTTG	CAAGTCGT	TCGCTGTT
G3	xGen UDI Primer Pair, Index 23	CGTGTGTA	TACACACG	TTCGTTGG
H3	xGen UDI Primer Pair, Index 24	GTTGACCT	AGGTCAAC	AAGCACTG
A4	xGen UDI Primer Pair, Index 25	ACTCCATC	GATGGAGT	CCTTGATC
B4	xGen UDI Primer Pair, Index 26	CAATGTGG	CCACATTG	GTGGAAGA
C4	xGen UDI Primer Pair, Index 27	TTGCAGAC	GTCTGCAA	ACCACGAT
D4	xGen UDI Primer Pair, Index 28	CAGTCCAA	TTGACTG	GATTACCG
E4	xGen UDI Primer Pair, Index 29	ACGTTTCA	CTGAACGT	GCACAAC
F4	xGen UDI Primer Pair, Index 30	AACGTCTG	CAGACGTT	GCGTCATT
G4	xGen UDI Primer Pair, Index 31	TATCGGTC	GACCGATA	ATCCGGTA
H4	xGen UDI Primer Pair, Index 32	CGCTCTAT	ATAGAGCG	CGTTGCAA
A5	xGen UDI Primer Pair, Index 33	GATTGCTC	GAGCAATC	GTGAAGTG
B5	xGen UDI Primer Pair, Index 34	GATGTGTG	CACACATC	CATGGCTA
C5	xGen UDI Primer Pair, Index 35	GCAACTCT	AGATTGCG	ATGCCTGT
D5	xGen UDI Primer Pair, Index 36	TGGTAGCT	AGCTACCA	CAACACCT
E5	xGen UDI Primer Pair, Index 37	GATAGGCT	AGCCTATC	TGTACTGT
F5	xGen UDI Primer Pair, Index 38	AGTGGATC	GATCCACT	GTCATCGA
G5	xGen UDI Primer Pair, Index 39	TTGGACGT	ACGTCCAA	AGCACTTC
H5	xGen UDI Primer Pair, Index 40	ATGAGCTC	GACGTGAT	GAAGGAAG
A6	xGen UDI Primer Pair, Index 41	GAAAGTGG	CCAATTC	GTTGTTCC
B6	xGen UDI Primer Pair, Index 42	CATACCAC	GTGGTATG	CGGTTGTT
C6	xGen UDI Primer Pair, Index 43	CTGTTGAC	GTCACACG	ACTGAGGT
D6	xGen UDI Primer Pair, Index 44	TGGCATGT	ACATGCCA	TGAAGACG
E6	xGen UDI Primer Pair, Index 45	ATCGCCAT	ATGGCGAT	GTTACGCA
F6	xGen UDI Primer Pair, Index 46	TTGCCAAG	CTTCGCAA	AGCGTGTT
G6	xGen UDI Primer Pair, Index 47	AGTTCGTC	GACGAACT	GATCGAGT
H6	xGen UDI Primer Pair, Index 48	GACAGTA	TACTGCTC	ACAGCTCA
A7	xGen UDI Primer Pair, Index 49	ACAGCTCA	TGACTGTT	GAGCAGTA
B7	xGen UDI Primer Pair, Index 50	GATCGAGT	ACTCGATC	AGTTCGTC
C7	xGen UDI Primer Pair, Index 51	AGCGTGTT	AACACGCT	TTGCCAAG
D7	xGen UDI Primer Pair, Index 52	GTTACGCA	TGCGTAAC	ATCCGCAT
E7	xGen UDI Primer Pair, Index 53	TGAAGACG	CGTCTTCA	TGGCATGT
F7	xGen UDI Primer Pair, Index 54	ACTGAGGT	ACCTCAGT	CTGTTGAC
G7	xGen UDI Primer Pair, Index 55	CGGTTGTT	AACAACCG	CATACCAC
H7	xGen UDI Primer Pair, Index 56	GTTGTTCC	CGAACAA	GAAGTTGG
A8	xGen UDI Primer Pair, Index 57	GAAGGAAG	CTTCCTTC	ATGACGTC
B8	xGen UDI Primer Pair, Index 58	AGCACTTC	GAAGTGCT	TTGACGCT
C8	xGen UDI Primer Pair, Index 59	GTCATCGA	TCGATGAC	AGTGGATC
D8	xGen UDI Primer Pair, Index 60	TGTGACTG	CAGTCACA	GATAGGCT
E8	xGen UDI Primer Pair, Index 61	CAACACCT	AGGTGTTG	TGTTAGCT
F8	xGen UDI Primer Pair, Index 62	ATGCCTGT	ACAGGCAT	CGCAATCT
G8	xGen UDI Primer Pair, Index 63	CATGGCTA	TAGCCATG	GATGTGTC
H8	xGen UDI Primer Pair, Index 64	GTGAAGTG	CACCTCAC	GATTGCTC
A9	xGen UDI Primer Pair, Index 65	CGTTGCAA	TTGCAACG	CGCTCTAT
B9	xGen UDI Primer Pair, Index 66	ATCCGGTA	TACCGGAT	TATCGGTC
C9	xGen UDI Primer Pair, Index 67	GCGTCATT	AATGACGC	AACGCTCG
D9	xGen UDI Primer Pair, Index 68	GCACAAC	AGTTGTC	ACGTTGAG
E9	xGen UDI Primer Pair, Index 69	GATTACCG	CGGTAATC	CAGTCCAA
F9	xGen UDI Primer Pair, Index 70	ACCACGAT	ATCGTGGT	TTGCAGAC
G9	xGen UDI Primer Pair, Index 71	GTCGAAGA	TCTTCGAC	CAATGTGG
H9	xGen UDI Primer Pair, Index 72	CCTTGATC	GATCAAGG	ACTCCATC
A10	xGen UDI Primer Pair, Index 73	AAGCACTG	CAGTGCTT	GTTGACCT
B10	xGen UDI Primer Pair, Index 74	TTCGTTGG	CCAACGAA	CGTGTGTA
C10	xGen UDI Primer Pair, Index 75	TCGCTGTT	AACAGCGA	ACGACTTG
D10	xGen UDI Primer Pair, Index 76	GAATCCGA	TGCGATTC	CACTAGCT
E10	xGen UDI Primer Pair, Index 77	GTCGATA	TATGGCAC	ACTAGGAG
F10	xGen UDI Primer Pair, Index 78	CTTAGGAC	GTCTAAG	GTAGGAGT
G10	xGen UDI Primer Pair, Index 79	AACTGAGC	GCTCAGTT	CCTGATTG
H10	xGen UDI Primer Pair, Index 80	GACGATCT	AGATCGTC	ATGCACGA

A11	xGen UDI Primer Pair, Index 81	ATCCAGAG	CTCTGGAT	CGACGTTA
B11	xGen UDI Primer Pair, Index 82	AGAGTAGC	GCTACTCT	TACGCCTT
C11	xGen UDI Primer Pair, Index 83	TGGACTCT	AGAGTCCA	CCGTAAGA
D11	xGen UDI Primer Pair, Index 84	TACGCTAC	GTAGCGTA	ATCACACG
E11	xGen UDI Primer Pair, Index 85	GCTATCCT	AGGATAGC	CACCTGTT
F11	xGen UDI Primer Pair, Index 86	GCAAGATC	GATCTTGC	CTTCGACT
G11	xGen UDI Primer Pair, Index 87	ATCGATCG	CGATCGAT	TGCTTCCA
H11	xGen UDI Primer Pair, Index 88	CGGCTAAT	ATTAGCCG	AGAACGAG
A12	xGen UDI Primer Pair, Index 89	ACGGAACA	TGTTCCGT	GTTCTCGT
B12	xGen UDI Primer Pair, Index 90	CGCATGAT	ATCATGCC	TCAGGCTT
C12	xGen UDI Primer Pair, Index 91	TTCCAAGG	CCTTGGA	CCTTGTAG
D12	xGen UDI Primer Pair, Index 92	CTTGTCGA	TCGACAAG	GAACATCG
E12	xGen UDI Primer Pair, Index 93	GAGACGAT	ATCGTCTC	TAACCGGT
F12	xGen UDI Primer Pair, Index 94	TGAGCTAG	CTAGCTCA	AACGTTTC
G12	xGen UDI Primer Pair, Index 95	ACTCTCGA	TCGAGAGT	TGGTACAG
H12	xGen UDI Primer Pair, Index 96	CTGATCGT	ACGATCAG	ATATGCCG

ANEXO B – Iniciadores/Sondas usadas no NGS das amostras brasileiras do EIAV

SequenceName	Sequence	Start	Stop	Orientatio	Group Nam	Request ID	GC Percent
660712_30059535_AF033820.1_1_1	AAATCTGGCACATCTCATGTATCAATGCCT CAGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGGAAC TGTGGGGTTTTATGAGGGGTTTTATAAT GATTATAAGAGTAAAAAGAAAGTTGCTGAT	0	120	-	AF033820.	660712	35,83
660712_30059535_AF033820.1_1_2	TGCTCTACAACCTTGATAACCCAAGGAC TAGCTCATGTTGCTAGGCAACTAAACCGCA ATAACCGCATTGTGACGCGAGTTCCCAT TGGTGACGCGTAACTTCTGTTTTACA	119	239	-	AF033820.	660712	45
660712_30059535_AF033820.1_1_3	AGTATATAAGTCTGTATTCTGACAATTGG GACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCT CTGCTGGGCTGAAAAGCCCTTTGTAATAAA TATAATTCTACTCAGTCCCTGTCTCTA	238	358	-	AF033820.	660712	41,67
660712_30059535_AF033820.1_1_4	AGTTTGTCTGTTTCGAGACTCAGTTGGC GCCGAAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCA GACCCCTACCTGTTGAACCTGGCTGATCGTA GGATCCCGGGACAGCAGAGGAGAACTTA CAG	357	477	-	AF033820.	660712	57,5
660712_30059535_AF033820.1_1_5	GAAGTCTTCTGGAGGTTCCTGGCCAGAA CACAGGAGGACAGGTAAGATGGGAGACC CTTTGACATGGAGCAAGCGCTCAAGAAG TTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCA GAAA	476	596	-	AF033820.	660712	51,67
660712_30059535_AF033820.1_1_6	ATTAACACTGGTAACGTAAATGGGCGCT AAGTCTAGTAGACTTATTCATGATACCAAC TTTGTAAGAAAAGGACTGGCAGCTGAG GGATGTCAATCCATTGCTGGAAGATGTAAC	595	715	-	AF033820.	660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_7	CTCAGACGCTGTCAGGACAAGAAAGAGAG GCCTTTGAAAGAACATGGTGGCAATTTCT GCTGTAAAGATGGGCCCTCAGATTAATAAT GTAGTAGATGAAAAGGCATCAATCCAGCTC C	714	834	-	AF033820.	660712	45,83
660712_30059535_AF033820.1_1_8	CTAAGAGCGAAATATGAAAAGAAGACTGCT AATAAAAAGCAGTCTGAGCCCTCTGAAGAA TATCCAATCATGATAGATGGGCTGGAAAC AGAAATTTAGACCTCTAACACCTAGAGGA	833	953	-	AF033820.	660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_9	ATATACTACTGGGTGAATACCATACAGAC AAATGGTCTATTAATGAAGCTAGCAAAA CTTATTTGGGATATTATCAGTAGACTGTACT TCTGAAGAAATGAATGCATTTTGGATGT	952	1072	-	AF033820.	660712	31,67
660712_30059535_AF033820.1_1_10	TGGTACCTGGCCAGGACGACAAAAGCAG ATATTACTTGATGCAATTGATAAGATAGCAG ATGATTGGGATAATAGACATCCATTACCGA ATGCTCCACTGGTGCCACCACCAAGGG C	1071	1191	-	AF033820.	660712	46,67
660712_30059535_AF033820.1_1_11	CCTATCCCATGACAGCAAGGTTTATTAGA GGTTTAGGAGTACCTAGAGAAAGACAGAT GGAGCCTGCTTTGATCAGTTTAGCAGAC ATATAGACAATGGATAATAGAAGCCATGTC A	1190	1310	-	AF033820.	660712	40,83
660712_30059535_AF033820.1_1_12	AGAAGGCATCAAGTGATGATTGGAAAAC CTAAAGCTCAAATATTAGGCAAGGAGCTA AGGAACCTTACCCAGAATTTGTAGACAGAC TATTATCCAAATAAAAAGTGAGGGACATC C	1309	1429	-	AF033820.	660712	38,33
660712_30059535_AF033820.1_1_13	CACAAGAGATTTCAAATCTTACTGATAC ACTGACTATTCAGAACGCAATGAGGAATG TAGAAATGCTATGAGACATTTAAGACCAGA GGATACATTAGAAGAGAAAATGTATGCTT	1428	1548	-	AF033820.	660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_14	TGCAGAGACATTGGAACACAAAACAAAAG ATGATGTTATTGGCAAAGCACTTCAGACT GGTCTTGGGGCCATTTAAAGGTGGAGC CTTGAAGGAGGGCCACTAAAGGCAGCAC AA	1547	1667	-	AF033820.	660712	45,83

660712_30059535_AF033820.1_1_15	AACATGTTATAACTGTGGGAAGCCAGGACA TTTATCTAGTCAATGTAGAGCACCTAAAGTC TGTTTTAAATGTAACACAGCCTGGACATTTCT CAAAGCAATGCAGAAGTGTCCAAAAA	1666	1786	-	AF033820.660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_16	ACGGGAAGCAAGGGGCTCAAGGGAGGCC CCAGAAACAACTTTCCCGATACAACAGAA GAGTCAGCACAACTGTGTGTAACAAGA GACTCCTCAGACTCAAATCTGTACCCAGA TC	1785	1905	-	AF033820.660712	48,33
660712_30059535_AF033820.1_1_17	CTGAGCGAAATAAAAAAGGAATACAATGTC AAGGAGAAGGATCAAGTAGAGGATCTCAA CCTGGACAGTTTGGGGAGTAACATATAAT CTAGAGAAAAGGCTACTACAATAGTATTA A	1904	2024	-	AF033820.660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_18	ATTAATGATACTCCCTTAAATGACTGTTAG ACACAGGAGCAGATACTCAGTGTGACTA CTGCACATTATAATAGGTTAAATATAGAG GGAGAAAATCAAGGGACGGGAATAATA	2023	2143	-	AF033820.660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_19	AGGAGTGGGAGGAAATGTGGAACATTTT CTACGCCTGTGACTATAAGAAAAAGGGTA GACACATTAAGACAAGAATGCTAGTGGCA GATATCCAGTGACTATTTGGGACGAGAT AT	2142	2262	-	AF033820.660712	40
660712_30059535_AF033820.1_1_20	TTCTCAGGACTTAGGTGCAAAATGGTTTT GGCACAGCTCTCAAGGAAATAAAATTTAG AAAAATAGAGTTAAAGAGGGCACAATGG GGCAAAAATCTCAATGGCCACTCACTA	2261	2381	-	AF033820.660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_21	AAGGAGAACTAGAAAGGGCCAAAGAGAT AGTCCAAGACTATTGTACAGGGAAAAAT ATCAGAAGCTAGTGACAATAATCCTTATAAT TCACCATATTTGTAATAAAAAAGAGGTCT	2380	2500	-	AF033820.660712	35
660712_30059535_AF033820.1_1_22	TGGCAATGGAGGTTATTACAAGATCTGAG AGAATTAACAAAAACAGTACAGTAGGAAC GGAAATATCCAGAGGATTGCCTCACCCGG GAGGATTAATTAATGTAAACACATGACTG T	2499	2619	-	AF033820.660712	38,33
660712_30059535_AF033820.1_1_23	TATTAGATTTGGAGATGCATATTTCACTAT ACCTTAGATCCAGAGTTTAGACCATATACA GCTTCACTATTCCTCCATTAATCATCAAG AACCAGATAAAAGATATGTGTGGAAT	2618	2738	-	AF033820.660712	33,33
660712_30059535_AF033820.1_1_24	TGTTTACCACAAGGATTCGTGTGAGCCCA TATATATATCAGAAAACATTACAGGAAATTT TACAACCTTTTAGGGAAGATATCCTGAAG TACAATTGTATCAATATATGGATGATTTG	2737	2857	-	AF033820.660712	31,67
660712_30059535_AF033820.1_1_25	GTTTCATGGGAAGTAATGGTTCTAAAAACA ACACAAAGAGTTAATCATAGAAATTAAGGGC GATCTTACTGAAAAGGTTTTGAGACACC AGATGATAAATTACAAGAAGTGCCACCTTA	2856	2976	-	AF033820.660712	35,83
660712_30059535_AF033820.1_1_26	ATAGCTGGCTAGGTTATCAACTTTGCTCTGA AAATTGGAAAGTACAAAAATGCAATTAGA CATGGTAAAGAATCCAACCTTAATGATGT GCAAAAATTAATGGGAATATAACATGGA	2975	3095	-	AF033820.660712	33,33
660712_30059535_AF033820.1_1_27	ATGAGCTCAGGATCCCAGGGTTGACAGT AAAACACATTCAGCTACTAAGGGATG TTTAGAGTTGAATCAAAAAGTAATTTGGAC GGAAGAGGCACAAAAGAGTTAGAAAGAAA AT	3094	3214	-	AF033820.660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_28	TAATGAGAAGATAAAATGCTCAAGGGTT ACAATATTATAATCCAGAAGAAGAAATGTTA TGTGAGGTTGAAATTACAAAAATATGAG GCAACTTATGTTATAAAAACATCAAGG	3213	3333	-	AF033820.660712	27,5
660712_30059535_AF033820.1_1_29	GAATCCTATGGCAGGTAAGAAATATGA AGGCTAATAAGGGATGGTCAACAGTAAAA AATTTAATGTTATTGTGCAACATGTGGCAA CAGAAAGTATTACTAGAGTAGGAAAAATGTC	3332	3452	-	AF033820.660712	34,17

660712_30059535_AF033820.1_1_30	CCAACGTTTAAGGTACCATTACCAAGAG CAAGTAATGTGGGAAATGCAAAAAGGATG GTATTATCTTGGCTCCAGAAATAGTATAT ACACATCAAGTAGTTCATGATGATTGGAGA	3451	3571	-	AF033820	660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_31	AATGAAATTGGTAGAAGAACCTACATCAGG AATAACAATATACACTGATGGGGAAAACA AAATGGAGAAGGAATAGCAGCTTATGTGA CCAGTAATGGGAGAACTAACAGAAAAGG TT	3570	3690	-	AF033820	660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_32	TAGGACCTGTCACCTCATCAAGTTGCTGAAA GAATGGCAATACAAATGGCATTAGAGGATA CCAGAGATAAACCAAGTAAATATAGTAACTG ATAGTTATTATTGTTGGAAAAATTACAG	3689	3809	-	AF033820	660712	32,5
660712_30059535_AF033820.1_1_33	GAAGGATTAGGTTTAGAAGGACCACAAG TCCTTGGTGGCCTATAATACAAAATATACGA GAAAAGAGATAGTTATTTTCTGGGTA CCTGTGCACAAAGGATATATGGTAATCAA	3808	3928	-	AF033820	660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_34	ATTGGCAGATGAAGCCGCAAAAATAAAG AAGAAATCATGCTAGCATACCAAGGCACAC AAATTAAGAGAAAAGAGATGAAGATGCA GGGTTTGACTTATGTCTTATGACATCA T	3927	4047	-	AF033820	660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_35	TGATACCTGTATCTGACACAAAATCATAACC CACAGATGTAATAATCAAGTTCCTCCTAAT AGCTTTGGATGGTCACTGGAAATCATCA ATGGCAAAACAGGGGTTATTAATTAATG	4046	4166	-	AF033820	660712	36,67
660712_30059535_AF033820.1_1_36	GGAGGAATAATTGATGAAGGATATACAGG AGAAATACAAGTATGTACTAATATTGG AAAAGTAATATTAATTAATAGAGGGACA AAAATTTGCACAATTAATATACTACAGCAT	4165	4285	-	AF033820	660712	26,67
660712_30059535_AF033820.1_1_37	TCACTCAAATCCAGACAGCCTTGGGATGA AAATAAAATATCTCAGAGAGGGGATAAAG GATTTGGAAGTACAGGAGTATTCTGGGTAG AAAATATTCAGGAAGCACAAGATGAACATG A	4284	4404	-	AF033820	660712	38,33
660712_30059535_AF033820.1_1_38	AGAATTGGCATAATCACCAAAGATATTGG CAAGAAATTATAAGATACCATTGACTGTAG CAAAACAGATAACTCAAGATGCTCCTCATT GCACTAAGCAAGGATCAGGACCTGCAGGT T	4403	4523	-	AF033820	660712	38,33
660712_30059535_AF033820.1_1_39	TGTGTCATGAGATCTCCTAATCATTGGCAG GCAGATTGCACACATTTGGACAATAAGATA ATATTGACTTTTGTAGAGTCAAATTCAGGAT ACATACATGCTACATTATTGTCAAAGAA	4522	4642	-	AF033820	660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_40	AAATGCATTATGTACTTCAATGGCTATTTTA GAATGGGCAAGATGTTTTCCACAAAGTCC TTACACACAGATAACGGCCTAATTTTGTG GCAGAACCAGTTGTAATTTGTTGAAGTT	4641	4761	-	AF033820	660712	35
660712_30059535_AF033820.1_1_41	TCCTAAAGATAGCACATACCAGGAATAC CATATCATCCAGAAAGTCAAGGTATTGTAG AAAGGGCAAATAGGACCTTGAAGAGAAG ATTCAAAGTCATAGAGACAACACTCAAACA C	4760	4880	-	AF033820	660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_42	CTGGAGGCAGCTTACAACCTGCTCCTATTA CTTGTAACAAAGGGAGGAAAGTATGGGA GGACAGACACCATGGGAAGTATTTATCACT AATCAAGCACAAGTAATACATGAGAACTT	4879	4999	-	AF033820	660712	40,83
660712_30059535_AF033820.1_1_43	TTTACTACAGCAAGCACAATCCTCAAAAAA TTTTGTTTTTACAAAATCCTGGTGAACATG ATTGGAAGGACCTACTAGGGTGTCTGTGG AAGGGTATGGTGCAGTAGTAGTAAATGA	4998	5118	-	AF033820	660712	40,83

660712_30059535_AF033820.1_1_44	ATGAAGGAAAGGAATAATTGCTGTACCAT TAACCAGGACTAAGTTACTAATAAACCAA ATTGAGTATTGTCAGGAAGCAAGACCCA ACTACCATTGTCAGCTGTGTTTCTGAGGT	5117	5237	-	AF033820.660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_45	TCTCTAGGAATTGATTACCTCGATGCTTCAT TAAGGAAGAAGAATAAACAAAGACTGAAG GCAATCCAACAAGGAAGACAACCTCAATAT TTGTTATAAGGTTTGATATATGGGAGTATT	5236	5356	-	AF033820.660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_46	TTGGTAAAGGGTAAACATGGTCAGCATCG CATTCTATGGGGGAATCCAGGGGGGAATC TCAACCCCTATTACCAACAGTCAGAAAAAT CTAAGTGTGAGGAGAACAATGTTTCAAC C	5355	5475	-	AF033820.660712	45,83
660712_30059535_AF033820.1_1_47	CTTATTGTTATAAATGACAGTAAGAACAG CATGGCAGAATCGAAGGAAGCAAGAGACC AAGAAATGAACCTGAAGAAGAACTAAAG AAGAAAAAGAAGAAATGACTGGTGGA AA	5474	5594	-	AF033820.660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_48	ATAGGTATGTTTCTGTTATGCTTAGCAGGAA CTACTGGAGGAATACTTTGGTGGTATGAAG GACTCCACAGCAACATTATATAGGGTTGG TGGCGATAGGGGAAGATTAAACGGATCT	5593	5713	-	AF033820.660712	43,33
660712_30059535_AF033820.1_1_49	TGGCCAATCAATGCTATAAGTCTGGGG TTCTTCCCGGGGTAGACCATTTCAAAAT TACTCAGTTATGAGACCAATAGAAGCATG CATATGGATAATAACTGCTACATTATT	5712	5832	-	AF033820.660712	38,33
660712_30059535_AF033820.1_1_50	TAGAAGCTTATCATAGAGAGATAACATTCAT TTATAAGTCTTCTGCACAGATAGTGATCAT TGTCAGAGTATCAATGTAAGAAATTAATC TTAATTCCTGACTCCTCTAACTCTG	5831	5951	-	AF033820.660712	31,67
660712_30059535_AF033820.1_1_51	GTACGTGTTGAGGATGTAATGAACACAGC GGAATATTGGGGATTAAATGGCTAGAATG TAATCAACAGAAAATTTAAGACTATATTA GTACCTGAAAATGAAATGGTAAATATCAAT	5950	6070	-	AF033820.660712	30,83
660712_30059535_AF033820.1_1_52	TGATACTGATACCTGGATACCTAAGGGGTG TAATGAGACGTGGGCAAGAGTGAACGTT GTCCATAGATATTTATATGGGATACATCC AATCAGGCTGTGTGACAGCCACCATTTTT	6069	6189	-	AF033820.660712	41,67
660712_30059535_AF033820.1_1_53	TTCTGGTACAGGAGAAAGGATTGCTGATA CTTCTAGAATTGGCAATTGTTGGCCAAACA TATTTCTGGGGTTTTAGAAGATAAATAGG GAGTAGTACGGGGGATTATACAGCTTGC A	6188	6308	-	AF033820.660712	41,67
660712_30059535_AF033820.1_1_54	AATGTGCGTCGCCTAAATATAAATAGAAG GATTATACAGGATCTATCAAGTACCTATAT TTTATACATGTACTTTCACATAAATCTCC TGCAATAATGAGCCAATAATCAGTGTT	6307	6427	-	AF033820.660712	31,67
660712_30059535_AF033820.1_1_55	TATCATGTATGAAACAACAGGTACAATAT TTATTGTGTAATAATAATAAGTAATAATTA TAATTGTGTAGTACAAAGTTTTGGAGTTATA GGACAGGCACACTTAGAACTGCCTAG	6426	6546	-	AF033820.660712	28,33
660712_30059535_AF033820.1_1_56	GACCTAACAAAAGAATAAGGAACCAAGCT TTAACCAATATACTGCTATAAATAACAA AACAGAATTAGAAACATGGAAGTTAGTAAA GACTTCTGGCATAACTCTTTACTATTT	6545	6665	-	AF033820.660712	30,83
660712_30059535_AF033820.1_1_57	TCTTCTGAAGCTAACACTGGACTAATTAGAC ATAAGAGAGATTTGGTATAAGTGCAATAG TGGCAGCTATTGTAGCCGCTACTGCTATTG CTGCTAGCGCTACTATGCTTATGTTGCT	6664	6784	-	AF033820.660712	40,83
660712_30059535_AF033820.1_1_58	TCTAACTGAGGTTAACAAAATAATGGAAGT ACAAAATCATACTTTGAGGTAGAAAATAGT ACTCTAAATGGTATGGATTAATAGAACGA CAAAATAAGATATTATATGCTATGATTCT	6783	6903	-	AF033820.660712	26,67

660712_30059535_AF033820.1_1_59	TTCAAACACATGCAGATGTTCAACTGTAAA GGAAAGACAACAGGTAGAGGAGACATTTA ATTTAATTGGATGATAGAAAACACATGT ATTTGTCATACTGGTCCCTGGAATA	6902	7022	-	AF033820.	660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_60	ATGTCATGGGGACATTTAAATGAGTCAACA CAATGGGATGACTGGGTAAGCAAAATGGA AGATTTAAATCAAGAGATACTAACTACACTT CATGGAGCCAGGAACAATTTGGCACAATCC	7021	7141	-	AF033820.	660712	39,17
660712_30059535_AF033820.1_1_61	CATGATAACATTCAATACACCAGATAGTATA GCTCAATTTGGAAAAGACCTTTGGAGTCAT ATTGGAATTTGGATTCTGGATTGGGAGCT TCCATTATAAAAATATAGTATGTTTTT	7140	7260	-	AF033820.	660712	32,5
660712_30059535_AF033820.1_1_62	TGCTTATTTATTTGTTACTAACCTTTCGCCT AAGATCCTCAGGGCCCTCTGGAAGGTGAC CAGTGGTGACAGGCTCCTCCGGCAGTCGTT ACCTGAAGAAAAATCCATCACAACATG	7259	7379	-	AF033820.	660712	47,5
660712_30059535_AF033820.1_1_63	GCATCGCGAGAAGACACCTGGGACCAGGC CCAACACAACATACACCTAGCAGGCGTGAC CGGTGGATCAGGGACAATACTACAAGC AGAAGTACTCCAGGAACGACTGGAATGGA GAA	7378	7498	-	AF033820.	660712	54,17
660712_30059535_AF033820.1_1_64	ATCAGAGGAGTACAACAGGCGCAAAAGA GCTGGGTGAAGTCAATCGAGGCATTTGGA GAGAGCTATATTCGAGAAGACAAAGG GGAGATTTCTCAGCCTGGGCGGCTATCA ACGA	7497	7617	-	AF033820.	660712	51,67
660712_30059535_AF033820.1_1_65	AGCACAAGAACGGCTCTGGGGGAACAAT CCTCACAAGGGTCTTAGACCTGGAGATT CGAAGCGAAGGAGGAAACATTTATGACTG TTGCATTAAGCCCAAGAAGGAATCTCGC TA	7616	7736	-	AF033820.	660712	49,17
660712_30059535_AF033820.1_1_66	ATCCCTTGCTGGATTCCCTTATGGCTAT TTGGGGACTAGTAATTATAGTAGGACGCA TAGCAGGCTATGGATTACGTGACTCGCTG TTATAATAAGGATTGTATTAGAGGCTTA	7735	7855	-	AF033820.	660712	40,83
660712_30059535_AF033820.1_1_67	AAATTTGATATTTGAAATAATCAGAAAATG CTTGATTATATTGGAAGAGCTTTAAATCCTG GCACATCTCATGTATCAATGCCTCAGTATGT TTAGAAAAACAAGGGGGAAGTGTGGG	7854	7974	-	AF033820.	660712	34,17
660712_30059535_AF033820.1_1_68	GGTTTTATGAGGGTTTTATAAATGATTAT AAGAGTAAAAAGAAAGTTGCTGATGCTCTC ATAACCTTGATAACCCAAGGACTAGCTC ATGTTGCTAGGCACTAAACCGCAATAAC	7973	8093	-	AF033820.	660712	35,83
660712_30059535_AF033820.1_1_69	CCGCATTTGTGACGCGAGTTCCTTGGT GACGCGTTAACTTCTGTTTTACAGTATAT AAGTGCTTGTATTCTGACAATTGGGACTCA GATTCGCGGTCTGAGTCCCTCTCTGCT	8092	8212	-	AF033820.	660712	46,67
660712_30059535_AF033820.1_1_70	TGGGCTGAAAAGCCCTTTGTAATAAATATA ATTCTACTCAGTCCTGTCTCTAGTTTGTG TGTTGAGATCCTACAGTTGGCGCCCGAAC AGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCTTAC	8211	8331	-	AF033820.	660712	50

ANEXO C – Relatório de Participação em Trabalhos Publicados, Cursos e Eventos Durante o Período do Doutorado

Certificado	Data do evento
Certificado de Participação VI Simpósio de Microbiologia da UFMG	02/09/2019
V Curso de Verão em Bioinformática da UFMG, realizado pelo Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais	27/01/2020
Participação I Workshop de Imunologia da UESC	26/08/2020
Certificado de Participação VII Simpósio de Microbiologia da UFMG	03/11/2020
Certificado de Participação INTRODUÇÃO À ESTRUTURA, EVOLUÇÃO E ANÁLISE POR NGS DE GENOMAS VIRAIS	10/05/2021
Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório	04/10/2021
Certificado de Participação XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa	19/10/2021
Certificado de Participação VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG	16/11/20021
Identificação de regiões genômicas conservadas do genoma de amostras brasileiras do EIAV usando NGS como meio de padronização de metodologia molecular para diagnóstico da AIE VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG	16/11/2021
Caracterização Biológica e Reométrica de Amostras de Aspirado Traqueal de Pacientes COVID-19 - VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG	16/11/2021
Desenvolvimento de uma nova metodologia e insumo tecnológico para avaliação da resposta antiviral por Linfócitos TCD8+ VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG	16/11/2021
Colaboração como professora de Biologia Molecular para o curso de especialização em Microbiologia sob a orientação da Professora Jordana Graziela Coelho dos Reis	nov/21
Certificado de Participação IX Simpósio de Microbiologia da UFMG	set/22
Identificação de regiões genômicas conservadas do genoma de amostras brasileiras do EIAV usando NGS como meio de padronização de metodologia molecular para diagnóstico da AIE - IX Simpósio de Microbiologia da UFMG	set/22
Desenvolvimento de uma nova metodologia e insumo tecnológico para avaliação da resposta antiviral por Linfócitos TCD8+ - IX Simpósio de Microbiologia da UFMG	set/22
Certificado de Participação XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia	out/22
Development of a Molecular Test for the Detection of Equine Infectious Anemia from the Genomic Analysis of Brazilian EIAV Samples - XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia	out/22
Colaboração como professora de Biologia Molecular para o curso de especialização em Microbiologia sob a orientação da Professora Jordana Graziela Coelho dos Reis	nov/22

Artigos Publicaos	Autores	Revista	Ano da publicação
Will a little change do you good? A putative role of polymorphisms in COVID-19	Adriana Alves Oliveira Paim , Ágata Lopes-Ribeiro, Daniele S O Daian E Silva, Luis Adan F Andrade, Thais F S Moraes , Edel F Barbosa-Stancioli , Flávio Guimarães da Fonseca , Jordana G Coelho-Dos-Reis	Immunology Letters	2021
A chimeric HLA-A2:β2M:Ig fusion protein for the study of virus-specific CD8+ T-cells	Ágata Lopes Ribeiro , Franklin Pereira Araújo , Julia Pereira Martins , Alice Aparecida Lourenço , Jing Huang , Felipe Valença Pereira , Luis Adan Flores Andrade , Adriana Alves Oliveira Paim , Flávio Guimarães da Fonseca , Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli , Olindo Assis Martins-Filho , Vanessa Peruhype-Magalhães , Moriya Tsuji , Jordana G Coelho-Dos-Reis	J Immunol Methods	2021
Timeline kinetics of systemic and airway immune mediator storm for comprehensive analysis of disease outcome in critically ill COVID-19 patients	Juan Jonathan Gonçalves, Camila Mata, Alice Aparecida Lourenço, Ágata Ribeiro Lopes, Geovane Marques Ferreira, Thais Fernda Campos Fraga da Silva, Vanessa Egídio Silveira Almeida, Iara Antunes Batista, Iara Antunes Batista, Carolina Avila-Mesquita, Ariel E S Couto, Ligia C B Campos, Adriana Alves Oliveira Paim, Linziane Lopes Ferreira, Patrícia De Melo Oliveira, Lorena De Almeida Teixeira, Daisymara Priscila De Almeida Marques, Henrique Retes De Moraes, Samille Henriques Pereira, Joaquim Pedro Brito-De-Sousa, Ana Carolina Campi-Azevedo, Vanessa Peruhype-Magalhães, Márcio SS Araújo, Andréa Teixeira-Carvalho, Flávio Guimarães Da Fonseca, Vania Luiza Deperon Bonato, Christiane Becari, Denise Ferro, Mayra Meneguetti, Amanda SA Mazzoni, Maria Auxiliadora-Martins, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis and Olindo Assis Martins Filho	Frontiers in Immunology	2022

ANEXO D - Artigo Científico

**Molecular characterization of the first complete EIAV genomic sequence isolated from
Brazilian wild donkey and standardization of a molecular method by qPCR for
detection of AIE**

Adriana Alves Oliveira Paim^{1*}; Rebeca Jéssica Falcão Câmara³; Cláudia Fideles Resende³;
Paula Luize Camargos Fonseca⁴; Filipe Romero Rebello Moreira⁴; Jaqueline Assumpção
Diniz⁵; Rennan Garcia Moreira⁴; João Pessoa Araújo Junior⁵; Renato Santana de Aguiar⁴;
Edel F. Barbosa-Stancioli¹; Jordana G. Coelho-dos-Reis^{1,6} Jenner Karlisson Pimenta dos
Reis³; Flávio Guimarães da Fonseca^{1,2*}

- 1 Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- 2 CT Vacinas, BH-TEC Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Rua Professor José Vieira de Mendonça, 770 - Engenho Nogueira, CEP 31310-260, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- 3 Laboratório de Retrovírus (Retrolab), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- 4 Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- 5 Instituto de Biotecnologia IBTEC, Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Universidade Estadual Paulista, R. Dr. José Barbosa de Barros, 1780 - Jardim Paraíso, CEP: 18610-307, Botucatu, SP, Brazil
- 6 Biomarkers Research Group, Instituto René Rachou, Osvaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding authors:**

1- Adriana Alves Oliveira Paim. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: 55 31 3409 2745. Email: aaopaim@icrob.dout.ufmg.br

2- Flávio Guimarães da Fonseca. CT Vacinas, BH-TEC, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Rua Professor José Vieira de Mendonça, 770 - Engenho Nogueira, CEP 31310-260, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: 55 (31) 3401-1113. Email: fdafonseca@icb.ufmg.br

Abstract

In order to deepen the molecular study of EIAV, mainly in Brazilian samples of viruses isolated from naturally infected horses and donkeys, we performed massive and parallel sequencing of viral isolates using the SureSelect target enrichment system with the next generation of Illumina sequencing from cDNA extracted from the blood of animals. Some sequences obtained represent parts of the structural and accessory genes of EIAV. Given the great difficulty of complete sequencing of these isolates, it was necessary to use Sanger sequencing to complement the sequences obtained by NGS. One of the isolates obtained from a donkey sample, which had its genome better characterized in the NGS, was completely sequenced, which can help in the study of the genetic diversity and regional clonality of Brazilian isolates of the virus compared to isolates from other regions of the world. From the data obtained in the sequencing, a diagnostic test by qPCR was developed, robust and with a high degree of detection of EIA (83% specificity and 92.9% sensitivity) in horses, donkeys and mules, which should complement the actions for the diagnosis and control of EIA.

Keywords: EIAV; IEA; Molecular Characterization; NGS; Equidae, Retrovirus

1. Introduction

Equine infectious anemia (EIA) is a worldwide disease caused by the equine infectious anemia virus (EIAV). This virus belongs to the family Retroviridae, subfamily Orthoretrovirinae and genus Lentivirus (Leroux; Cadore; Montelaro, 2004). It is an enveloped virus with matrix proteins externally covering the icosahedral nucleocapsid, mediating association with the inner surface of the viral envelope, which is derived from the host cell (Matheka et al., 1976); Weiland et al., 1977; Leroux 2013; Cook, (2013-2016); Issel, 2013). Each viral particle contains two unique, non-complementary copies of positive-sense genomic RNA within the capsid. The EIAV genome is only about 8.2 Kb and consists of the structural genes gag (group-specific antigen), pol, and env, flanked at both ends by long terminal repeats (LTRs). EIAV also has open reading frames (ORFs) of additional accessory genes S1, which represents the tat gene (transcriptional transactivator); S2, which is exclusive to EIAV and is related to increased virulence of the isolates; and S3, which represents the rev gene, which regulates the expression of viral proteins (ISSEL et al., 2014).

The most common natural transmission of EIAV occurs through insects of the Tabanidae family (*Tabanus sp.*), also known as stable flies or by other flies like of the species *Stomoxys calcitrans* (Cook et al, 2013), during the blood meal necessary for laying eggs. In common with all lentiviruses, the primary target of EIAV in the host is monocytes and the viral cycle is completed in differentiated macrophages (Sellon, 1993; Maury, 1994).

EIAV is known to infect *Equus caballus* and *Equus asinus*, members of the Equidae family, as well as donkeys and mules, in which it causes persistent anemia. EIA can be characterized by three defined phases: acute, chronic, and long-term asymptomatic (Issel and Coggins, 1979; Sellon, 1993). Although most of the published experimental studies on EIA and EIAV are related to horses, donkeys and mules are known to be an important part of the virus transmission chain, as these potentially infected animals maintain unsupervised contact with other equines,

making them part of the EIAV dispersion process. In fact, the circulation of EIAV in the donkey population of Ceará-Brazil was evaluated and confirmed from serological tests such as AGID and ELISA, in addition to the polymerase chain reaction (PCR) to detect the tat-gag EIAV gene (Dias- Costa et al 2021).

According to WOAAH, the diagnosis of EIA is made through serological tests and the AGID is the official detection method in most countries where the disease is registered. The disease has a prevalence of over 30% reported in some countries and, as such, is of considerable importance to the equine industry. It is one of eleven notifiable equine-specific diseases listed by the World Organization for Animal Health (WOAH). There is no vaccine or treatment available for this disease and its control, in almost all countries, depends entirely on the identification of infected equines followed by their removal or quarantine to prevent transmission.

A critical point in the diagnosis and consequent control of EIA performed with the exclusive use of serological tests is that there is a delay, or “serological window”, between the moment of infection and the production of specific detectable antibodies. In addition, there are several reports of infected animals that do not produce, throughout their infections, sufficient antibodies capable of forming visible precipitation lines in the AGID technique. Thus, the delay or insufficient production of detectable antibodies in serological tests defines the urgent need to develop direct detection techniques against EIAV, especially in cases where there is suspicion of recent exposure to the virus. An alternative would therefore be viral detection by molecular methods. The great difficulty in the development of molecular tests is due to the limited knowledge about the EIAV genomic sequences. It is anticipated that because of this, any of the other designed PCR-based methods will be limited to the detection of only a small percentage of viral isolates due to incompatibilities between the specific primers and their target sequences. Furthermore, the existence of extensive genetic variation among geographically distinct virus isolates makes it difficult to design assays that can detect most samples in the current

circulation. This is seen as a major obstacle for the routine implementation of a PCR-based diagnostic method.

Therefore, the increase in the number of quality information on EIAV genomic sequences may contribute to the development of robust molecular tests that can complement the results obtained with serological tests. The possibility of early detection of the infection would allow the control of the dispersion viral infection in the first moments of infection, overcoming the difficulties encountered with the diagnosis performed only by means of serology. For this, it is necessary to know the genomic profile of EIAV samples isolated from donkeys, donkeys and not just horses, from different geographic regions. This is the only solution for the identification of a specific and sufficiently conserved region that allows the design of an efficient molecular test.

In this work, the cDNA of 15 EIAV isolates integrated into the equine genome (8 donkeys from the northern region of Brazil and 7 horses, 6 from the northeast region and 1 from the southeast region of Brazil) were sequenced using NGS through the enrichment system. of SureSelect targets with state-of-the-art Illumina sequencing, with unprecedented results from a Brazilian sequence from a donkey obtained from EIAV structural and accessory gene regions. Bioinformatics analyzes allowed to characterize regions of identity for structural and accessory genes of EIAV (gag, env, pol, s2 and rev) in 3 horse isolates and 4 donkey isolates. It is noteworthy that there is no reference genetic material from donkeys in databases and this result would be unprecedented in relation to isolated samples of EIAV. The analysis of the sequenced gene regions also allowed the identification of conserved regions in the genes of these isolates in comparison with other species deposited in databases, which made it possible to design specific primers for validation of the molecular test based on qPCR for detection of EIAV.

These results provide new insights into the genetic variability of EIAV isolated from horses and especially donkeys, for which obtaining complete genomic sequences is of great interest

for the development of a molecular diagnosis. Finally, the gene regions sequenced by the analysis of the complete Brazilian sequence of the isolated donkey sample were compared with EIAV sequences from different regions of the world, reinforcing the complex model of phylogeny distribution and regional clonality of the EIAV isolates.

2. Materials and methods

2.1. Samples and controls

The whole blood of horses and donkeys was collected in EDTA to proceed with the separation of the buffy coat for extraction of proviral DNA from EIAV. The total number of samples and the methodologies applied are described in Figure 1. The DNA from the buffy coat cells was extracted with the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The extracted DNA samples are stored in 1.5 mL eppendorf tubes, free of RNases and DNases, identified and frozen at -20°C . The yield of DNA extractions was estimated through spectrophotometric evaluation using the NanoVue equipment (GE Healthcare).

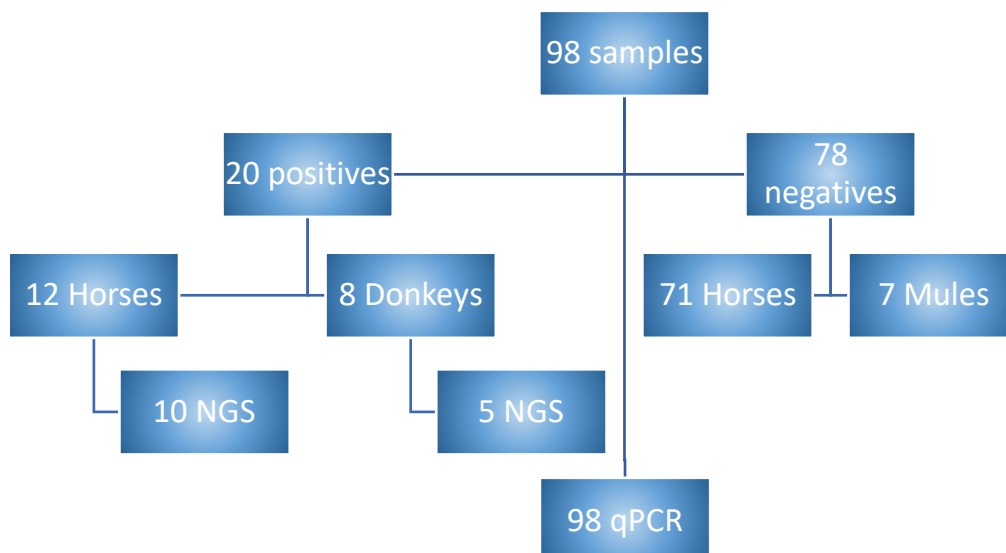


Figure 1 – Total number of samples and methodologies applied. The use of the samples was approved by the Ethics Committee on the use of animals (UFMG/CEUA 171/2018 and CEUA 206/2017).

2.2. Massive and parallel sequencing of 15 isolated EIAV samples from EIA positive animals

DNA libraries were constructed using a capture model using specific probes built on the complete sequence of a reference virus (EIAV Wyoming – GenBank accession number AF033820) (Petropoulos, C.J., 1997). The steps of degradation of the DNA extracted from the positive AIE horses were carried out, then the binding to the solid support (magnetic beads) containing the specific probes and hybridization with the reference probes were carried out. After washing, RT-PCR analyzes and fluorometric quantification were performed using Qubit™ equipment and reagents to assess the quality of the sequences. The MiSeq Illumina platform was used to perform the sequencing.

Libraries produced in the sequencing were trimmed with the BBduk program. Mapping was performed against the reference genome (host) using Bowtie2 (Note. In this step, three genomes of the *Equus* genus that were available at NCBI were used: GCF_000696695.1, GCF_001305755.1, GCF_002863925.1.) to eliminate everything referring to the equine genome. Data not aligned to the host genome were used to assemble contigs using the SPAdes program. For all assembled contigs, the similarity with the “nr” database (all hits available in NCBI) and viral proteins also from NCBI was verified using the Diamond program for processing the e-value data from 1e-10.

From the results of the NGS of the samples and specifically the result of the sequencing of the 122B sample of a donkey, it was possible to design specific primers to complete the sequencing of the genome of this isolate. Primers were designed from the partial consensus sequences

BRA1 and BRA2 and their sequenced products. 19 primer pairs were designed using Prime3Plus and Primer express programs (Table 1). Several attempts were made to amplify these fragments and the best result was obtained with the Taq Platinum™ HighFidelity enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The amplified DNA from the regions corresponding to each primer was analyzed on a concentrated 1.5% agarose gel. The amplicons produced and characterized on the agarose gel in a single band of the expected size were used for sanger sequencing and the amplicons that produced more than one band on the agarose gel were purified from the cut band of the agarose gel and purified by means of PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) of the expected size was purified and used for nucleotide sequencing using the forward and reverse primers described for PCR. The nucleotide sequences were determined according to the dideoxy sequencing method on an automatic capillary sequencer "ABI 3730 DNA Analyzer" (Applied Biosystems, CA, USA), using the kit "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA), USA), according to the conditions indicated by the manufacturer. The nucleotide sequences obtained were analyzed, assembled, and edited in SeqTrace 0.9.0., the contigs were analyzed using the CAP3 program. The sequences were compared with worldwide sequences obtained in the GenBank.

Primer	Sequence	Amplicon size (pb)
TAT+UTR_F	TCCCTAGGACAGCAGAGGAG	700
TAT+UTR_R	GGTTGTCTCCCCGTAGAAT	
GAG1_F	TAATTGGGCGCTAAGTTTGG	750
GAG1_R	TTTTGCTTTCAGCAGTTGGA	
GAG2_F	CCCAGAGGATACACCACTG	800
GAG2_R	GTGGGTTTGTAATGGATGC	
GAG3_F	TGGTCCAATGAAGGGAGGTA	1000
GAG3_R	CAGGGAAAGTTTGCTTTTGG	
POL2_F	AGACGAAAGTCCCCAAGAT	700
POL2_R	ACATTCCCTCCAACCCCTAC	
POL3_F	AAACATTCTCACCCCTGTG	800
POL3_R	CCCTGACATGCCCTCTTTA	
POL4_F	ATTCCTCAATGGCCCTTAC	250
POL4_R	CCCTCTGGATGTGGTAATC	
POL5_F	CAGCATTACTGTTCGTCT	300
POL5_R	TGTGCCTTAGAGCCATTACTCC	
POL6_F	GGGTTTTGAGACACCAGATGA	250
POL6_R	CCCCTGAACTCATCCATGTT	
POL7_F	GTGACTTGGACCGAAGAAGC	500
POL7_R	ACCACCCCTATTTCCTTC	
POL10_F	TTGGATGGGTCCTGTTAA	900
POL10_R	GCAAACCTTTGTCCTCAA	
POL11_F	AAGGGGAGAAGAAGGCTTTG	900
POL11_R	AGCCTGCCAGTGATTAGGTG	
POL13_F	GACATTAGAAGCGGCTTTGC	650
POL13_R	GTGGGTCTTTCAGTCAGA	
S2_F	GGGGTAACATGGTCAGCATC	800
S2_R	TCTCTTCTCCGCCATTGT	

Table 1 – Primers designed from the complete genome sequence of the Brazilian Poconé sample – BRA1 (GenBank accession number – MN560970.1) (Malossi et al 2021) used in the complete sequencing of the 122B sample

2.3. Phylogenetic analysis of the fragments generated by the NGS from the Brazilian EIAV samples and the comparison between the complete EIAV sequences and the complete sequence ON615427

Each sequence obtained by the NGS was analyzed and it was possible to make a phylogenetic analysis with the fragments of the genes identified. The EIAV nucleotide sequences (described

in Table 2) obtained were analyzed against 12 EIAV sequences deposited in GenBank, whose accession number in this database is: Liaoning (GenBank accession number AF327877) (Tu et al., 2007); Ireland (GenBank accession number JX480631) (Quilivan et al., 2013); Miyazaki-2011A (GenBank accession number JX003263) (Dong et al., 2013); Wyoming (GenBank accession number AF033820) (Petropoulos et al. 1997); Poconé BRA1 (GenBank accession number MN560970.1) and Poconé BRA2 (GenBank accession number MN560971.1) (Malossi et al., 2021); France (GenBank accession number KT764951.1) (Unpublished data – Direct submission to GenBank); ITA DE (GenBank accession number KM247554.1) and ITA SA (GenBank accession number KM247555) (Unpublished data – Direct submission to GenBank); UK (GenBank accession number MH580897.1) (Unpublished data – Direct submission to GenBank); CORNWALL (GenBank accession number MH580898.1) (Unpublished data – Direct submission to GenBank). The sequences were aligned in the MEGA program version 7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020). The estimated nucleotide similarity between the sequences was calculated by the Maximum Composite Likelihood model with gamma distribution (shape parameter = 5). The phylogenetic trees were reconstructed using the Maximum Likelihood method, Tamura-Nei nucleotide substitution model, considering gamma distribution (5 categories), and invariant sites, implemented in MEGA version 7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al, 2020). A total of 1000 bootstrap replicas were run. The same parameters were used in the phylogenetic analysis of the complete sequence of Isolate 122B GenBank Accession Number – ON615427) against the same reference samples.

2.4. Development of a qPCR as a molecular diagnosis methodology for EIA

From the sequences obtained in the massive and parallel sequencing of Brazilian EIAV samples, we were able to identify gene regions and one of them showed a region of the env

gene with great similarity when aligned with the other available EIAV gene sequences. From these sequences it was possible to design a specific primer pair capable of distinguishing positive and negative samples in qPCR using the SybrGreen™ reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For these primers and with the sequencing study of the amplicons obtained with qPCR, the specificity and sensitivity of the proposed test was confirmed, evaluated through analysis under the ROC curve with values calculated using the MedCalc program (MedCalc Software Ltd, 2022).

3. Results

3.1. Result of Sanger sequencing together with NGS to obtain the complete sequence ON615427

The massive and parallel sequencing results obtained after the bioinformatics analyzes showed only fragments of the EIAV genes for some samples of horses and donkeys included in the study. Only in samples 122B, 62, 1762, 3825, PIG, Polemica and C4 it was possible to observe the regions of similarity when compared with the sequences available in the databases. The compiled results are described in table 2.

ID	Species	qseqid	sseqid	pident	length	evalue
62	Equino	NODE_276_length_270_cov_0.766839	MN560970.1_pol	43.1	65	5.1e-12
122B	Asinino	NODE_29_length_841_cov_1843.201571	MN560970.1_rev	64.4	135	1.8e-47
122B	Asinino	NODE_29_length_841_cov_1843.201571	MN560970.1_env	52.7	450	1.4e-36
122B	Asinino	NODE_1007_length_274_cov_0.751269	MN560970.1_pol	37.7	61	8.0e-05
122B	Asinino	NODE_4329_length_236_cov_0.930818	MN560970.1_env	60.9	23	5.3e-05
122B	Asinino	NODE_4508_length_235_cov_0.936709	MN560970.1_rev	81.2	16	2.6e-04
122B	Asinino	NODE_4508_length_235_cov_0.936709	MN560970.1_env	66.7	15	7.6e-04
122B	Asinino	NODE_5352_length_151_cov_10.697368	MN560970.1_rev	56.4	39	2.0e-10
122B	Asinino	NODE_5352_length_151_cov_10.697368	MN560970.1_env	55.3	38	1.4e-06
1762	Asinino	NODE_551_length_286_cov_1.411483	MN560970.1_S2	47.4	38	5.4e-04
1762	Asinino	NODE_999_length_275_cov_0.747475	MN560970.1_pol	51.7	60	1.2e-13
3825	Asinino	NODE_588_length_279_cov_3.009901	MN560970.1_S2	47.4	38	5.3e-04
3825	Asinino	NODE_5121_length_229_cov_0.973684	MN560970.1_tat	43.3	30	5.1e-05
PIG	Asinino	NODE_28_length_494_cov_1.786571	MN560970.1_S2	47.4	38	9.4e-04
Polemica	Equino	NODE_437_length_289_cov_1.396226	MN560970.1_pol	31.8	66	9.3e-04
C4	Asinino	NODE_84_length_455_cov_4.468254	MN560970.1_tat	93.8	32	2.4e-14
C4	Asinino	NODE_84_length_455_cov_4.468254	MN560970.1_gag	92.0	25	2.1e-10
C4	Asinino	NODE_4152_length_252_cov_0.845714	MN560970.1_gag	44.0	25	6.3e-04
C4	Asinino	NODE_6022_length_240_cov_0.907975	MN560970.1_gag	39.6	53	9.5e-10
C4	Asinino	NODE_6408_length_238_cov_0.919255	MN560970.1_env	27.8	36	7.7e-04

Table 2 - Result compiled after bioinformatics analysis of sequences obtained with massive and parallel sequencing of Brazilian EIAV isolates.

From the sequencing of these various fragments, we constructed the first complete sequence of sample 122B of the EIAV genome of a donkey isolate, described below. The genes that refer to each EIAV protein were also aligned and compared with the Brazilian samples of EIAV POCONÉ-BRA1 (MN MN560970.1) and POCONÉ-BRA2 (MN560971.1). The genes were combined in the Geneious prime program version 2022.1. Seven ORFs related to the partial and complementary sequences of the gag, pol and env genes were identified. The complete sequence was identified by accessing GenBank and the reference bank number in the database is ON615427.

3.2 Phylogenetic analysis of the fragments generated by the NGS from the Brazilian samples of EIAV and complete sequence ON615427 in comparison with complete sequences of EIAV

The phylogenetic analysis of the complete sequence ON615427 in relation to the other EIAV genomic sequences available in GenBank was calculated using the Maximum Composite Likelihood model with gamma distribution (shape parameter = 5). The phylogenetic tree was reconstructed using the maximum likelihood method, Tamura-Nei nucleotide substitution model, considering gamma distribution (5 categories) and invariant sites, implemented in MEGA version 7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS) (Stecher G., et al., 2020). The results of this analysis are described in figures 2.

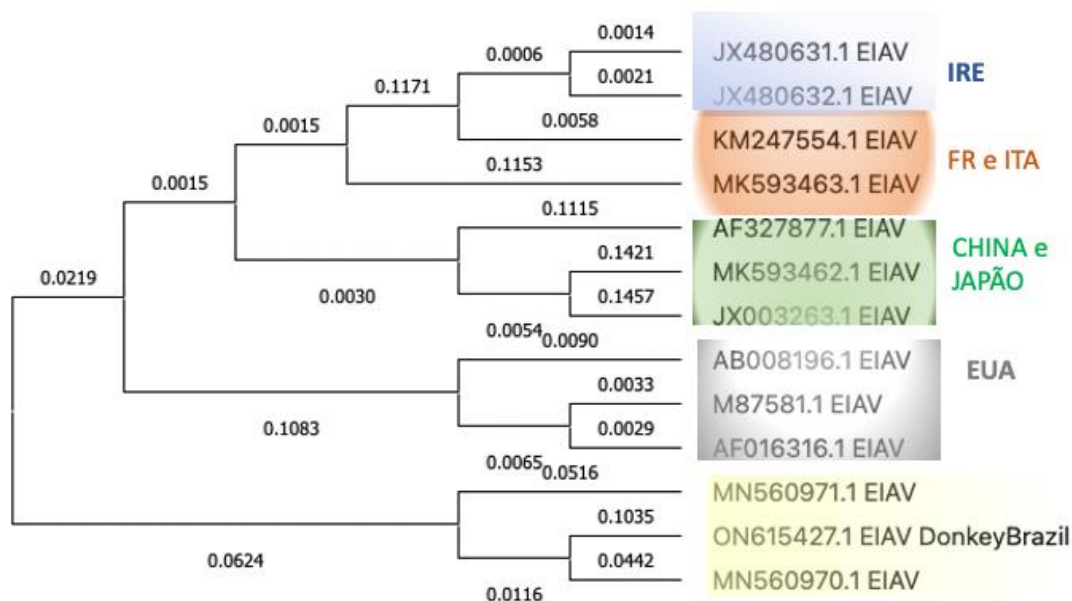


Figure 2: The phylogenetic analysis constructed to compare the complete ON615427 sequence with the other EIAV sequences indicated above was constructed by the neighbor join method with bootstrap values determined in 1000 iterations.

Phylogenetic trees were constructed based on the alignment of each analyzed gene: gag, env and pol, as well as the complete sequence in relation to the sequences available in GenBank. In all phylogenetic analyzes it was possible to verify the presence of well-defined clades of viral sequences from each region (Brazil, Europe, China, Japan, United States of America). The Brazilian samples share 89% of identity and form a unique clade and phylogenetically distant from the other isolates.

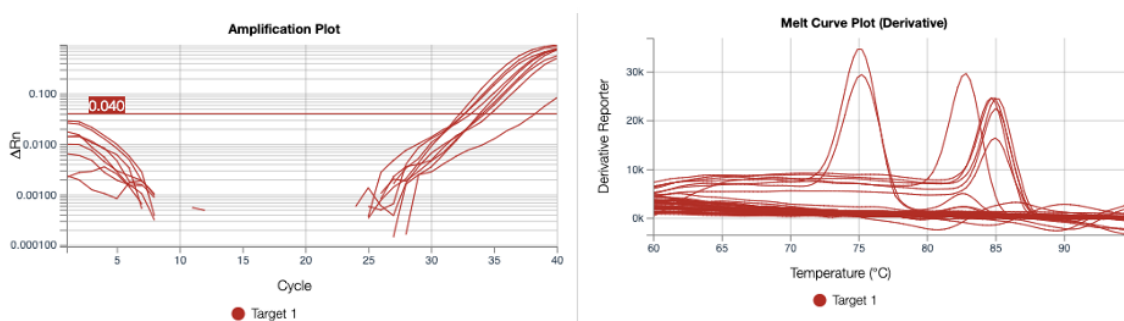
Sequences from China, Japan, the United States and Europe (Italy and Ireland) share approximately 80% identity, forming four separate clades, suggesting an independent evolution from a common ancestor (CAPOMACCIO et al., 2012a; ISSEL et al., 2014); CAPPELLI et al., 2017).

3.3. Result of the qPCR developed from the sequence obtained in the NGS of the sample ON615427

A region of the env gene from sample 122B was identified and described in this work, which showed high similarity with the same gene region of the other available EIAV samples. Although the env gene is strongly divergent within the EIAV subtypes and has few similarities with the reference sequences used, we were able to identify a region with high similarity, which we used to design the proposed qPCR primers in the development of the molecular diagnosis of IEA. The results generated in the qPCR reactions using the 122.2 primer are shown in Figures 3A and 3B, in which the melting curves and CTs of the amplicons generated when samples from positive and negative animals for EIA were tested, according to the tests serological tests previously performed. It was possible to characterize the points of the curve in which the CT corresponds to the amplification of the 180 bp amplified product as well as the melting curve with temperature between 83 and 85°C, which corresponds to the amplification of the expected product. The sample was considered negative if there was no amplification in this temperature range or if there was no overall amplification.

Among the negative samples that showed amplification (TM 760°C), 3 samples were selected for sequencing this amplicon. The same procedure was performed with 3 positive samples, which we considered positive by amplification (TM 83 to 85°C) and ct below 35.

The sequencing of the positive samples showed 95% identity with the gp90 protein of env.



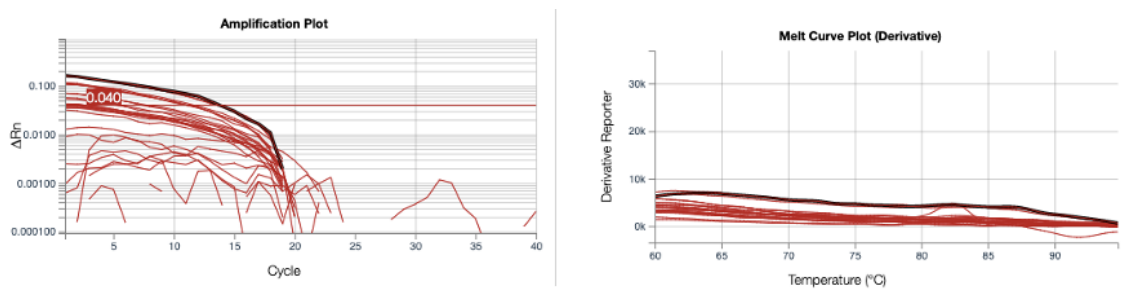


Figure 3 (A and B) – (A) Analysis of the melting curve and amplification curve of the AGID positive samples used in the qPCR reaction with the 122.2 primer. (B) Analysis of the melting curve and amplification curve of the AGID negative samples used in the qPCR reaction with the 122.2 primer.

The result of this sequencing proved the efficiency of the primer (122.2) to be used as a molecular test for EIA detection. From the data analysis, the ROC curve graphs were generated for validation of the molecular test. These data are shown in Figures 19 and the generated report showed an area of 0.879 and sensitivity values of 92.86% and specificity of 83.02% with a 95% confidence interval ($P < 0.0010$) from 0.788 to 0.941. Data were generated based on the serological diagnosis of the animals used in the study. That is, for the construction of the ROC curve we established as 0 negative cases and 1 positive cases of the EIA according to the AGID and/or Elisa tests in comparison with the results obtained in the qPCR. In the case of samples whose genome was identified through NGS or Sanger sequencing, the ROC curve was generated taking into account the relationship between the results obtained in the sequencing and the results of the qPCR. That is, in this case, it was established as 0 negative cases and 1 positive cases of the EIA according to the sequencing and qPCR results. The values presented by the ROC curve were 0.923 area of 100% specificity and sensitivity 88.24 with area under the curve and confidence interval ($P < 0.0010$) 0.783 to 0.995. The ROC curves produced are shown in figures 4A and 4B.

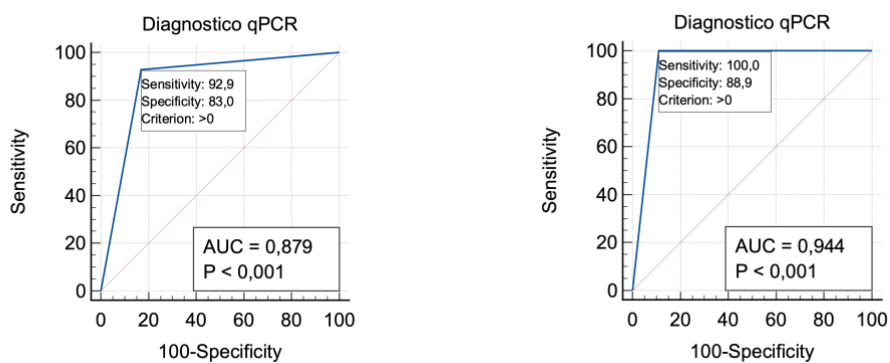


Figure 4A and 4B – Graph of the area under the ROC curve, which establishes the degree of certainty, specificity, sensitivity and accuracy of the molecular diagnostic test for EI proposed in the study. Results generated in MedCalc® Statistical Software version 20.109 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medclac.org>; 2022) accessed 11/10/22).

4. Discussion

Although EIAV represents a major threat to the equine population worldwide and compromises equine culture both economically and culturally, detailed knowledge about its molecular epidemiology is scarce. Currently, there are few complete EIAV genome sequences available in world databases and all these sequences were obtained from samples of naturally infected horses. Little knowledge about the EIAV genome hampers studies and possible control actions such as the development of molecular tests and advances in the production of drugs and possible vaccines. Indeed, the development of a molecular test for EIA has been a major challenge and many researchers and research groups have sought to develop molecular tests based on conventional PCR or real-time PRC. For example, Malossi et al. (2020) attempted to develop a qPCR assay to detect Equine Infectious Anemia virus in Brazilian samples of the virus that were isolated from animals in the Pantanal region. In this work, the researchers managed to completely sequence two Brazilian samples of EIAV and thus there was a great advance in the knowledge of the genomic profile of Brazilian samples and the development of the molecular

test had some advances, but it was still not enough to replace or complement the serological tests then used. Other works such as those by Cook et al. (2001; 2002), Costa et al. (2021), Romo I Saenz et al. (2021) and Cook et al. (2020) developed molecular detection assays for tat-gag, 5' regions. LTR-tat and LTR respectively. However, a qPCR assay that could efficiently identify a specific region to detect EIAV in Brazilian samples of EIA-positive animals has not yet been described. In

this work, thanks to the massive and parallel sequencing of Brazilian samples of EIAV, it was possible to identify a very specific and conserved region among all the isolates described so far, especially a region of the virus that is conserved even in a sample isolated from a donkey. From this region, a qPCR assay was designed, tested with SybrGreen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The assay was designed considering the ideal parameters for the development of effective primers, such as high CG content, impossibility of forming secondary structures within the proposed regions and between them, adequate size and correspondence with the same region detected in the sequencing, which corresponds to the env gene (gp45 glycoprotein) (unpublished data). The assay produced showed a high power of viral detection used together with the official serological tests should contribute to the early detection of positive cases of EIA and consequent control of the disease. The great importance of knowing more and more the molecular aspects of EIAV is that this study also allows a better understanding of the basis of the immune response to infection and the role of viral proteins in this process. Thus, recent studies suggest that diseases with cyclic episodes, observed during the chronic phase of EIA, are associated with distinct viral populations that can be distinguished as genomic and/or antigenic variants. These observations suggest that the cyclical nature of the chronic phase is linked to the production and selection of viral envelope variants (env), or immune escape mutants (Leroux et al., 2001). Antigenic escape mutants are viruses that, through mutations in surface proteins, produce persistent infections, allowing replication in a

host even in the presence of antibodies (Flores, 2007). These conclusions are supported by the analysis of surface protein sequences (SU – gp90) in horses and ponies during cyclic clinical episodes and the observed substitutions in 8 hypervariable domains of this glycoprotein (Zheng et al., 1997). SU analysis demonstrates that amino acid substitutions between different samples are distributed throughout the molecule except at the amino terminus. Another conserved feature is the presence of cysteine residues, suggesting that disulfide bonds are essential for the structural and functional integrity of the SU (Issel et al., 2014). The objective of this work to know the molecular aspects of genomic sequences of samples of Brazilian isolates of EIAV tries to attend to this primordially.

From the data generated in the NGS and the phylogenetic analysis between the EIAV gene fragments isolated from 8 horses and 6 donkeys and the described isolates whose genomes are available in databases, we conclude that there was a high phylogenetic relationship between the data generated in this work and the Brazilian samples of EIAV previously sequenced by Malossi et al (2020). With this discovery, it was possible to design specific primers, taking these complete sequences as a reference, to fill in the unsequenced regions of sample 122B in the NGS, thus completing the sequencing of this sample by means of Sanger sequencing (Sanger F., 1980). This sample is deposited at GenBank under accession number ON615427. It is a donkey isolate, which generated an unprecedented result, as there is, to date, no record of the complete genome sequence of the EIAV isolated from donkeys available in the databases. It is necessary to inform and clarify that the sequencing technique with probes enriched with proviral EIAV DNA is a very difficult task, since the equine genome becomes a criterion of confusion because it is very difficult to completely sequence the integrated viral genome. We must, therefore, think that genes are endogenized and present several SNPs naturally acquired in mutational events in the cell cycles of replication of infected cells. Furthermore, proviral DNA can integrate into hotspot regions of the host genome, which would increase the chance

of polymorphisms occurring in the virus sequences. Therefore, it is important to emphasize that together with the NGS analysis and later the sanger sequencing, an in-depth study of the genes was necessary, and some regions were predicted from the alignment with the Brazilian samples of the EIAV. This well represents the importance of increasing our knowledge about Brazilian isolates of the virus, remembering once again that the regional clonality of this virus was evident in this study. It is worth mentioning, therefore, that massive and parallel sequencing of EIAV isolates would have a greater chance of success if performed from viral RNA obtained from equine blood.

The analysis of the result of the complete sequence of the sample 122B (ON615427) it was possible to identify the genes *tat*, *gag*, *pol*, *s2*, *env*, *rev* and the UTR region in the 3' terminal position. For each gene region identified in the alignments, the nucleotide transcription analysis (Blastn) and the analysis of the result of the possible translation of this sequence into mRNA (Blastx) were performed. In all sequences, conserved motifs of proteins that make up the EIAV genome were identified. And all Blastx and Blastn analyzes identified a percentage of identity greater than 89%, always related to the BRA1 and BRA2 samples of Brazilian EIAV isolates. Once again, we can establish the phylogenetic relationship between Brazilian samples of EIAV and its regional clonality, which has already been described and discussed in several works (Quinlivan, Cook, Kenna, Callinan, & Cullinane, 2013; Gaudaire, et al., 2016); Malossi et al., 2020). Separate analysis of each sequenced gene identified 7 ORFS. ORFs 1 and 2 correspond to the 1191 nucleotide region of the *gag* gene and encode 395 amino acids of the polyprotein. When compared with the world sequences, the 122B *gag* sequences showed an identity greater than 90% with the BRA1 and BRA2 samples. ORFs 3 and 4 correspond to the *pol* gene, which has 888 nucleotides that encode 374 amino acids. In comparison with the other sequences available and used in this study, we observed an identity of 70 to 76% against BRA1 and BRA2 isolates. ORFs 5, 6 and 7 correspond to the *env*

gene sequence and have 2061 nucleotides and 685 amino acids. This gene showed 77.12% similarity between the BRA1 and BRA2 sequences and at least 57.33% identity with other samples.

The complete sequence ON 615427 was compared with the EIAV samples available in databases, and phylogenetic analysis was performed between the complete sequences and their genes as follows.

The analysis of the phylogenetic tree constructed from the complete sequence of 122B (ON615427) and the other available sequences demonstrated, once again, the presence of well-defined clades and the sample of 122B was grouped with the samples of Brazilian viruses and they are phylogenetically distant of the other samples. Although the sample was isolated from a donkey, there was still a high rate of identity and similarity between the isolates. It is also possible to infer that isolate 122B is phylogenetically closer to isolate BRA1 (GenBank reference number MN560970.1). With the data obtained in this work, we were able to identify a highly conserved region within the env gene (gp45) not only conserved among EIAV isolates in the world and not only among Brazilians. a sample whose sequences are available. Phylogenetic analysis performed from the alignment of these 450 base pair sequences for all isolates described so far showed 72 to 99% identity. Within this region, a more conserved sequence of 200 base pairs still corresponding to the gene env (gp45) showed 98 to 100% identity between the isolates.

With the results obtained from the complete sequence of the first EIAV sample isolated from a donkey and the identification of part of the conserved region of the gene that encodes gp45, we hope to contribute not only to the development of a new diagnostic procedure that overcomes the difficulties of serological tests, but also for a future vaccine or treatment design aimed at EIA.

Acknowledgments

The authors thank all the members of the Laboratory of Basic and Applied Virology and Retroviruses Laboratory (Retrolab) that have encouraged and contributed to the critical review of this article.

Funding

AAOP received support from Programa de Pós-graduação em Microbiologia (PPGM/ICB/UFMG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). FGF, JKPR, JGACdR, and EFBS thank the CNPq for the PQ fellowships program. The authors thank the Programa de Pós-graduação em Microbiologia (PPGM/ICB/UFMG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for masters, doctoral and post-doctoral fellowships to AAOP (PhD), ALR (Ms), DSODES (PostDoc), LAFA (PostDoc), TFSM (PhD).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo.*, v.58, p.141-148, 2006.
2. APPLIED BIOSYSTEMS, User Bulletin #2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Disponível em: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf. Acesso em: Julho de 2015.
3. ARAGUAIA, M. Portal da Educação. Disponível em <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/burro.htm>. Acesso em Janeiro de 2022.
4. BOLFA, P. F.; LEROUX, C.; PINTEA, A. et al. Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *Vet*, v.192, n.3, p.449–54, 2012.
5. BOLFA, P. F.; NOLF, M.; CADORE, J. L. et al. Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Vet Res*, v. 44, n.113, 2013.
6. BOLFA, P.; BARBUCEANU, F. LEAU, S.-E et al. Equine infectious anaemia in Europe: Time to re-examine the efficacy of monitoring and control protocols? *Equine Veterinary Journal*, p. 1-3, 2015.
7. BORGES, A. M.; SILVA, L. G.; NOGUEIRA, M. F. et al. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Pocone municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in veterinary science*, 95(1):76-81, 2013.
8. BRASIL. Instrução Normativa No 45, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina – AIE. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária*, Brasília, DF 07 jul. 2004. Seção 1, p. 7-9.

9. BRASIL. Portaria No 378, de 17 de dezembro de 2014. Anexo – Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de anemia infecciosa equina. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária*, Brasília, DF 19 dez. 2014. Seção 1, p. 136.
10. BRINDLEY, M. A.; ZHANG, B.; MONTELARO, R. C.; MAURY, M. Na Equine infectious anemia virus variant superinfects cells through novel receptor interactions. *J. Virol*, v. 82, p. 9425 – 9432, 2008.
11. BURDEN, F.; THIEMANN, A. Donkeys are different. *J. Equine Vet. Sci.* **2015**, *35*, 376–382. [[CrossRef](#)]
12. MATTHEWS, N.; VAN LOON, J.P.A.M. Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. *Equine Vet. Educ.* **2013**, *25*, 47–51. [[CrossRef](#)]
13. FAO. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> (accessed on 11 May 2020).
14. CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COOK, R.F. et al. Molecular detection, Epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of Equine Infectious Anemia Virus. *L. Clin. Microbiol.* V.49, n.1, p.27-33, 2011.
15. CAPPELLI 2017
16. CARPENTER, S.; CHESEBRO, B. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus, *J. Virol.* v.63, p.2492–2496, 1989.
17. COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet*, n.60, p.330, 1970.
18. COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; NUSBAUM S. R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *American Journal of Veterinary Research*, v.33, n.1, p.11-18, 1972.

19. COOK, R. F.; BERGER, S. L.; RUSHLOW, K. E. et al. Enhanced Sensitivity to Neutralizing Antibodies in a Variant of Equine Infectious Anemia Virus Is Linked to Amino Acid Substitutions in the Surface Unit Envelope Glycoprotein. *J. of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1493 – 1499, 1995.
20. COOK, R. F.; LEROUX, C.; COOK, S. J. et al. Development and Characterization of an In Vivo Pathogenic Molecular Clone of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*. v.72, n.2, p.1383-1393. 1998.
21. COOK, S. J.; COOK, R. F.; MONTELARO, R. C.; ISSEL, C. J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet. Microbiol.*; v.79, n.2, p.93-109, 2001.
22. COOK, R. F.; COOK, S. J.; Li, F. et al. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol Meth.*; v.105, p.171-179, 2002.
23. COOK, R. F.; COOK, S. J.; BERGER, S. L. et al. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virology*, n. 313, p. 588-603, 2003.
24. COOK, R. F.; COOK S. J.; ISSEL, C. J. Infectious diseases of the horse: Equine Infectious Anaemia. In. MAIR, T.S. and HUTCHINSON R.E. *Eq. Vet. J. Cambridgeshire*, p. 56-70, 2009. COOK, R. F.; LEROUX C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Vet. Microbiol.* v.167 n. 1-2, p.181-204, 2013.
25. COSTA, L. R.; SANTOS, I. K.; ISSEL, C. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha production and disease severity after immunization with enriched major core protein (p26) and/ or infection with equine infectious anemia virus. *Vet Immunol Immunopathol*, v.57, n. 1–2, p.33–47, 1997.

26. COVALEDA, L.; FULLER, F. J.; PAYNE, S. L. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine response in infected macrophages. *Virology*, v. 397, p. 217 – 223, 2010.
27. CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious, anemia virus infection and immunity. *Viruses*, v. 5, n. 12, p. 2963– 2976, 2013.
28. CRAIGO, J. K.; DURKIN, S.; STURGEON, T. J. et al. Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. *Vaccine*, v.25, n.5, p.834–45, 2007.
29. CULLINANE, A.; QUINLIVAN, M.; NELLY, M. et al. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet. Rec.*; v.161, p. 647-652, 2007.
30. DESROSIERS, R. C. Nonhuman lentiviruses. In.: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & WilKins, Philadelphia, p. 2215, 2007.
31. DONG, J. B.; ZHU, W, COOK, R. F. et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch. Virol.*; v.157, n.11, p.2105-2111, 2012.
32. DONG, J.B., ZHU,W., COOK,F.R., GOTO,Y., HORII,Y. AND HAGA,T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. *J. Gen. Virol.* 94 (PT 2), 360-365 (2013)
33. HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; LICHTENSTEIN, D. L. et al. Maturation of the Cellular Anemia Virus Is a Complex and Lengthy Process. *Journal of Virology.* v.71, n.5, p.3840-3852, 1997.
34. HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; FALO, L. D. et al. A Particulate Viral Protein Vaccine Reduces Viral Load and Delays Progression to Disease in Immunized Ponies Challenged with Equine Infectious Anemia Virus. *Virology.* n.254, p.37-49, 1999.

35. HAMMOND, S. A.; RAABE, M. L.; ISSEL, C. J. et al. Evaluation of antibody Parameters as Potential Correlates of Protection or Enhancement by Experimental Vaccines to Equine Infectious Anemia Virus. *Virology*. n.262, p.416-430. 1999.
36. HAMMOND, S. A.; LI, F.; MCKEON, B.M. et al. Immune Responses and Viral Replication in Long-Term Inapparent Carrier Ponies Inoculated with Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 5968-5981, 2000.
37. HINES, R.; MAURY, W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus, *J. Virol. Methods* v.95, p.47–56, 2001.
38. HUANG, X. and MADAN, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**, 868-877.
39. ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. *J. Am. Vet. Med. Ass*, v.174, n.7, p. 727-733, 1979.
40. ISSEL, C. J; ADAMS, W. V. J. Detection of equine infectious anemia virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, n.3, p. 276-278, 1982.
41. ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 184, n. 3, p.293-297, 1984.
42. ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diag. Invest.* v.5, p. 137-141, 1993.
43. ISSEL, C. J.; COOK, S. J.; COOK, R. F. et al. Optimal paradigms for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Eq. Vet. Sci.*; n.19, v.11, p.728-732, 1999.
44. ISSEL, C. J.; SCICLUNA, M. T.; COOK, S. J. et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Rec.*; v. 172 n.8 210, 2012.

45. ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; MEALEY, R. H. et al. Equine Infectious Anemia in 2014: Live with it or eradicate it? *Vet Clin Equine*, v.30, p.561-577, 2014.
46. ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasties. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*; v. 34, n. 2, p. 513-523, 2015.
47. KONO, Y.; KOBAYASHI, K. Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* v.10, p.106–112, 1970.
48. KONO, Y.; YOSHINO, T. Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures, *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo) 14, 155–162, 1974.
49. KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FURUNAGA, Y. et al. Recrudescence of Equine Infectious Anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*; v.16, p. 8- 15, 1976.
50. LEROUX, C.; CADORE, J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary research.* v. 35, n.4, p.485-512, 2004.
51. LI, F.; LEROUX, C.; CRAIGO, J. K. et al. The S2 gene equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. *Journal of Virology*, v. 74, n.1, p. 573-579, 2000.
52. LI, F.; PUFFER, B.A.; MONTELARO, R. The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus Is Dispensable for Viral Replication In Vitro. *Journal of Virology.* v.72, n.10. 1998.
53. LIN, Y. Z.; CAO, X. Z.; LI, L. et al. The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression. And apoptosis in macrophages. *Virus Research*, v. 160, p. 274 – 282, 2011.

54. LIN, Y.Z.; YANG, F.; ZHANG, S.Q. et al. The soluble form of the EIAV receptor encoded by an alternative splicing variant inhibits EIAV infection of target cells. *Plos one*. v.8, n.11, 2013.
55. MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J. et al. Regulation of macrophage activation. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 60, 2334–2346, 2003.
56. MA, J.; WANG, S. S.; LIN, Y. et al. An attenuated EIAV strain and its molecular clone strain differentially induce the expression of Toll-like receptors and type-I interferons in equine monocyte-derived macrophages. *Vet. Microbiol.*; v. 166, p. 263- 269, 2013.
57. MALOSSI, C.D., FIORATTI,E.G., CARDOSO,J.F., MAGRO,A.J., KROON,E.G.,AGUIAR,D.M., BORGES,A.M.C.M., NOGUEIRA,M.F., ULLMANN,L.S. ARAUJO,J.P. JR. High Genomic Variability in Equine Infectious Anemia Virus Obtained from Naturally Infected Horses in Pantanal, Brazil: An Endemic Region Case. *Viruses* 12 (2), E207 (2020)
58. MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus, *J. Virol.* v.68, p.6270–6279, 1994.
59. MAURY, W. Regulation of Equine Infectious Anemia Virus Expression. *Journal of Biomedical Science.* n.5, p.11-23. 1998. (a)
60. MAURY, W.; OAKS, J. L.; BRADLEY, S. Equine Endothelial Cells Support Productive Infection of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology.* v.72, n.11, p.9291-9297. 1998. (b)
61. 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.

62. MEALEY, R. H.; SHARIF, A.; ELLIS, S. A. et al. Early detection of dominant Env-specific and subdominant *Gag*-specific CD81 lymphocytes in equine infectious anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Virology*; v.339, n.1, p.110–26, 2005.
63. 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.*
64. MONTELARO, R. C.; COLE, K. S.; HAMMOND, S. A. Maturation of Immune Responses to Lentivirus Infection: Implications for AIDS Vaccine Development. *AIDS Research and Human Retroviruses. v.14, s.3, 1998.*
65. MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus, *J. Biol. Chem.*; v.259, p.10539–10544, 1984.
66. NAGARAJAN, M. M.; Simard, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, v.94 n.1-2p. 97-109, 2001.
67. OAKS, J. L.; MCGUIRE, T. C.; ULIBARRI, C. et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection, *J. Virol.* v.72, p.7263–7269, 1998.
68. OAKS, J. L.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T. B.; Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus, *J. Gen. Virol.* v.80, p.2393– 2397, 1999.
69. PERRYMAN, L. E.; MCGUIRE, T. C.; BANKS, K. L. et al. Decreased C3 levels in a chronic virus infection: equine infectious anemia. *J Immunol*, v.106, n.4, p.1074–8, 1971.

70. 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, n.8, p.3073–6, 1988.
71. PETROPOULOS, C.J. Appendix 2: Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps. (in) Coffin, J.M. (Ed.); *RETROVIRUSES: 757*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA (1997)
72. QUINLIVAN, M.; COOK, R. F.; CULLINANE, A. 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. *The Veterinary record*, p.160, n.18, p.611-618, 2007.
73. QUINLIVAN, M., COOK, F., KENNA, R., CALLINAN, J.J. and CULLINANE, A. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. *J. Gen. Virol.* 94 (PT 3), 612-622 (2013)
74. REIS, J. K. P.; DINIZ, R. S.; HADDAD, J. P. et al. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *J. Virol Meth.*; v. 180, n. 1-2, p. 62-67, 2012.
75. REIS, J. K. P.; COOK, R. F. Anemia Infeciosa Equina: um problema ainda a ser resolvido. *Revista Vez em Minas. Ano XXIII*, v.23, Out./Nov./Dez.; 2014.
76. RWAMBO, P. M.; ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V. et al. Equine infectious anemia virus (EIAV) humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Arch Virol*, v.111, n. 3–4, p.199–212, 1990.
77. RWAMBO, P. M.; ISSEL, C. J.; HUSSAIN, K. A. et al. In vitro isolation of a neutralization escape mutant of equine infectious anemia virus (EIAV). *Arch Virol*, v. 111(3–4), 275–80, 1990.

78. SCICLUNA, M. T.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F. et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Vet. Microbiol.* v. 165, n. 1-2, p.123-34, 2013.
79. STECHER G, TAMURA K, and KUMAR S (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*(<https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>).
80. SCOTT, V. L.; BOUDREAUX, C. E. B. S.; LOCKERTT, N. N. M. S. et al. Cytokine Dysregulation in Early- and Late-Term Placentas from Feline Immunodeficiency Virus (FIV)- infected Cats. *Am. J. Reprod. Immunol.*; v. 65, n. 5, p. 480 – 491, 2011.
81. SELLON, D.C. Equine infectious anemia. *Vet. Clin. N. Am. Equine Practice.*; v.9, n.2, p.321- 336, 1993.
82. SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res.* v.32, 111, 1993.
83. SELLON, D.C.; RUSSELL, K.E.; MONROE, V.L.; et al. Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. *Res.Vet. Sci.* v.66, 77, 1998.
84. SHEN, R.X. Development and use of an equine infectious anemia Donkey leucocyte attenuated vaccine. *Proceedings of the international symposium on immunity of equine infectious anemia*, 1983.
85. SHEN, R.; WANG, Z. Development and use of an equine infectious aneamia donkey leukocyte attenuated vaccine. EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives. American Quarter Horse Association, Amarillo, pp 135–148, 1985.
86. SILVA, C. F.; PEQUENO, N. F.; CLEMENTINO, I. J. et al. Frequency of equine infectious anemia in equine in the states of Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará,

- Northeastern Brazil during 2010. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, n.1, p.12-17, 2013.
87. SIMON, V.; BLOCH, N.; LANDAU, N. R. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol.*; v. 16, n. 6, p. 546 – 553, 2015.
88. TORIBIO, R.E. Dear Donkey and Mule: You Deserve More Appreciation and Better Medicine. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2019**, 35, 13–14. [[CrossRef](#)]
89. TU, Y.B., ZHOU, T., YUAN, X.F., QIU, H.J., XUE, F., SUN, C.Q., WANG, WU, D.L., PENG, J.M., KONG, X.G. and TONG, G.Z. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus
90. *Arch. Virol.* 152 (1), 209-218 (2007).
91. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Equine Infectious Anaemia In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Paris: OIE, 2008. Vol.2. Chapter 2.5.6, p. 866-870.
92. YIN, X.; HU, Z.; GU, Q. et al. Equine tetherin blocks retrovirus release and its activity is antagonized by equine infectious anemia virus envelope protein. *J Virol*; v.88, n.2, p.1259–70, 2014. (a)
93. YIN, X.; GUO, M.; GU, Q. et al. Antiviral potency and functional analysis of tetherin orthologues encoded by horse and donkey. *Virology Journal*, v.11, n. 151, 2014. (b)
94. ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J. et al. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.28, p.9918–23, 2005.
95. ZHANG, B.; SUN, C.; JIN, S. et al. Mapping of equine lentivirus receptor 1 residues critical for equine infectious anemia virus envelope binding. *J. Virol.* v. 82, p. 1204-13, 2008.

96. ZHENG, Y.H.; SENTSU, H.; NAKAYA, T. et al. In vivo dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes: insertions/duplications at the principal neutralizing domain. *J Virol*, v.71, n.7, 5031–9, 1997.
97. ZHENG, Y. Q.; JEANG, K. T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, v. 9, n. 112, 2012.