

Elizangela Maira dos Santos

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM PBMC
E LAVADO BRONCOALVEOLAR PARA O DIAGNÓSTICO DA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA**

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

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
UFMG- Escola de Veterinária
2006

S237a Santos, Elizangela Maira dos Santos, 1978–
Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) em PBMC
e lavado broncoalveolar para o diagnóstico da anemia infecciosa eqüina /
Elizangela Maira dos Santos. – 2006.
36 p. :il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Eqüino – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa eqüina – Teses.
3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson
Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 969 2

Assinaturas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela oportunidade e pela força para persistir.

Aos meus pais Walter Delcínio dos Santos e Eva Faria dos Santos por todo apoio, amor e ensinamentos.

Ao meu querido irmão Demétrius pela amizade e companheirismo desde criança.

À tia Marlene por todo carinho e amizade.

Ao meu orientador, Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, pelos ensinamentos e incentivo.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite por toda ajuda.

À Professora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG pelas sugestões e estímulo.

Ao Dr. Marcelo Fernandes Camargos e aos funcionários do LARA/MG, por toda ajuda e boa vontade.

Às funcionárias do Instituto Mineiro de Agropecuária Marilda e Valéria, e a todos os funcionários do Laboratório de Saúde Animal.

Ao Dr. Bongy Meira do frigorífico Mayza de Itaobim-MG.

Aos fiscais federais agropecuários Dr. Valmir Tunala e Jean Felipe Celestino Gouhie do frigorífico Pomar de Araguari-MG.

Às amigas Juliana e Bárbara, por todo companheirismo e apoio.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que colaboraram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho.

“A vida é a viagem, a idéia é o itinerário. Sem itinerário, pára-se. Perdido o alvo, morre a força. A sorte é um obscuro poder discricionário. Pode bater com as suas vergastas o nosso ser moral. O desespero é quase a destituição da alma. Só os grandes espíritos resistem. E ainda assim...” Victor Hugo.

“A ciência pode classificar e nomear os órgãos de um sabiá, mas não pode medir seus encantos. A ciência não pode calcular quantos cavalos de força existem nos encantos de um sabiá.” Manoel de Barros.

SUMÁRIO

		Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS		8
	RESUMO	9
	ABSTRACT	9
1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1.	Histórico da Anemia Infecciosa Equina	11
2.2	Estágios da doença e infecção	11
2.3	Transmissão	12
2.4	Replicação e Viremia	13
2.5	Genoma do EIAV	13
2.6	Varição Genética e Antigênica	14
2.7	Controle Imunológico	14
2.8	Diagnóstico da AIE	15
2.9	Controle da AIE	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Coleta das Amostras	17
3.2	Processamento das Amostras	19
3.2.1	Extração do DNA genômico	19
3.3	Testes Sorológicos	19
3.3.1	ELISA rgp90	19
3.3.2	Imunodifusão em Gel de Ágar	20
3.4	Amplificação do DNA por PCR gp90	20
3.5	Amplificação do DNA por nested PCR gag	20
3.6	Amplificação do DNA por PCR β-Actina	21
4.	RESULTADOS	21
5.	DISCUSSÃO	27
6.	CONCLUSÕES	29
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1.	Coleta das amostras de LBA	17
Figura 2.	Produtos amplificados pela nPCR gag de amostras de LBA purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio	22
Figura 3.	Produtos amplificados pela nPCR gag de amostras de PBMC purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio	23
Figura 4.	Produtos amplificados pela PCR β -Actina de amostras de LBA e PBMC purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio	24
Figura 5.	Produtos amplificados pela PCR gp90 de amostras de LBA, PBMC e plasmídeo PDS-56 em várias quantidades, purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio	25

Figura 6.	Produtos amplificados pela PCR gp90 com variadas quantidades de DNA proveniente de PBMCs purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio	26
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados comparativos entre ELISA e IDGA	21
Tabela 2.	Resultados comparativos entre IDGA e nPCR gag.....	22
Tabela 3.	Resultados da PCR β -Actina.	23
Tabela 4.	Resultados IDGA X PCR gp90	24

LISTA DE ABREVIATURAS

AIE	Anemia Infecciosa Eqüina
CECAIE-MG	Comissão Estadual de Controle da AIE em Minas Gerais
CNAIE	Comissão Nacional de Anemia Infecciosa Eqüina
DDSA	Divisão de Defesa Sanitária Animal
EIAV	Vírus da Anemia Infecciosa Eqüina
EIAV Wyo	EIAV Wyoming
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIV	Vírus da Imunodeficiência dos Felinos
HI	Inibição da Hemaglutinação
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão em Gel de Àgar
LBA	Lavado Broncoalveolar
nPCR	Nested PCR
OPD	Ortofenilenodiamino
PBMC	Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tamponada)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rgp90	Proteína gp90 recombinante
SIV	Vírus da Imunodeficiência dos Símios
β -Actina	Beta-Actina

RESUMO

O vírus da Anemia Infecciosa Eqüina (EIAV) é um Retrovírus causador da Anemia Infecciosa Eqüina, uma enfermidade que acomete somente animais da família *Eqüidae*. No presente estudo foram avaliadas técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) como diagnóstico confirmatório para os testes sorológicos ELISA e IDGA. Foram analisadas amostras de lavado broncoalveolar (LBA), células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e soro, provenientes de eqüídeos com resultados positivos na IDGA encaminhados ao abate em frigoríficos de MG. Amostras de DNA provenientes do LBA e PBMCs foram submetidas à amplificação pela PCR β -Actina, nPCR gag e PCR gp90. A PCR β -Actina mostrou ser um controle eficiente da qualidade do DNA genômico submetido às demais técnicas. A PCR gp90 não foi capaz de amplificar amostras brasileiras do DNA proveniente de PBMCs e LBA de animais positivos para AIE. A nPCR gag mostrou ser eficiente em amplificar seqüências virais em amostras de PBMCs, podendo ser utilizada como diagnóstico confirmatório ou complementar para técnicas sorológicas.

Palavras chave: EIAV; testes sorológicos; PCR; PBMC; LBA.

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) is a retrovirus that causes Equine Infectious Anemia, a disease that strikes animals from family *Eqüidae*. In the present study, PCR (polymerase chain reaction) techniques were evaluated as a confirmation test for ELISA serologic tests and IDGA. Samples of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum from IDGA-positive equids that were slaughtered in cold storage plants were analyzed. DNA samples from BALF and PBMCs were submitted to amplification by β -Actin PCR, gag nPCR and gp90 PCR. β -Actin PCR was found to be an efficient quality control resource for genomic DNA submitted to the other techniques. gp90 PCR was not able to amplify the Brazilian samples of DNA from BALF and PBMCs from AIE-positive animals. gag nPCR was efficient in the amplification of viral sequences in PBMCs samples and can be utilized as a confirmation diagnostic test for serologic techniques.

Key-words: EIAV, serologic tests, PCR; PBMC; BALF.

1. INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma enfermidade que acomete somente animais da família *Eqüidae* (eqüinos, muares e asininos), causada pelo vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) pertencente ao gênero *Lentivirus*, e à família *Retroviridae* (Van Regenmortel et al., 2000).

A doença é mais prevalente em áreas geográficas de clima quente e úmido, refletindo a importância da transmissão por insetos tabanídeos hematófagos da ordem *Diptera*, e apresenta distribuição cosmopolita (Issel e Coggins, 1979).

A AIE não tem tratamento nem vacina eficaz, portanto o seu controle é feito através do diagnóstico laboratorial com a identificação, isolamento e sacrifício ou segregação dos animais soropositivos (Issel e Coggins, 1979).

A Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) é o teste oficial para diagnóstico da AIE em todo o mundo. Apesar de ser usado em larga escala, o IDGA apresenta algumas limitações, dentre elas a incapacidade de detectar anticorpos específicos nos estágios iniciais da infecção, comprometendo as medidas de controle e erradicação da doença (Reis et al., 1994; Reis, 1997).

A técnica de ELISA competitivo (CELISA), que também detecta anticorpos específicos para a proteína p26, tem sido utilizada com sucesso por muitos pesquisadores, apresentando grande correlação com resultados obtidos na IDGA (Matsushita et al., 1989).

O teste ELISA indireto com a proteína recombinante rgp90 permite detectar a maioria dos cavalos infectados com resultados negativos pelo teste IDGA, que utiliza a proteína p26 como antígeno (Reis, 1997). Este teste mostrou ser um método sensível para detectar anticorpos anti-EIAV, podendo ser realizado em larga escala com resultados obtidos dentro de 4 a 5 horas. Anticorpos contra a gp90 (glicoproteína da

superfície externa do EIAV) são precocemente detectados em animais infectados e em altos títulos. O uso da rgp90 contribui para o aumento da sensibilidade do ELISA, podendo servir como uma alternativa ao IDGA para o diagnóstico da AIE, já que permite detectar a maioria dos eqüídeos infectados não reagentes ao IDGA (Reis, 1997; Martins, 2004).

Apesar de ser contestada por alguns autores (Hartley e Rashtchian, 1993; Campbell e Robinson, 1998; Belak et al., 2001; Bastien et al., 2003; Bienzle et al., 2004), a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido proposta como teste confirmatório para doenças causadas por vírus, incluindo o EIAV (Langemeier et al., 1996; Nagarajan e Simard, 2001; Camargos et al., 2005). A PCR para detecção do DNA proviral do EIAV é sensível e específica não só para identificar eqüídeos em estágio subclínico, como também animais recentemente infectados em processo de montagem de resposta imune, e potros com anticorpos colostrais anti-EIAV, que interferem nos testes sorológicos (Toma, B., 1980; McConnell et al., 1983; Issel et al., 1985; Issel e Cook, 1993).

Vários pesquisadores têm obtido sucesso com técnicas de PCR em amplificar seqüências específicas no genoma do EIAV e de outros vírus, apontando a PCR como metodologia altamente específica e sensível frente aos testes sorológicos utilizados para diagnóstico das doenças infecciosas (Kim e Casey, 1994; Langemeier et al., 1996; Nagarajan et al., 2001; Cook et al., 2002). Apesar disso, vários trabalhos apontam o contrário, contestando a sensibilidade da técnica devido ao grande número de resultados negativos obtidos com amostras de animais com sorologia positiva, demonstrando baixa concordância entre resultados de testes sorológicos e a PCR, resultados falso-positivos, ou até mesmo por falhas na reprodutibilidade da técnica (Bienzle et al., 2004; Hirsch, 2005; Camargos, 2005).

O sítio primário de replicação do EIAV em eqüídeos são células da linhagem monócito-

macrófago (Montelaro et al., 1993), e os principais sítios de replicação viral ativa constituem os macrófagos do baço, fígado, linfonodos e pulmão (Harrold et al., 2000). Achados citológicos em amostras de lavado broncoalveolar (LBA), determinam que o tipo celular predominante são os macrófagos alveolares, seguido deles, os mais abundantes são linfócitos. Neutrófilos, eosinófilos e mastócitos são observados em números inferiores (Dyer et al., 1983; Ainsworth et al., 2002; Ainsworth et al., 2003; Mori et al., 2003).

As informações mencionadas acima motivaram o estudo comparativo das técnicas de ELISA rpg90, IDGA e PCR, com a utilização de amostras sorológicas, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), e amostras de células da linhagem monócito-macrófago provenientes do pulmão, através da coleta de lavado broncoalveolar (LBA).

No presente trabalho, a utilização de amostras do lavado broncoalveolar está sendo pela primeira vez avaliada em pesquisas sobre o EIAV, além disso, trata-se de um material biológico com abundância em células alvo do vírus.

Os resultados obtidos a partir do ELISA e das técnicas de PCR com as amostras de DNA provenientes de PBMCs e LBA, foram comparados com os resultados da técnica de IDGA, por se tratar do exame oficial de diagnóstico para AIE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Histórico da Anemia Infecciosa Equina

A AIE foi descrita como doença infecciosa dos eqüídeos em 1843 na França, e foi estabelecida sua etiologia viral em 1904 (Lignée, 1843 citado por Montelaro et al., 1993). A enfermidade foi constatada pela primeira vez no Canadá no ano de 1881, sendo em 1896 diagnosticada em muitas regiões dos Estados Unidos (Byrne, 1966).

Em 1960 a AIE foi descrita na Venezuela, e em 1964 na Argentina, sendo detectada no Brasil pela primeira vez em 1968 nos animais instalados no Jockey Club Brasileiro localizado no extinto Estado da Guanabara (Dupont et al., 1968).

No estado de Minas Gerais o primeiro caso foi diagnosticado em 1968 na Vila Hípica de Belo Horizonte, mas somente em 1971 resultados com base em exames clínicos, anátomo-patológicos e laboratoriais foram publicados (Batista Júnior e Fonseca, 1971).

A partir de 1968 foram implementadas medidas de ordem sanitária pela Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Foram adotadas restrições de trânsito, inclusive aos eqüídeos destinados ao abate, e sacrifício de todos animais doentes diagnosticados pelos exames disponíveis na época, como o teste de sideroleucócitos e o de inoculação de sangue suspeito em eqüídeo susceptível. (Anemia ___ Boletim de Defesa Sanitária Animal, 1974)

Foi aprovado em 1974 o emprego do teste de Coggins (IDGA) como exame oficial para AIE (Coggins e Norcross, 1970) sendo bem aceito pela comunidade científica.

Atualmente a AIE é considerada uma enfermidade endêmica em Minas Gerais, com uma prevalência de 5,29% para rebanhos e de 3,08% para animais de serviço, sendo consideradas as áreas Norte, Noroeste, Vale do Mucuri e Jequitinhonha as de maior prevalência no Estado (Almeida, 2005).

2.2- Estágios da doença

O curso clínico da AIE é variável, pois é dependente da dose e virulência do estrato viral infectante e da susceptibilidade individual do hospedeiro (Kemeny et al., 1971). Apesar disso, a resposta clínica dos eqüídeos seguida por infecção natural ou experimental com o EIAV pode ser dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente.

A fase aguda é caracterizada por febre, anorexia, e pronunciada viremia resultante de uma extensiva replicação viral nos macrófagos teciduais ou periféricos e possui duração de 5 a 30 dias pós-infecção (McGuire et al., 1971). Nesta fase da doença o diagnóstico sorológico pode gerar resultados negativos, devido à ausência ou ao baixo título de anticorpos específicos que aparecem geralmente por volta do décimo ao décimo quarto dia pós-infecção (Coggin et al., 1972).

Uma das características mais marcantes deste estágio da doença é a trombocitopenia associada à febre que precede o aparecimento dos anticorpos. Estes sintomas iniciais da doença geralmente desaparecem dentro de poucos dias, contudo, uma pequena porcentagem dos animais infectados pode desenvolver forma grave e fatal da AIE. Poucos animais desenvolvem um quadro inaparente da doença após essa fase inicial, e a maioria progride para a fase crônica (Crawford et al., 1978).

A fase crônica da AIE é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia que é associada aos sintomas clínicos incluindo febre, anorexia, edema, leucopenia, anemia, trombocitopenia, hemorragias, diarreia, glomerulonefrite e letargia. Cada episódio clínico tem duração média de 3 a 5 dias, e o intervalo entre os ciclos da doença é irregular podendo ser de semanas à meses.

A frequência e gravidade dos episódios da doença usualmente diminuem com o tempo, e após uma média de 6 a 8 episódios clínicos o estágio crônico da AIE termina dentro de um ano pós-infecção. A maioria dos eqüídeos infectados que sobrevivem às fases aguda e crônica, tornam-se portadores inaparentes do vírus por toda a vida (Montelaro et al., 1993).

A maioria dos eqüídeos EIAV-positivos encontrados na natureza estão na fase inaparente da AIE. Estes animais não apresentam sinais clínicos da doença, e a viremia no plasma é insignificante. Apesar disso, estes animais continuam sendo portadores do vírus, e são considerados

principais fontes de infecção para os animais susceptíveis (Montelaro et al., 1993).

Achados científicos indicam que a replicação viral, e a doença nesta fase da infecção pelo EIAV estão sob controle do sistema imunológico do hospedeiro eqüídeo apesar dos mecanismos de escape empregados pelo vírus para manter a persistência (Montelaro et al., 1993; Hammond et al., 2000; Howe et al., 2002).

2.3- Transmissão

O sangue de cavalos contaminados é a principal forma de infecção para animais susceptíveis, e a transmissão da doença envolve a transferência desse material biológico (Issel e Foil, 1984).

As condições ecológicas, a população de insetos hematófagos, e a densidade demográfica de eqüídeos são fatores que determinam a difusão da doença na natureza (Issel et al., 1988a).

A importância do proprietário ou veterinário na indução da infecção através de agulhas contaminadas e instrumentos cirúrgicos deve ser enfatizada, pois o uso múltiplo de fômites contaminados sem desinfecção de um animal para outro tem sido responsável por alguns surtos da doença. Resultados de estudos sobre a sobrevivência do EIAV em agulhas, indicam que este vírus permanece infectivo por até 96 horas (Williams et al., 1981).

Os artrópodes vetores do EIAV pertencem à ordem *Diptera*, sendo os tabanídeos (*Tabanus sp*) os maiores responsáveis pela difusão da doença. Nos vetores, o EIAV permanece vivo por um período de 30 minutos a 4 horas, de modo que o inseto deve completar o repasto sanguíneo, que foi interrompido em um animal contaminado, rapidamente em um animal susceptível para que haja transmissão da doença (Hawkins et al., 1976).

A transmissão da AIE pode também ocorrer através da placenta em éguas com viremia

que infectam o feto ao nascer. Além desta forma de transmissão, foi detectado o EIAV no sêmen de garanhões com sinais agudos da doença, sendo teoricamente possível a transmissão venérea (Issel et al., 1990).

2.4- Replicação e viremia

O ciclo de replicação dos retrovírus permaneceu desconhecido até 1970 quando Temin e Mizutani descreveram a enzima transcriptase reversa, confirmando a hipótese de que o ciclo de replicação incluía uma forma intermediária de DNA que foi denominada provírus.

O alvo primário do EIAV *in vivo*, são células da linhagem monócito/macrófago, contudo tem sido recentemente relatado uma limitada infecção em células endoteliais macrovasculares, nos tecidos renais de cavalos portadores inaparentes (Maury et al., 1998). A infecção de monócitos do sangue com o EIAV, resulta em uma infecção não produtiva, e a diferenciação de monócitos infectados em macrófagos é necessária para ativar a replicação viral (Maury, W. 1994 e Sellon et al., 1996). Este padrão de infecção sugere que os monócitos infectados com o vírus podem servir como “Cavalo de Tróia”, disseminando a infecção do EIAV para os tecidos sem detecção do sistema imune (Clements e Zink, 1996). A identificação do EIAV em células endoteliais macrovasculares, sugere que este tipo celular pode também servir como reservatório viral em portadores inaparentes (Maury et al., 1998).

Os altos títulos de viremia observados durante a fase aguda estão associados com altos níveis de replicação do vírus em tecidos ricos em macrófagos, incluindo fígado, baço, rim, pulmão, linfonodos e glândula adrenal, os outros tecidos parecem conter baixos níveis de infecção viral, apesar dos altos níveis no sangue (Sellon et al., 1992). Em contraste à abundância de antígenos virais e DNA observados em tecidos de animais durante a fase aguda, análises qualitativas de infecções pelo EIAV por Southern blot e PCR em portadores inaparentes indicam baixos níveis de

infecção em macrófagos teciduais e monócitos do sangue periférico (Rice et al., 1989; Sellon et al., 1992; Kim e Casey, 1994; Harrold et al., 2000).

2.5- Genoma do EIAV

O vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) é membro do gênero *Lentivirus* e da família *Retroviridae*, possui genoma constituído por duas fitas de RNA não complementares de 8.2 kb, sendo considerado um dos menores vírus pertencentes à este gênero. Todos os membros desta família contém três principais genes estruturais/funcionais denominados: *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas da estrutura viral e enzimas (Clements e Zink, 1996). O gene *gag* codifica as proteínas p26, p15, p11 e p9 presentes no capsídeo viral; o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease e o gene *env* codifica as glicoproteínas estruturais gp90 de superfície externa e a gp45 transmembrana, sendo estas responsáveis pela interação com os receptores da célula-alvo e eventos de penetração celular. Durante o curso da doença a gp90 é submetida à rápida evolução, e mutações são restritas a definidas regiões variáveis (Leroux et al., 2004). Estas variantes de gp90 podem dificultar a amplificação por PCR, gerando resultados falso-negativos, e pode ser considerado um dos mecanismos de escape do vírus ao sistema imunológico (Howe et al., 2002).

Além das proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env*, o genoma do EIAV contém três seqüências de leitura aberta que codificam as proteínas Tat, REV e S2 que controlam o nível de replicação do vírus (Rasty et al., 1990; Stephens et al., 1990; Martarano et al., 1994). A proteína S2 é um importante determinante na replicação viral e propriedades patogênicas *in vivo* (Li et al., 2000).

Ainda no genoma do EIAV existem seqüências de repetições terminais longas (LTR) responsáveis pela regulação da transcrição viral, pela poliadenilação do RNA viral, e estão relacionadas com tropismo celular (Maury et al., 1998).

2.6- Variação Genética e Antigênica

Os membros da família *Retroviridae* sofrem freqüentes mutações genéticas que podem resultar em significativas alterações na chave biológica ou propriedades antigênicas. Em vista desta alta taxa de variação genética, e dos altos níveis de replicação viral, observados durante os ciclos de viremia em cavalos contaminados, é provável que as infecções causadas pelo EIAV estejam associadas a um amplo espectro de quasi-espécies que podem diferir significativamente nas especificidades biológicas (Alexandersen e Carpenter, 1991).

A adaptabilidade genética do EIAV é demonstrada por passagens seriadas em pôneis, anterior à produção de resposta imune detectável, resultando em marcado aumento da virulência do vírus (Orrego et al., 1982).

As altas taxas de mutação podem estar relacionadas a erros cometidos pela enzima transcriptase reversa, que possui baixa atividade de correção de leitura 3'-5' (proofreading activity), determinando a ocorrência de mutações pontuais da ordem de aproximadamente uma substituição a cada 10^4 bases, a taxa de mutação por ciclo de replicação, o número de ciclos de replicação, a vantagem seletiva do variante, pressão de seleção do ambiente e limitações para reter a função (Pique et al., 1990, Mansky e Temin 1994, Coffin et al., 1997). Além disso, o genoma dos Retrovirus está sujeito a altas taxas de rearranjos intragênicos, recombinações, deleções, duplicações, inversões ou uma combinação desses eventos (Hu e Temin, 1990; Zhang e Temin, 1993; Coffin, 1996, Willems et al., 2000).

A principal característica das infecções pelo EIAV é a ocorrência de episódios febris que parecem estar associados com variação na região do envelope do vírus. Uma hipótese para a recorrência clínica e persistência viral, é a de que o sistema imune elimina a população viral predominante durante a infecção, e distintas variantes do EIAV que mais tarde emergem, são selecionadas

(Carpenter et al., 1987; Hussain et al., 1987).

O fenômeno da variação antigênica durante infecções persistentes *in vivo* tem sido um achado comum dentre os lentivirus. Vários estudos indicam que viremias recorrentes durante a AIE crônica, resultam de uma evolução seqüencial e da seleção imune de variantes antigênicas do EIAV, que são capazes temporariamente de burlar o estabelecimento de resposta imune (Kono et al., 1973; Carpenter et al., 1987). Estudos revelam que distintos estratos antigênicos do EIAV predominam durante cada ciclo da doença, e que o estrato predominante pode mudar completamente dentro de duas semanas (Payne et al., 1987), além da existência de variantes geográficas identificados em diferentes regiões do mundo.

2.7- Controle Imunológico

As infecções pelo EIAV resultam em altos títulos de viremia dentro de três semanas pós-infecção. Várias linhas de evidência sugerem que respostas celulares e humorais específicas são necessárias para o término da viremia inicial, e a replicação viral é reduzida a baixos níveis em animais que evoluem do estágio crônico para portadores inaparentes.

A importância da resposta imune no controle da AIE foi demonstrada por imunossupressão experimental em animais assintomáticos, que levou ao aparecimento dos episódios da doença depois de várias décadas pós-infecção (Kono et al., 1976).

Vários estudos sugerem que durante o curso da infecção pelo EIAV, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune efetiva e duradoura, capaz de manter a replicação viral abaixo do limiar para a indução da doença (Hammond et al., 2000).

O desaparecimento da viremia inicial plasmática coincide com a emergência de linfócitos T citotóxicos (CD8+) específicos para o EIAV e anticorpos específicos não

neutralizantes (Perryman et al., 1988; McGuire et al., 1994).

Animais infectados pelo EIAV desenvolvem forte resposta imune contra as glicoproteínas de superfície (gp90) e transmembrana (gp45), e a principal proteína do core viral p26. Apesar de a p26 ser a mais abundante proteína do vírus, a resposta humoral anti-p26 é de 10 a 100 vezes mais baixa do que a reatividade contra a gp90 e gp45 (Hammond et al., 1999).

Como previamente descrito para o HIV e SIV dos primatas, a evolução viral no gene *env* ajuda o EIAV a escapar dos linfócitos T citotóxicos e dos anticorpos específicos (Carpenter et al., 1987; Mealey et al., 2003).

Anticorpos neutralizantes que são capazes de bloquear o estrato infectante, usualmente emergem somente depois de 2 a 3 meses pós-infecção, sugerindo que não são os responsáveis pelo término do episódio agudo inicial. O papel dos anticorpos neutralizantes ainda está incerto nas pesquisas sobre EIAV. Apesar disso, a recrudescência da doença está associada com a emergência de variantes que escapam dos anticorpos neutralizantes, sugerindo que a resposta neutralizante é eficiente no controle da replicação viral (Kono et al., 1973; Montelaro et al., 1984; Leroux et al., 1997; Leroux et al., 2001).

Estudos detalhados de resposta humoral na evolução de estágio crônico para portador inaparente, descreveram uma evolução gradual durante os primeiros 10 meses pós-infecção. Durante este período, anticorpos específicos para o EIAV sofrem maturação da especificidade e avidéz, talvez por mudanças conformacionais (Hammond et al., 2000) que contribuem para a manutenção da AIE em fase inaparente.

2.8- Diagnóstico da AIE

Ao longo dos anos vários testes tem sido empregados para diagnóstico das infecções causadas pelo EIAV. Primeiramente foram utilizadas inoculações de sangue suspeito

em animais susceptíveis, mas apesar de ser um teste sensível requer altos custos e muito tempo para obter o resultado, além do risco de infecção de outros animais na natureza. A Fixação de Complemento foi um dos primeiros ensaios empregados para detecção de anticorpos específicos ao EIAV, mas demonstrou resultados insatisfatórios, pois a IgGT equina não fixa complemento com eficiência (Nakajima et al., 1972).

O teste de inibição da hemaglutinação (HI) foi o primeiro teste usado como alternativa ao teste de inoculação, e demonstrou que o soro de cavalos infectados em estágios iniciais é inibido por antisoro homólogo, e os anticorpos são detectados antes da produção dos anticorpos neutralizantes (Sentsui e Kono, 1981).

O IDGA foi o primeiro teste confiável para detectar anticorpos específicos para EIAV em formato comercial, e utiliza a proteína p26 do capsídio viral como antígeno para detecção de anticorpos anti-p26. O IDGA é o teste oficial para diagnóstico da AIE, mas apresenta incapacidade de detectar anticorpos específicos nos estágios iniciais da infecção, o que compromete a eficiência dos programas de controle e erradicação da doença (Reis et al., 1994; Reis et al., 1997).

O teste ELISA indireto com a proteína gp90 recombinante (rgp90) tem sido utilizado em MG e no laboratório Retrolab, onde foi desenvolvido o presente estudo. Este teste possui vantagens frente ao IDGA por detectar os anticorpos anti-gp90, que são os primeiros a aparecerem no sangue e os mais abundantes, diminuindo o número de resultados falso-negativos. É considerado um método sensível para detectar anticorpos anti-EIAV, possibilitando o teste de muitas amostras ao mesmo tempo com resultados obtidos dentro de 4 a 5 horas (Martins, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido proposta como método de diagnóstico confirmatório para a AIE e outras retrovirose. A especificidade do teste é geralmente satisfatória quando são usados iniciadores dirigidos a uma região

conservada no genoma do EIAV (Kim e Casey., 1992; Langemeier et al., 1996). A PCR para detecção de DNA proviral do EIAV é sensível e específica para identificar cavalos em estágio subclínico, como também cavalos recentemente infectados em processo de montagem de resposta imune (Toma, 1980; McConnell et al., 1983; Issel et al., 1985; Issel e Cook, 1993).

Atualmente existem vários tipos de PCR, e esta técnica tem sido utilizada para investigar a distribuição e o nível de variabilidade genômica do DNA proviral do EIAV em diferentes tecidos de animais infectados (Rice et al., 1989; Sellon et al., 1992; Oaks et al., 1998; Harrold et al., 2000). A determinação do status da replicação viral, localização das células infectadas, quantificação da carga viral, detecção de ácidos nucléicos virais no plasma (RT-PCR), caracterização dos locais *in vivo* de infecção e replicação viral durante diferentes estágios da doença, e estudos comparativos entre técnicas moleculares e sorológicas, são desenvolvidos com o uso da PCR.

Apesar das vantagens da PCR, existem vários relatos na literatura sobre sua insuficiência em amplificar fragmentos virais de amostras de DNA provenientes de animais com sorologia positiva. Existem possíveis razões para este fato, e dentre elas a inadequada qualidade das amostras, iniciadores dirigidos para regiões não conservadas do genoma ou que não anelam de forma adequada no DNA molde, insuficiente quantidade de DNA molde, ou má qualidade de algum reagente da reação (Belak et al., 2001; Bienzle et al., 2004).

2.9- Controle da AIE

Com a falta de vacinas eficazes, o controle da AIE nos eqüídeos se faz com a identificação, segregação ou sacrifício dos animais infectados. Somente em países como China e Cuba tem sido executado um programa de vacinação usando amostras atenuadas do EIAV, que parece proteger os animais apenas contra amostras homólogas do vírus (Montelaro et al., 1993).

O Brasil criou em 1979 a Comissão Nacional de Anemia Infecciosa Eqüina (CNAIE), visando o controle e combate da doença. A CNAIE definiu que o Programa Nacional de Combate à AIE deveria considerar a ocorrência diferenciada da doença nas diversas regiões, os variados sistemas de produção e de utilização dos eqüídeos bem como definir e estabelecer as áreas indenes, paraendêmicas, epiendêmicas e endêmicas (Bevilacqua, 1993).

Em 2001, a Comissão Estadual de Controle da AIE em Minas Gerais (CECAIE-MG) elaborou uma legislação específica para o Estado com procedimentos relacionados à conduta veterinária e normas técnicas de controle da AIE, baseadas no diagnóstico e defesa. Além disso, a CECAIE-MG tem procurado sensibilizar as autoridades

federais e estaduais para a realização de inquérito soropidemiológico da AIE em todo o país, afim de verificar a prevalência da doença, e para que possam ser definidas seguras normas de trânsito eqüídeo no território brasileiro (Carvalho, 2002)

Em regiões como o Pantanal brasileiro, com alta prevalência da doença, o sacrifício de todos animais positivos comprometeria significativamente ou mesmo inviabilizaria a pecuária extensiva, que é a principal atividade econômica na região. Uma alternativa de controle da AIE, baseada na segregação dos animais positivos, tem sido adotada em alguns países como nos EUA e proposta como estratégia prática de prevenção e controle para a região do Pantanal (Silva et al., 2001).

Na erradicação de um foco da doença, seria importante a utilização de técnicas de diagnóstico mais sensíveis, possibilitando a detecção de positividade em estágios precoces da doença, com posterior isolamento dos animais infectados, além dos cuidados de manuseio individual de agulhas e seringas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta das amostras

Foram realizadas três coletas de amostras provenientes de eqüídeos com resultados positivos na IDGA para AIE, encaminhados ao abate em frigoríficos localizados nas cidades de Araguari e Itaobim, pertencentes ao Estado de Minas Gerais.

Amostras de sangue com anticoagulante e soro foram obtidas da veia jugular dos eqüídeos após antissepsia com álcool iodado, por meio de tubos vacutainer, anterior ao posicionamento dos animais na linha de abate.

Amostras de lavado broncoalveolar (LBA) foram obtidas de pulmões frescos provenientes dos animais contaminados, separados durante o processo de retirada das vísceras na esteira do frigorífico. A lavagem broncoalveolar (figura 1) foi realizada com a introdução de sonda uretral humana de 37,5 cm acoplada a uma seringa de 60 mL, através da traquéia até o

alojamento nos brônquios, por onde foram inoculadas cinco alíquotas de PBS (0,13 M NaCl, 0,002 M KCl, 14 mM KH_2PO_4 , 0,0096 M NaHPO_4) estéril totalizando um volume de 300 mL. Desse volume inoculado, foram recuperados aproximadamente 150 mL de LBA por pulmão. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o processamento no laboratório. A técnica utilizada foi adaptada das técnicas existentes para estudos de função respiratória, que utilizam endoscópio ou cateteres através das narinas e traquéia, até o alojamento nos brônquios, de eqüinos sob efeito de sedativos. (Dyer et al., 1983; Ainsworth et al., 2002; Mori et al., 2003; Ainsworth et al., 2003).

Foram obtidas 71 amostras de sangue e de lavado broncoalveolar que foram submetidas às análises sorológicas em IDGA e ELISA e amplificação por PCR.

No momento da coleta do sangue e lavado broncoalveolar, as amostras foram identificadas de forma que pudesse ser feita correlação entre os materiais biológicos provenientes de um mesmo animal.



Figura 1- Coleta das amostras de LBA

3.2- Processamento das amostras

Amostras de soro foram separadas do sangue coletado sem anticoagulante, por centrifugação de 10 minutos a 2000 X g e estocadas a -20°C .

Amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas por separação, utilizando o gradiente de Ficoll Paque, e estocadas a -20°C até a extração do DNA.

Amostras do lavado broncoalveolar foram filtradas em gaze estéril e centrifugadas a 2500 X g por 20 minutos. O pellet obtido foi ressuspenso em 2 mL de PBS (0,13 M NaCl, 0,002 M KCl, 14 mM KH_2PO_4 , 0,0096 M NaHPO_4) estéril e estocado a -20°C até a extração do DNA genômico.

3.2.1- Extração do DNA genômico

Amostras de LBA e PBMC foram submetidas à extração do DNA genômico utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, proteinase K e precipitação com etanol.

À cada amostra foi adicionado um volume de 500 μL de STE 1X (10 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0, 2 mL de EDTA 0,5M pH 8,0, e 5 mL de NaCl 3M), 150 μL de SDS 20% e 20 μL de proteinase K (5 mg/mL) seguido por incubação em banho Maria 56°C overnight. No segundo dia de protocolo foi adicionado à suspensão 80% do volume de isopropanol seguido por centrifugação a 15000 X g durante 30 minutos. Após ressuspenso do pellet em água, as amostras foram extraídas duas vezes com a mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 25:24:1 com recolhimento da fase aquosa sobrenadante que passou pela última extração com a mistura clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1. À este produto foi acrescentado acetato de sódio 3M e etanol absoluto e incubado a -20°C overnight.

O DNA obtido pós-centrifugação de 30 minutos a 15000 X g no terceiro dia, foi lavado com etanol 75% e 100%,

ressuspenso em água destilada e deionizada estéril e estocado a -20°C .

Todas as amostras de DNA extraídas foram estimadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm para DNA e 280 nm para proteínas.

Todas as amostras de DNA foram submetidas a três diferentes PCRs utilizando diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores: PCR gp90, nested-PCR gag e PCR β -Actina.

3.3- Testes Sorológicos

3.3.1- ELISA rgp90

O teste de ELISA rgp90 foi realizado segundo Reis (1997): a proteína recombinante rgp90 foi diluída em tampão carbonato 50 mM (pH 9,6) na concentração de 0,5 μg /cavidade e incubada (100 μL por poço) em placas de ELISA por 18 horas a 4°C . As placas foram lavadas por duas vezes com PBS-Tween 0,05% (pH 7,6) e incubadas por no mínimo uma hora com solução de bloqueio PBS-Tween 0,05% (200 μL por poço) acrescido de leite em pó desnatado a 5%. Nova lavagem foi realizada (três vezes) e o soro incubado na diluição de 1:50 (4 μL de soro em 196 μL de PBS Tween 0,05% + 1% de leite) por uma hora à temperatura ambiente. Para a diluição do soro foram utilizados tubos de hemólise, para garantir uma boa homogeneização das amostras, com posterior transferência para a placa de ELISA adsorvida previamente com a proteína recombinante rgp90. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-Tween 0,05% por três vezes e incubadas com solução de conjugado na diluição de 1:7500 (coelho anti IgG equina-peroxidase SIGMA) em PBS-Tween 0,05% + 1% de leite em pó (100 μL por poço) por uma hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-Tween 0,05 % por três vezes, 100 μL do substrato foi adicionado: solução de ortofenilenodiamino (OPD) (0,5 mg/mL), 20 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 10 mL de tampão

fosfato citrato (pH 5,0) por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 40 µL de solução de ácido sulfúrico a 0,5 N, e a densidade ótica lida em leitor de ELISA com comprimento de onda de 492 nm.

3.3.2- Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA p26):

O teste IDGA foi realizado segundo técnicas descritas por Coggins e Norcross (1970) e adaptadas por Nakajima e Ushimi (1971): a solução de ágar Noble a 1% é preparada em microondas e distribuída (4,5 mL) em lâmina de microscopia. Após solidificação, o ágar foi perfurado com furador próprio que continha um orifício central e seis periféricos. Os soros teste foram colocados (25 µL) intercalados com os controles positivos nos orifícios periféricos, e o antígeno p26 (25 µL) colocado no orifício central. As lâminas foram deixadas em câmara úmida por 48 horas e lidas com auxílio de lupa para verificação da presença de uma linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste, que apresente identidade com a linha formada entre o antígeno e o soro controle positivo. Foi utilizada uma fonte de luz indireta ajustável, com foco reduzido, para variar a intensidade e posição sob um fundo escuro.

3.4- Amplificação do DNA por PCR gp90

A seqüência codificadora para gp90, localizada a 369 pb após o sítio de iniciação para a proteína gp90 até o final do gene correspondente à gp90, foi amplificada pela reação de PCR com oligonucleotídios iniciadores (primers) específicos gp90-1 (5' CAG TGG ATC CTT CCC GGG GTG TAG A 3') e gp90-2 (5' CAA TCT GCA GAA TTA GTC CAG TGT TAG 3'). Estes iniciadores foram elaborados a partir da seqüência do gene EIAV descrita por Kawakami et al. (1987).

A PCR consiste de: Tris-HCl 10 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1%, 20 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada iniciador específico e 1 µg de DNA. À esta solução foi adicionada 1 U de Taq

DNA polimerase (Invitrogen) , gerando volume final foi de 20 µL, e uma gota de óleo mineral para evitar evaporação.

As condições da reação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguindo-se um ciclo final de incubação a 72°C por 10 minutos. Foi utilizado como controle positivo 200 ng do plasmídeo PDS-56 com inserto de gp90, e um controle negativo de reagentes.

O fragmento amplificado nesta PCR continha 900 pb e foi visualizado após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, imerso em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) e corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL.

3.5- Amplificação do DNA por nested PCR gag

Os oligonucleotídios iniciadores utilizados nesta reação foram correspondentes à seqüência para a proteína do capsídeo do EIAV Wyo *gag*, e incluem os iniciadores 636 (5' CCATTGCTGGAAGATGTAAC 3') e 1399 (5' TGCGTTCTGAATAGTCAGTG 3') como externos, e 854 (5' GGCTGGAAACAGAAATTTTA 3') e 1262 (5' TAGGTTTTCCAATCATCACT 3') como iniciadores internos. A escolha dos iniciadores, e o protocolo utilizado foi realizado conforme modificações descritas por Oaks et al.(1998).

A PCR consiste de: Tris-HCl 10 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X - 100 0,1%, 20 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada iniciador específico e 1 µg de DNA para a primeira reação. À esta solução foi adicionada 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), gerando volume final de 20 µL, e uma gota de óleo mineral para evitar evaporação. 1 µL do produto da primeira reação foi adicionado na segunda reação que continha mesmas proporções de reagentes. A amplificação usando os iniciadores externos e internos, consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 37 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C

por 30 segundos, com um ciclo final de 72°C por 7 minutos. O fragmento resultante da amplificação com iniciadores internos possui cerca de 408 pb.

Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de células da linhagem Derme Eqüina infectadas com EIAV, e controle negativo de reagentes. O fragmento amplificado foi visualizado após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, imerso em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) e corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL.

3.6- Amplificação do DNA por PCR β-Actina

Para verificar a qualidade das amostras de DNA genômico após os procedimentos de extração, foi utilizada a amplificação do gene da β-Actina para garantir que todas as amostras, principalmente as amostras negativas, tivessem acessibilidade aos oligonucleotídeos específicos para amplificação dos fragmentos do gene *env* e *gag* do EIAV. O gene da β-Actina foi escolhido por estar presente em todas as células de eqüídeos, e por ser considerado um gene conservado.

O par de oligonucleotídios iniciadores desta reação, foi escolhido utilizando o programa primer 3_www_results.cgi v 0.4, baseado em seqüências da β-Actina eqüina depositadas no banco de genomas Genbank (GenBank:ncbi.nlm.nih.gov). Os iniciadores são 861 (5'CGACATCCGTAAGGACCTGT3') e 1052 (5' GTGGACAATGAGGCCAGAAT 3').

A PCR consiste de: Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1%, 20 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada iniciador específico e 1 µg de DNA. À esta solução foi adicionada 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), gerando volume final de 20 µL, e uma gota de óleo mineral para evitar evaporação. A amplificação utilizando este par de iniciadores consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 37 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C

por 30 segundos, com um ciclo final de 72°C por 7 minutos. O fragmento resultante da amplificação apresentou tamanho de 191 pb. Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de células da linhagem Derme Eqüina infectadas com EIAV, e controle negativo de reagentes. O fragmento amplificado foi visualizado após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, imerso em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) e corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos com as técnicas de PCR e ELISA rpg90 foram comparados com os resultados obtidos na IDGA, por esta ser considerada exame oficial para diagnóstico da AIE.

Tabela 1. Resultados comparativos entre ELISA e IDGA

Total = 71 amostras		ELISA	
		Pos	Neg
IDGA	Pos	61	1
	Neg	2	6
KAPPA		0.776 (0.54 - 1.0)	

Conforme resultados apresentados na tabela 1, referentes a setenta e uma amostras analisadas, sessenta e um resultados concordaram em positividade em ambos testes, e seis resultados concordaram quanto à negatividade. Apenas três amostras apresentaram resultados discordantes entre as técnicas, sendo duas amostras negativas na IDGA e positivas no ELISA, e uma amostra positiva na IDGA e negativa no ELISA. O alto valor Kappa obtido da análise dos resultados demonstra que ocorreu alta concordância entre os testes ELISA e IDGA.

Tabela 2. Resultados comparativos entre IDGA e nPCR gag

	nPCR gag PBMC N= 65		nPCR gag LBA N= 71	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	51	5	31	31
Neg	9	0	2	7
KAPPA	-		0.117 (0 – 0,264)	

Foram analisadas sessenta e cinco amostras de DNA proveniente de PBMCs, pois foram perdidas seis amostras devido à presença de coágulo. Comparando os resultados obtidos entre a IDGA e nPCR gag com DNA proveniente de PBMCs, apresentados na tabela 2, observa-se a concordância de cinquenta e uma amostras

positivas em ambos testes. Quatorze amostras apresentaram resultados discordantes, sendo nove negativas na IDGA mas positivas na nPCR gag (figura 3), e cinco amostras com resultados positivos na IDGA e negativos na nPCR gag. Nenhuma amostra apresentou concordância com resultados negativos em ambas técnicas, o que impediu a obtenção do valor Kappa.

Comparando resultados obtidos entre a IDGA e nPCR gag com DNA proveniente do LBA, observa-se a concordância entre trinta e uma amostras com resultados positivos (figura 2), e entre sete amostras com resultados negativos em ambas técnicas. Trinta e três resultados foram discordantes, sendo trinta e uma amostras negativas na nPCR gag e positivas na IDGA, e apenas duas amostras com resultados positivos na nPCR gag e negativos na IDGA. O baixo valor Kappa obtido a partir da análise dos resultados indica que houve uma baixa concordância entre as técnicas, quando utilizado DNA proveniente do LBA.

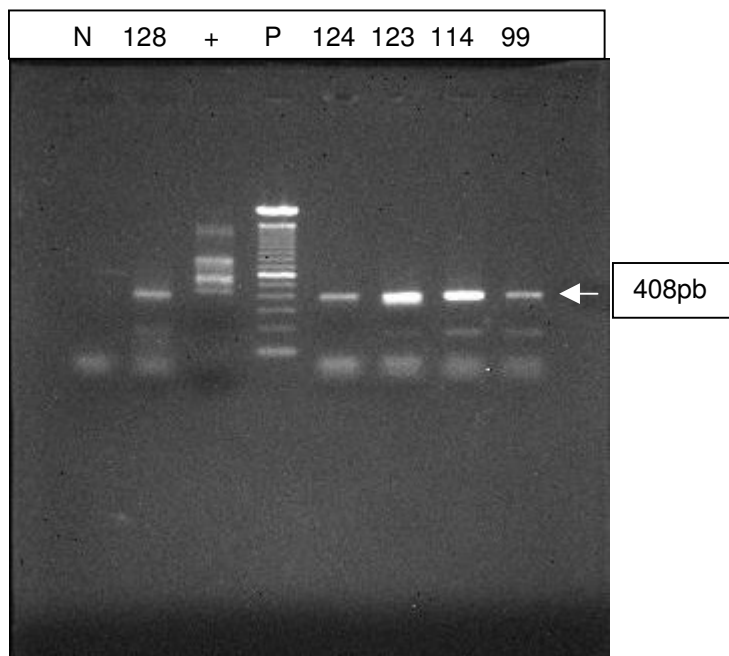


Figura 2- Produtos amplificados pela nPCR gag de amostras de LBA purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio: Canaleta N, controle negativo de reagentes, canaletas 128, 124, 123, 114, 99, amostras do LBA amplificadas, canaleta +, controle positivo, canaleta P, padrão de tamanho molecular com 100pb (Invitrogen).

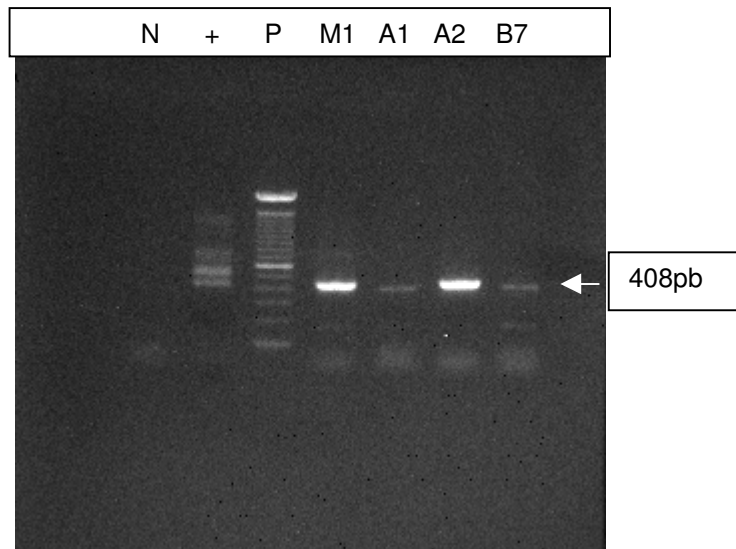


Figura 3 - Produtos amplificados pela nPCR gag de amostras de PBMC purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio: Canaleta N, controle negativo de reagentes, canaletas M1, A1, A2, B7, amostras de PBMC amplificadas, canaleta +, controle positivo, canaleta P, padrão de tamanho molecular com 100pb (Invitrogen).

Tabela 3. Resultados da PCR β -Actina

PCR β -Actina PBMC (n= 65)		PCR β -Actina LBA (n=71)	
Pos	Neg	Pos	Neg
65	0	69	2

Conforme os resultados apresentados na tabela 3, a técnica de PCR com iniciadores direcionados para o gene β -Actina, foi

eficiente em amplificar todas as amostras de DNA provenientes de PBMCs. Apenas duas amostras de DNA provenientes do LBA não foram amplificadas.

Esta PCR serviu como controle da qualidade do DNA que foi utilizado nas demais técnicas (figura 4).

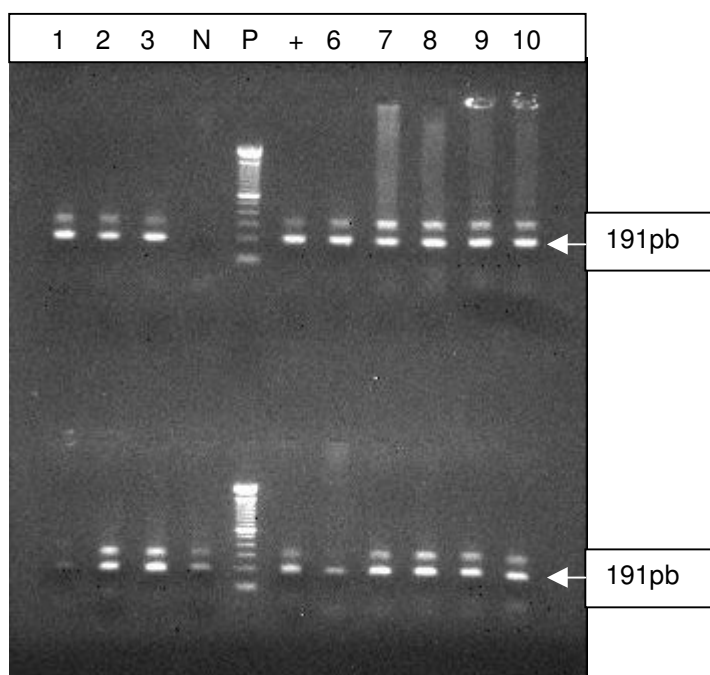


Figura 4 - Produtos amplificados pela PCR β -Actina de amostras de LBA e PBMC purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio: Canaleta N, controle negativo de reagentes, canaletas 1, 2, 3, 6, amostras de PBMCs amplificadas, canaletas 7, 8, 9, 10, amostras de LBA amplificadas, canaleta +, controle positivo, canaleta P, padrão de tamanho molecular com 100pb (Invitrogen).

Tabela 4. Resultados IDGA X PCR gp90

	PCR gp90 PBMC (n= 65)		PCR gp90 (LBA n= 71)	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	0	56	0	62
IDGA				
Neg	0	9	0	9

Conforme os resultados apresentados na tabela 4, todas as amostras de DNA provenientes de PBMC e LBA foram negativas na PCR gp90, o que impossibilitou a obtenção do valor Kappa.

Para verificar se algum componente nas amostras estava inibindo a reação da PCR gp90, foram colocadas junto com as amostras de DNA, várias concentrações do plasmídeo PDS-56, utilizado como controle positivo da reação. Foram testadas três concentrações de plasmídeo: 100ng, 200ng, e 300ng, que foram submetidas à PCR gp90 junto com amostras de DNA (figura 5).

Todas as concentrações testadas com as diferentes amostras de DNA amplificaram, exceto a amostra de DNA do LBA 86 que não amplificou quando foi usada a concentração de 100ng. Com a mesma amostra 86 utilizando outras concentrações de plasmídeo (200ng e 300ng), foi verificada a positividade. Estes resultados sugerem que não havia inibidores da PCR gp90 nas amostras de DNA extraídas.

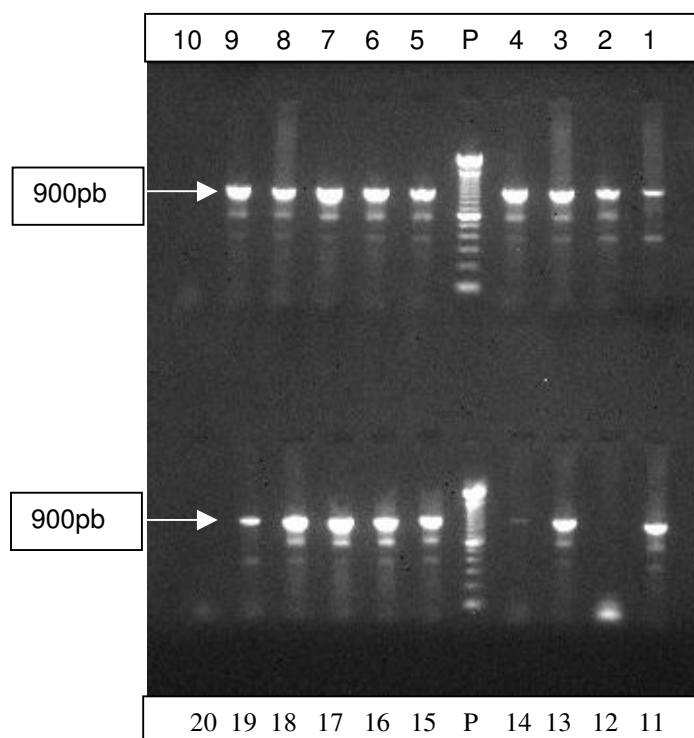


Figura 5 - Produtos amplificados pela PCR gp90 de amostras de LBA, PBMC e plasmídio PDS-56 em várias quantidades, purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio:

- Canaleta 1- 1 µg de amostra DNA PBMC 92 com 100ng de plasmídio
- Canaleta 2- 1 µg de amostra DNA PBMC 99 com 100ng de plasmídio
- Canaleta 3- 1 µg de amostra DNA PBMC 92 com 200ng de plasmídio
- Canaleta 4- 1 µg de amostra DNA PBMC 99 com 200ng de plasmídio
- Canaleta P- Padrão de Tamanho Molecular 100pb (Invitrogen)
- Canaleta 5- 100ng de plasmídio
- Canaleta 6- 200ng de plasmídio
- Canaleta 7- 300ng de plasmídio
- Canaleta 8- 1 µg de amostra DNA PBMC 92 com 300ng de plasmídio
- Canaleta 9- 1 µg de amostra DNA PBMC 99 com 300ng de plasmídio
- Canaleta 10- Controle negativo de reagentes
- Canaleta 11- 1 µg de amostra DNA LBA 84 com 100ng de plasmídio
- Canaleta 12- 1 µg de amostra DNA LBA 86 com 100ng de plasmídio
- Canaleta 13- 1 µg de amostra DNA LBA 84 com 200ng de plasmídio
- Canaleta 14- 1 µg de amostra DNA LBA 86 com 200ng de plasmídio
- Canaleta P- Padrão de Tamanho Molecular 100pb (Invitrogen)
- Canaleta 15- 100ng de plasmídio
- Canaleta 16- 200ng de plasmídio
- Canaleta 17- 300ng de plasmídio
- Canaleta 18- 1 µg de amostra DNA LBA 84 com 300ng de plasmídio
- Canaleta 19- 1 µg de amostra DNA LBA 86 com 300ng de plasmídio
- Canaleta 20- Controle negativo de reagentes

Para verificar se o problema de amplificação na PCR gp90 estava na concentração de DNA utilizada, foi realizado experimento com quatro amostras de DNA provenientes de PBMCs. Neste experimento foram testadas várias concentrações de DNA nas reações: 250ng, 500ng, 1µg e 2µg.

As amostras de DNA do PBMC 80, 82 e 102 foram positivas na n-PCR gag. A amostra 92 apresentou resultado negativo na n-PCR gag.

Nenhuma amostra testada em várias concentrações foi amplificada na PCR gp90, sugerindo que não era a concentração de DNA que estava interferindo nos resultados negativos obtidos neste experimento (figura 6).

O produto desta PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida segundo protocolo modificado de Laemmli (1970) na tentativa de melhorar a sensibilidade e visualização das bandas, mas nenhuma amplificação foi observada.

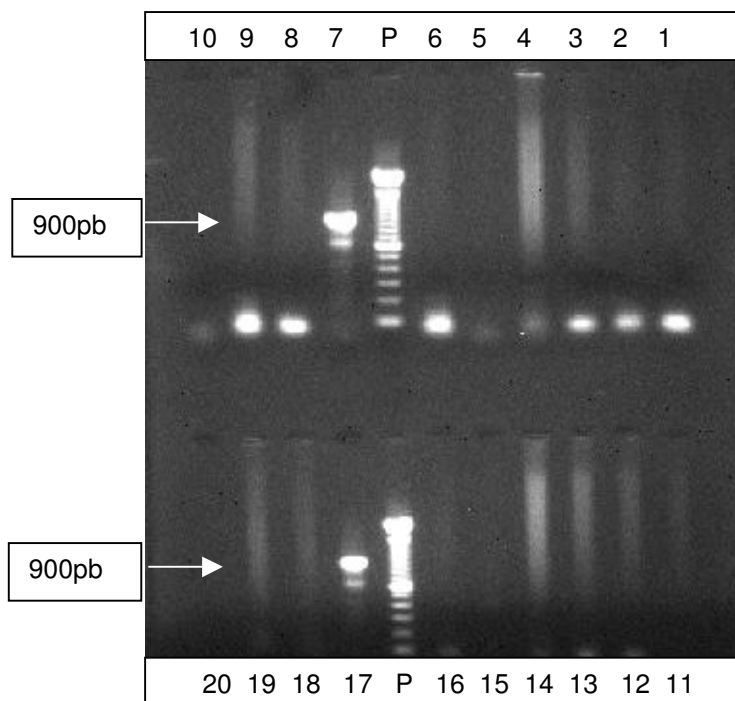


Figura 6 - Produtos amplificados pela PCR gp90 com variadas quantidades do DNA proveniente de PBMCs, purificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio:

- Canaleta 1- Amostra PBMC 80 com 250ng de DNA
- Canaleta 2- Amostra PBMC 80 com 500ng de DNA
- Canaleta 3- Amostra PBMC 80 com 1µg de DNA
- Canaleta 4- Amostra PBMC 80 com 2µg de DNA
- Canaleta 5- Amostra PBMC 82 com 250ng de DNA
- Canaleta 6- Amostra PBMC 82 com 500ng de DNA
- Canaleta P- Padrão de Tamanho Molecular 100pb (Invitrogen)
- Canaleta 7- Controle positivo (plasmídio 370ng)
- Canaleta 8- Amostra PBMC 82 com 1µg de DNA
- Canaleta 9- Amostra PBMC 82 com 2µg de DNA
- Canaleta 10- Controle negativo de reagentes
- Canaleta 11- Amostra PBMC 92 com 250ng de DNA
- Canaleta 12- Amostra PBMC 92 com 500ng de DNA
- Canaleta 13- Amostra PBMC 92 com 1µg de DNA
- Canaleta 14- Amostra PBMC 92 com 2µg de DNA
- Canaleta 15- Amostra PBMC 102 com 250ng de DNA
- Canaleta 16- Amostra PBMC 102 com 500ng de DNA
- Canaleta P- Padrão de Tamanho Molecular 100pb (Invitrogen)
- Canaleta 17- Controle positivo (plasmídio 370ng)
- Canaleta 18- Amostra PBMC 102 com 1µg de DNA
- Canaleta 19- Amostra PBMC 102 com 2µg de DNA
- Canaleta 20- Controle negativo de reagentes

5. DISCUSSÃO

Atualmente, o controle da AIE é feito a partir da identificação dos animais contaminados por testes sorológicos, principalmente a IDGA e o ELISA. Estes testes apresentam algumas limitações, como a inabilidade em detectar anticorpos nos estágios iniciais da infecção. Por isso, é recomendável a detecção direta do EIAV, pois permite identificar animais infectados em fase subclínica da doença, animais recentemente infectados em fase de montagem da resposta imune e infecções neonatais, além de elucidar reações indeterminadas pela sorologia (Issel e Cook, 1993; Langemeier et al., 1996).

Técnicas como Southern Blot e PCR já foram desenvolvidas e têm sido avaliadas para AIE com resultados favoráveis, assim como seqüências do genoma viral têm sido detectadas pela PCR três a quatro dias pós-infecção experimental (Langemeier et al., 1996; Ferraz, 1998).

Os resultados encontrados apresentam algumas discordâncias, quando são comparados os testes ELISA, IDGA e PCR. Porém, após uma avaliação comparativa de alguns dados poderíamos fazer algumas considerações importantes:

Todas as sessenta e cinco amostras de DNA provenientes de PBMCs foram amplificadas na PCR β - Actina, inclusive cinco amostras com resultados negativos na nPCR gag com sorologia positiva. Dentre as setenta e uma amostras de DNA provenientes de LBA, apenas duas não amplificaram na PCR β - Actina, mas uma das amostras negativas foi amplificada na nPCR gag, sugerindo um resultado falso-negativo na PCR β - Actina que foi utilizada no presente estudo, como controle da qualidade das amostras de DNA para diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina. O grande número de resultados positivos obtidos na PCR β - Actina validam também o processo de conservação e extração do DNA a que foram submetidas as amostras em estudo.

Sete amostras com resultados negativos em ambos os testes sorológicos, ELISA e IDGA, foram amplificadas na nPCR gag com DNA proveniente de PBMCs, mas apresentaram resultados negativos na nPCR gag com amostras de LBA. Resultados similares foram obtidos por Ferraz (1998) com animal experimentalmente infectado em fase aguda, utilizando amostras de DNA proveniente de PBMCs submetidas à nPCR gp90, e por Langemeier et al. (1996) utilizando RT-nPCR com iniciadores direcionados para a seqüência gag do EIAV.

Estes resultados sugerem que os animais se encontravam em estágios iniciais de infecção, quando são detectadas cópias do provírus em PBMCs mesmo sob baixas concentrações (Harrold et al., 2000), antes da produção dos anticorpos específicos detectados nos testes sorológicos.

Os resultados negativos das amostras de LBA sugerem que pode existir pequeno número de cópias de provírus nestas amostras, ou número insuficiente de células contendo os provírus, apesar de serem os macrófagos o tipo celular mais abundante neste material biológico (Dyer et al., 1983; Ainsworth et al., 2002; Mori et al., 2003). Além disso, as cópias virais podem estar em processo de transição dos monócitos sanguíneos para macrófagos teciduais, onde ocorre a efetiva replicação viral (Sellon et al., 1992; Oaks et al., 1998; Harrold et al., 2000), comprometendo a eficiência dos ensaios utilizados em detectar seqüências do EIAV nas amostras de DNA provenientes do LBA.

Cinco amostras de DNA provenientes de PBMCs foram negativas na nPCR gag e apresentaram sorologia positiva. Todas estas amostras com resultados negativos na nPCR gag foram positivas na PCR β - Actina, sugerindo que estas amostras não sofreram problemas na extração, e conseqüentemente na qualidade do DNA genômico, sendo a negatividade gerada por número insuficiente de células infectadas ou pequena quantidade de cópias do provírus por célula, em decorrência ao término dos episódios de viremia (O'Rourke et al., 1991). Existem relatos na literatura que apontam a

proteína viral p26 como altamente conservada entre os distintos isolados do EIAV, e entre outros isolados virais como puma lentivirus, FIV, Visna vírus, HIV-1 e SIV (Chong et al., 1991_a; McGuire et al., 2000; Fraser et al., 2002). Por isso, não deve ser descartada a hipótese de reações cruzadas com outros retrovírus de equídeos, ainda não descritos, que podem gerar resultados falso-positivos na sorologia, pois os determinantes protéicos codificados pelo gene *gag* são conservados (Langemeier et al., 1996). Além disso, não foi possível determinar o estágio da doença em que se encontravam os animais no momento do abate nos frigoríficos, podendo estar em fase inaparente da doença. Animais nesta fase da AIE são os mais abundantes na natureza, quando a viremia no plasma e cópias de provírus em PBMCs são geralmente indetectáveis (Oaks et al., 1998; Harrold et al., 2000).

Ocorreram discordâncias entre os resultados dos testes sorológicos e a nPCR *gag*, quando duas amostras apresentaram resultado positivo no ELISA, negativo na IDGA e positivo na nPCR *gag* com PBMC. Apenas uma dessas amostras apresentou resultado negativo na nPCR com LBA. Os resultados discordantes podem ser explicados pelo alto número de resultados fraco-positivos gerados na IDGA, podendo passar como negativos pelo laboratório executor (Martins, 2004).

Uma amostra positiva ao IDGA e negativa ao ELISA foi amplificada na nPCR com PBMC e negativa com amostra de LBA. Neste caso, a possibilidade de reações cruzadas com outros retrovírus deve ser considerada, e talvez explique casos em que resultados persistam positivos no IDGA e negativos no ELISA (Langemeier et al., 1996), bem como a possibilidade da existência de um novo variante resultante de mutações no gene *env* com conseqüente mudança na antigenicidade das proteínas do envelope, como observado no HIV-1 (Reis et al., 2003). Além desses fatores, a proteína gp90 usada como antígeno no ELISA foi baseada na seqüência clonada a partir da amostra "Wyoming" do EIAV (Reis, 1997) podendo dificultar detecção de

anticorpos anti-gp90 em amostras de campo.

Dentre as setenta e uma amostras de DNA provenientes do LBA analisadas, apenas trinta e três tiveram resultados positivos na nPCR *gag*, sendo que uma delas não foi amplificada na PCR β - Actina.

Considerando amostras provenientes dos mesmos animais, trinta e duas amostras de LBA com resultados negativos na nPCR *gag* apresentaram resultados positivos quando foi utilizado DNA proveniente de PBMCs.

Quando comparados os resultados das ampliações entre amostras de DNA provenientes de LBA e PBMCs, pode-se observar que a nPCR *gag* foi mais eficiente em amplificar material genômico proveniente de monócitos periféricos. Considerando que no LBA o tipo celular predominante são os macrófagos (Dyer et al., 1983; Ainsworth et al., 2002; Mori et al., 2003), células-alvo do EIAV, estes resultados inesperados entram em confronto com achados na literatura, que apontam os macrófagos teciduais como principais locais de replicação viral nas várias fases da doença, sendo encontrados nos monócitos periféricos menos de 1% da carga viral (Rice et al., 1989; Harrold et al., 2000).

Uma possível explicação para o pequeno número de ampliações das amostras de DNA do LBA seria a ausência de maturação dos monócitos infectados pelo EIAV em macrófagos teciduais, necessária para a replicação do vírus (Maury, 1994; Sellon et al., 1996). Além disso, pode ter ocorrido perda de células no processo de filtragem do LBA, gerando pouco DNA para amplificação.

Em acréscimo a estas considerações, e conforme mencionado anteriormente, não foi possível determinar o estágio da doença em que os animais se encontravam no momento da coleta das amostras, dificultando uma conclusão definitiva sobre os resultados obtidos.

Uma amostra de DNA proveniente LBA foi positiva na nPCR gag, enquanto o DNA de PBMC proveniente do mesmo animal gerou resultado negativo, mas com amplificação na PCR β - Actina. Este resultado obtido com amostra de PBMC pode ser considerado um falso-negativo, ou pode ser que exista insuficiente número de cópias do provírus para gerar produto amplificado (O'Rourke et al., 1991).

Na tentativa de verificar a existência de inibidores da amplificação na PCR gp90, foi realizado um experimento variando as concentrações do plasmídeo PDS-56, utilizado como controle positivo da reação. As concentrações testadas foram submetidas à PCR gp90 junto com amostras de DNA do LBA e PBMCs. Em todas as amostras foi verificada amplificação do controle, sugerindo ausência destes possíveis inibidores.

Ainda para verificar fatores que determinassem a ausência de amplificação das amostras de DNA na PCR gp90, foi realizado experimento variando as quantidades de DNA de algumas amostras de PBMC que apresentaram resultados positivos na nPCR gag. Nenhuma dessas amostras apresentou resultado positivo na PCR gp90.

Apesar de todas as tentativas, não foram obtidas amplificações na PCR gp90 tanto com DNA proveniente de LBA quanto PBMC. Resultados similares foram encontrados por Ferraz (1998) utilizando amostras de campo provenientes de animais com sorologia positiva submetidas a nPCR gp90, e por Kim e Casey (1994) na tentativa de amplificar seqüências *env* do DNA proviral em tecidos de portadores inaparentes.

Este fato pode ser explicado por se tratar de uma PCR com iniciadores direcionados a uma região pouco conservada do genoma do EIAV, codificada pelo gene *env*. A grande variação existente na seqüência *env* do EIAV dificulta a sua amplificação inclusive em ensaios de nested PCR, devido à grande heterogeneidade genômica

gerada, também descrita para o HIV (Kusumi et al., 1992; Meyerhans et al., 1989; Kim e Casey, 1994).

Algumas hipóteses são levantadas para explicar a limitada amplificação de seqüências *env* do EIAV, e dentre elas: a deleção de seqüências no gene, a divergência entre a seqüência protótipo utilizada para elaboração dos iniciadores e as seqüências alvo nas amostras (Kim e Casey, 1994), nenhuma ou poucas cópias de provírus presentes nas amostras (Maury et al., 1997), e a possibilidade de existirem provírus defectivos em animais infectados pelo EIAV (Perry et al., 1992).

Além destes fatores, nas amostras brasileiras estudadas, a seqüência do gene *env* ainda é desconhecida, dificultando a escolha de iniciadores específicos que garantam uma boa amplificação.

A sensibilidade e especificidade das técnicas de PCR são amplamente discutidas por vários autores, sendo contestada a hipótese de adoção destas metodologias como diagnóstico das doenças infecciosas e para teste de rebanho (Bienzle et al., 2004; Camargos, 2005). Apesar disso, a PCR tem sido utilizada em várias pesquisas de variabilidade genética, detecção e quantificação de agentes infecciosos com resultados satisfatórios, deixando em aberto a discussão sobre sua eficácia como ferramenta no diagnóstico das doenças.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

a nPCR gag foi mais eficiente em amplificar seqüências do EIAV nas amostras de DNA provenientes de PBMCs do que nas amostras de DNA provenientes do LBA, apresentando alta concordância com os resultados dos testes sorológicos;

a PCR β - Actina mostrou ser um controle eficiente da qualidade do DNA genômico usado na nPCR gag para o EIAV;

a PCR gp90 não foi capaz de amplificar amostras brasileiras do DNA proveniente de PBMCs e do LBA de animais positivos para AIE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, D.M.; APPLETON, J.A.; ANTCZAK, D.F.; SANTIAGO, M.A.; AVIZA, G. IgG antibody responses to an inhaled antigen in horses with "heaves" (recurrent airway obstruction). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.84, p. 169-180, 2002.

AINSWORTH, D.M.; GRÜNIG, G.; MATYCHAK, M.B.; YOUNG, J.; WAGNER, B.; ERB, H.N.; ANTCZAK, D.F. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.96, p. 83-91, 2003.

ALEXANDERSEN, S.; CARPENTER, S. Characterization of variable regions in the envelope and S3 open reading frame of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* v.62, p.4255, 1991.

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

ANEMIA infecciosa eqüina. *Boletim de Defesa Sanitária Animal*. v.8, n.1-4, p. 61-69, 1974.

BASTIEN, P.; CHABBERT, E.; LACHAUD, L. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? *J. Clin. Microbiol.* v.41, p.2272, 2003.

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

BELAK, S.; THOREN, P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert Rev. Mol. Diagn.* v.1, p. 434-443, 2001.

BIENZLE, D.; REGGETI, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Can. Vet. J.* v.45, p. 753-757, 2004.

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

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

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

CAMPBELL, R.S.; ROBINSON, W.F. The comparative pathology of the lentiviruses. *J. Comp. Pathol.* v.119, p. 333-395, 1998.

CARVALHO, R. Situação do programa de controle e erradicação da Anemia Infecciosa Eqüina em Minas Gerais. V&Z- Veterinária e Zootecnia em Minas Gerais (artigo técnico), ano XVII, n.75, p.14-21, 2002.

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

CHONG, Y.H.; PAYNE, S.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C.; RUSHLOW, K.E. Characterization of the antigenic domains of the mayor core protein (p26) of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v.65, p. 1007-1012, 1991a.

- CLEMENTS, J.E.; ZINC, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infectious. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, n.1, p.100-117, 1996.
- COOK, R.F.; COOK, S.J.; LI, F.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol. Methods.* v.105, p. 171-179, 2002.
- COFFIN, J.M. Retroviridae: the virus and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. et al. (Ed.). *Fields Virology*, 4 ed., 1996, cap. 6, p.1767-1847.
- COFFIN, J.M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E. Retroviruses. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 757p. 1997. Appendix 2: Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N.L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet.* v.60, n.2, p. 330-335, 1970.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N.L.; NUSBAUM, S.R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* v.33, n.1, p.11-18, 1972.
- CRAWFORD, J.B.; CHEEVERS, W.P.; KLEVJER-ANDERSON, P.; McGUIRE, T.C. Equine infectious anemia: Virion characteristics, virus cell interactions, and host responses, in: *Persistent Viruses*, v.11, p.155-162, 1978.
- DYER, R.M.; LIGGITT, H.D.; LEID, R.W.; Isolation and partial characterization of equine alveolar macrophages. *Am. J. Vet. Res.* v.44, n.12, p.2379-2384, 1983.
- DUPONT, O.; DACORSO FILHO, P.; MUCHALUAT, M.A. et al. Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1, 1968, Niterói. Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.160-161.
- FERRAZ, I.B.F. Vírus da Anemia Infecciosa Equina: Amplificação por PCR do DNA proviral da gp90, comparação com o teste de ELISA e IDGA e variabilidade genética de amostras brasileiras, 1998. Tese (Doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FRASER, D.G.; OAKS, J.L.; BROWN, W.C.; McGUIRE, T.C. Identification of broadly recognized, T helper 1 lymphocyte epitopes in an equine lentivirus. *Immunology*, v.105, p. 295-305, 2002.
- HAMMOND, S.A.; RAABE, M.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Evaluation of antibody parameters as potential correlates of protection or enhancement by experimental vaccines to equine infectious anemia virus. *Virology*, v.262, p.416-430, 1999.
- HAMMOND, S.A.; LI, F.; McKEON, B.M.S.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* v.74, p. 5968-5981, 2000.
- HARROLD, S.M.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J. Virol.*, v.74, p.3112-3121, 2000.

- HARTLEY, J.L.; RASHTCHIAN, A. Dealing with contamination: enzymatic control of carryover contamination in PCR. *PCR Methods Appl.*, v.3, p.10-14, 1993.
- HAWKINS, J. A.; ADAMS JUNIOR, W. V.; WILSON, B. H. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.168, n.1, p.63-64, 1976.
- HIRSCH, C. Caracterização molecular do vírus da leucose enzoótica bovina: análise filogenética das regiões gênicas 5' LTR e pol de amostras brasileiras, 2005. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- HOWE, L.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. *J. Virol.*, v. 76, p.10588-10597, 2002.
- HU, W.S.; TEMIN, H.M. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*, v.250, p.1227-1233, 1990.
- HUSSAIN, K.A.; ISSEL, C.J.; SCHNORR, K.L.; RWAMBO, P.M.; MONTELARO, R.C. Antigenic analysis of equine infectious anemia virus (EIAV) variants by using monoclonal antibodies: epitopes of glycoprotein gp90 of EIAV stimulate neutralizing antibodies. *J. Virol.* v.61, p. 2956-2961, 1987.
- ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine Infectious Anemia: Current Knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.174, n.7, p.727-733, 1979.
- ISSEL, C.J.; FOIL, L.D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.184, p.293, 1984.
- ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V.; FOIL, L.D. Prospective study of the progeny of inapparent carriers of equine infectious anemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, p.1114-1116, 1985.
- ISSEL, C.J.; RUSHLOW, K.E.; FOIL, L.D.; MONTELARO, R.C. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. *Vet. Microbiol.*, v.17, p.251, 1988a.
- ISSEL, C.J.; MACMANUS, J.M.; HAGIUS, S.D.; FOIL, L.D.; ADAMS, W.V.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia: prospects for control. *Develop. Biol. Standart*, v.72, p.49-57, 1990.
- ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.5, p.137-141, 1993.
- KAWAKAMI, T.; SHERMAN, L.; DAHLBERG, J.; GAZIT, A.; YANIV, A.; TRONICK, S.R.; AARONSON, S.A. Nucleotide sequence analysis of equine infectious anemia virus proviral DNA. *Virology*, v.158, p.300, 1987.
- KEMENY, L.J.; MOTT, L.O.; PEARSON, J.E. Titration of equine infectious anemia virus: Effects of dosage on incubation time and clinical symptoms. *Cornell Vet.*, v.61, p. 687, 1971.
- KIM, C.H.; CASEY, J.W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. *J. Virol.*, v. 66, p. 3879-3882, 1992.
- KIM, C.H.; CASEY, J.W. In vivo replication status and envelope heterogeneity of equine infectious anemia virus in an inapparent carrier. *J. Virol.*, v.68, p.2777-2780, 1994.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. *Arch. Gesamte Virusforsch*, v.41, p.1, 1973.

- KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, v. 16, p. 8, 1976.
- KUSUMI, K.; CONWAY, B.; CUNNINGHAM, S.; BERSON, A.; EVANS, C.; IVERSEN, A.K.N.; COLVIN, D.; GALLO, M.V.; COUTRE, S.; SHPAER, E.G.; FAULKNER, D.V.; deRONDE, A.; VOLKMAN, S.; WILLIAMS, C.; HIRSCH, M.S.; MULLINS, J.I. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *J. Virol.*, v. 66, p. 875-885, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227 (5259), p.680-685, 1970.
- LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.1481-1487, 1996.
- LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J. Virol.*, v.71, p.9627-9639, 1997.
- LEROUX, C.; CRAIGO, J.K.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J. Virol.*, v.75, p. 4570-4583, 2001.
- LEROUX, C.; CADORÉ, J.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.*, v.35, p.1-19, 2004.
- LI, F.; LEROUX, C.; CRAIGO, J.K.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. The S2 gene of equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. *J. Virol.*, v.74, p. 573-579, 2000.
- MANSKY, L.M; TEMIN, H.M. Lower rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J. Virol.*, v.68, n.1, p.494-499, 1994.
- MARTINS, M.F. *Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina em Soros de Equídeos de Diferentes Regiões do Estado de Minas Gerais: Comparação entre os Testes IDGA (p26) e ELISA Indireto (rgp90)*, 2004. Tese (Mestrado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTARANO, L.; STEPHENS, R.; RICE, N.; DERSE, D. Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein Ver controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. *J. Virol.*, v. 68, p. 3102-3111, 1994.
- MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.K.; PORTER, J.P. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.1, p. 50-52, 1989.
- MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v.68, p.6270-6279, 1994.
- MAURY, W., PERRYMAN, S., OAKS, J.L.; SEID, B.K.; CRAWFORD, T.; McGUIRE, T.; CARPENTER, S. Localized sequence heterogeneity in the long terminal repeats of in vivo isolates of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v. 71, p. 4929-4937, 1997.
- MAURY, W., OAKS, J.L.; BRADLEY, S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v. 72, p. 9291-9297, 1998.

- McGUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.B.; HENSON, J.B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am. J. Pathol.*, v. 61, p. 283, 1971.
- McGUIRE, T.C.; TUMAS, D.B.; BYRNE, K.M.; HINES, M.T.; LEIB, S.R.; BRASSFIELD, A.L.; O'ROURKE, K.I.; PERRYMAN, L.E. Major histocompatibility complex –restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins. *J. Virol.*, v. 68, p. 1459-1467, 1994.
- McGUIRE, T.C.; LEIB, S.R.; LONNING, S.M.; ZHANG, W.; BYRNE, K.M.; MEALEY, R.H. Equine infectious anemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses. *J. Gen. Virol.*, v.81, p. 735-739, 2000.
- McCONNELL, S.; KATADA, M.; DARNTON, S. M. Occult equine infectious anemia in an immunosuppressed serologically negative mare. *Equine Pract.*, v.5, p.32-39, 1983.
- MEALEY, R.H.; ZHANG, B.; LEIB, S.R.; LITTKER, 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.
- MEYERHANS, A.; CHEYNEIR, R.; ALBERT, J.; SETH, M.; KWOK, S.; SNINSKY, J.; MORFECT- MANSON, L.; ASJO, B.; WAIN-HOBSON, S. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell*, v. 58, p. 901-910, 1989.
- MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C. J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 10539-10544, 1984.
- MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. In: *Retroviridae*, v.2., New York: Plenum Press, 1993.
- MORI, E.; MORI, C.M.C.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; LARA, M.C.C.S.H.; FERNANDES, W.R. Evaluation of alveolar macrophage function after experimental infection with equine herpesvirus-1 in horses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.3, p.271-278, 2003.
- NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, v.94, p.97-109, 2001.
- NAKAJIMA, H.; USHIMI, C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.*, v.3, p. 373-377, 1971.
- NAKAJIMA, H.; NORCROSS, N.L.; COOGINS, L. Demonstration of antigenic identity between purified EIA virus and an antigen extracted from infected horse spleen. *Infect. Immun.*, v.6, p. 416, 1972.
- OAKS, J.L.; McGUIRE, T.C.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T.B. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J. Virol.*, v. 72, p. 7263-7269, 1998.
- O'ROURKE, K.I.; BESOLA, M.L.; McGUIRE, T.C. Proviral sequences detected by polymerase chain reaction in peripheral blood cells of horses with equine infectious anemia lentivirus. *Arch. Virol.*, v. 117, p. 109-119, 1991.
- ORREGO, A.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C.; ADAMS, W.V.J. Virulence and in vitro growth of a cell-adapted strain of equine infectious anemia virus after serial passage in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v. 43, p.1556-1560, 1982.
- PAYNE, S. L.; FANG, F.D.; LIU, C.P.; DHRUVA, B.R.; RWAMBO, P.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Antigenic variation and lentivirus persistence: Variations I envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. *Virology*, n. 161, p. 321, 1987.

- PERRY, S.T.; FLAHERTY, M.T.; KELLEY, M.J.; CLABOUGH, D.L.; TRONICK, S.R.; COGGINS, L.; WHETTER, L.; LENGEL, C.R.; FULLER, F. The surface unit protein gene region of equine infectious anemia virus is not an important determinant of tropism in vitro. *J. Virol.*, v. 66, p. 4085, 1992.
- PERRYMAN, L.E.; O'ROURKE, K.I.; MCGUIRE, T.C. Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. *J. Virol.*, v. 62, p. 3073-3076, 1988.
- PIQUE, C.; TURSZ, T.; DOKHELAR, M.C. Mutations introduced along the HTLV-1 envelope gene result in a non-functional protein: a basis for envelope conservation? *The Embo Journal*, v.9, n.13, p.4243-4248, 1990.
- RASTY, S.; DHRUVA, B.R.; SCHILTZ, R.L.; SHIH, D.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Proviral DNA integration and transcriptional patterns of equine infectious anemia virus during persistent and cytopathic infections. *J. Virol.*, v. 64, p. 86-95, 1990.
- REIS, J. K.; MELO, L. M.; REZENDE, M. R.; LEITE, R. C. Use of an Elisa test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.26, p.65-68, 1994.
- REIS, J.K.P. *Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da Anemia Infecciosa Equina para uso em imunodiagnóstico*, 1997. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- REIS, J.K.; CRAIGO, J.K.; COOK, S.J.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Characterization of EIAV LTR variability and compartmentalization in various reservoir tissues of long-term inapparent carrier ponies. *Virology*, v. 311, p. 169-180, 2003.
- RICE, N.R.; LEQUARRE, A.S.; CASEY, J.W.; LAHN, S.; STEPHENS, R.M.; EDWARDS, J. Viral DNA in horses infected with equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v. 63, p. 5194-5200, 1989.
- SCHOCHETMAN, G.; C.Y. OU; JONES, W.K. Polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, v. 158, p. 1154-1157, 1988.
- SELLON, D.C.; PERRY, S.T.; COGGINS, L.; FULLER, F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J. Virol.*, v.66, p.5906-5913, 1992.
- SELLON, D.C.; WALKER, K.M.; RUSSELL, K.E.; PERRY, S.T.; COVINGTON, P.; FULLER, F.J. Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *J. Virol.*, v.70, p.590-594, 1996.
- SENTSUI, H.; KONO, Y. Hemagglutination-inhibition tests with different strains of equine infectious anemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 42, p. 1949, 1981.
- SILVA, R.A.; ABREU, U.G.P.; BARROS, A.T.M. *Anemia Infecciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal*. Embrapa: Corumbá, circular técnica, n. 29, 2001.
- STEPHENS, R.M.; DERSE, D.; RICE, N.R. Cloning and characterization of cDNAs encoding equine infectious anemia virus tat and putative Rev proteins. *J. Virol.*, v. 64, p. 3716-3725, 1990.
- TEMIN, H.M.; MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, v.226(5252), p.1211-3, 1970.
- TOMA, B. Persistent negative serologic reaction in a mare infected with equine infectious anemia virus. *Recl. Med. Vet.*, v.156, p.55-63, 1980.

VAN REGENMORTEL, M.H.; MAYO, M.A.; FAUQUET, C.M.; MANILOFF, J. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch. Virol.*, v.145, p.2227-2232, 2000.

WILLIAMS, D. L.; ISSEL, C. J.; STEELMAN, C. D.; ADAMS, W. V.; BENTON, C. V. Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.1469, 1981.

WILLEMS, L.; BURNY, A.; COLLETE, D.; DANGOISSE, O.; DEQUIEDT, F.; GATOT, J.S.; KERKHOFS, P.; LEFEBVRE, L.; MREZAK, D.; PEREMANS, T.; PORTETELLE, D.; TWIZERE, J.C.; KETTMANN. Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *Aids Research and Human Retroviruses*, v.16, n.16, p.1787-1795, 2000.

ZHANG, J.; TEMIN, H.M. Rate and mechanism of non homologous recombination during a single cycle of retroviral replication. *Science*, v.259, p.234-238, 1993.