

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUINOS, ASININOS E MUARES
UTILIZANDO PEPTÍDEO SINTÉTICO pgp45**

João Helder Frederico de Faria Naves

Belo Horizonte

2015

João Helder Frederico de Faria Naves

**DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM EQUINOS, ASININOS E MUARES
UTILIZANDO PEPTÍDEO SINTÉTICO pgp45**

**Tese apresentada para o programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal de Minas Gerais**

**Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis**

Coorientadores: Rômulo Cerqueira Leite

Paula de Souza Santos

Belo Horizonte

Escola de Veterinária/UFMG

2015

Naves, João Helder Frederico de Faria, 1983-

N323d Diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muares utilizando peptídeo sintético ppg45 / João Helder Frederico de Faria Naves. – 2015.

48 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Coorientadores: Rômulo Cerqueira Leite, Paula de Souza Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa equina – Teses. 3. Lentivírus – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Leite, Rômulo Cerqueira. III. Santos, Paula de Souza. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.108 969 2

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO HELDER FREDERICO DE FARIA NAVES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente Orientador



Prof. Amador Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina



Dr. Marcelo Fernandes Camargos
LANAGRO



Prof. Zélia Inês Portela Lobato
Universidade Federal de Minas Gerais - EV



Dr. Antonio Augusto Fonseca Junior
LANAGRO

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu filho Miguel, que é a minha inspiração diária e que proporciona os melhores momentos da minha vida, fazendo os meus dias mais felizes e completos.

Agradecimentos

Deus, pela oportunidade da vida, por dar sabedoria, coragem, determinação e força nas escolhas corretas a seguir.

Aos meus pais, João Batista Naves e Maria Isabel de Faria Naves, pela minha vida, pelo exemplo de dedicação e perseverança, por sempre me dar apoio, incentivo, amor e carinho, possibilitando a realização de um sonho.

A minha família, Saira e meu filho Miguel, pelo amor, carinho, felicidade e por proporcionar os melhores momentos de minha vida, se renovando a cada dia.

A minha irmã Renata, meu cunhado Celso e meu sobrinho João Guilherme, pelo apoio, carinho e ajuda sempre no que foi preciso.

Aos meus sogros Augusto e Sara, pelo carinho amizade e incentivo.

Professor Jenner, pela orientação, amizade, apoio, conselhos, compreensão, incentivo, por passar seus conhecimentos e pela disponibilidade demonstrada para o desenvolvimento desta tese, nos aconselhando sempre a renovar nossos conhecimentos científicos.

Professor Rômulo, pela coorientação, por seus conselhos, amizade, ensinamentos, ajuda em todos os momentos e por ser uma grande inspiração profissional.

Paula Santos, pela coorientação, ajuda e conselhos valorosos para o desenvolvimento da tese.

Fernanda, minha companheira da AIE, por sua amizade, pelos seus conselhos, por passar seus conhecimentos de bancada e por sempre estar disposta a ajudar.

Cairo e Ermilton, meus grandes amigos, por serem meus companheiros e confidentes nesta jornada de doutorado, sempre ajudando e compartilhando excelentes experiências profissionais e pessoais.

Ana Paula, Grazielle, Paula e André, por terem deixado mais fáceis meus dias de doutorando, pela sincera amizade, companheirismo e pelas várias risadas.

Gilson, Danilo, Bruno e Dionei, companheiros de morada, por compartilhar excelentes momentos e histórias.

Aos colegas do Retrolab, Agda, Cláudia, Daniel, Daniela, Gissandra, Isabela, Juliana Bicalho, Juliana Quintanilha, Lízia, Luciana, Stefanne e Telissa, pela convivência, ajuda e aprendizado.

Professor Marcos Bryan, pela ajuda nas análises, pelos conselhos e amizade.

Aos pesquisadores do ICB-UFMG Carlos Chávez Olórtégui e Ricardo Andrez pela parceria e ajuda com as sínteses dos spots.

Professora Anna Lima (UFU) e Prof. Luiz Ricardo (UFU) pela ajuda e colaboração nesse período de doutorado.

Dr. Marcelo Camargos do LANAGRO-MG, por fornecer as amostras de soros e contribuir com o trabalho.

Aos funcionários da EV-UFMG, Eduardo e Graciela, pela ajuda, disposição e colaboração.

Aos colegas de pós graduação em Ciência Animal, por compartilharem esta oportunidade e estarem presentes nesta etapa de minha vida.

A CAPES, CNPq, INCT e FAPEMIG, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de certa forma contribuíram com esse trabalho.

“Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz.”

Renato Teixeira

Almir Sater

Sumário

1. Introdução	7
2. Objetivos	7
3. Revisão de literatura	8
3.1 Histórico da AIE	8
3.2 Etiologia	8
3.3 Sinais clínicos	9
3.4 Transmissão	9
3.5 Tropismo Celular.....	9
3.6 Imunidade celular e humoral	9
3.7 Diagnóstico	10
3.8 Problemática do diagnóstico da AIE	11
3.9 Controle	13
3.10 <i>Spot synthesis</i>	14
4. Material e métodos	14
4.1 Locais de Realização do Experimento	14
4.2 Mapeamento dos epítomos.....	15
4.3 Ensaio imunológico	15
4.4 Síntese solúvel do peptídeo.....	16
4.5 Análises por bioinformática e predição da proteína 3D	16
4.6 Padronização de ELISA indireto.....	17
4.7 Teste em ELISA pgp45.....	17
4.8 Análise de amostras discordantes entre ELISA pgp45 e IDGA	18
5 Resultados	18
5.1 Mapeamento de epítomos e ensaios imunológicos	18
5.2 Análises de bioinformática e predição da proteína 3D.....	21
5.3 Padronização de um ELISA pgp45	23

5.4 Teste em ELISA pgp45.....	23
5.5 Análise de amostras discordantes entre ELISA pgp45e IDGA	27
6 Discussão	28
7 Conclusão	30
8 Referências	31

Lista de figuras

Figura 1: Proposta de fluxograma de diagnóstico para anemia infecciosa equina.....	13
Figura 2: Membranas de celulose após realização dos ensaios imunquímicos para teste do conjugado anti-IgG equino marcado com fosfatase alcalina.....	19
Figura 3: Reação de um pool de soros reativos para AIE em membranas com peptídeos correspondentes ao gene ENV do EIAV.....	20
Figura 4: Sequência de aminoácidos da proteína correspondente ao envelope do EIAV (acesso GenBank AAB59863) determinando as 8 regiões de hipervariabilidade e identificação do epítipo selecionado em amarelo.....	21
Figura 5: Predição em três possíveis modelos da estrutura tridimensional da proteína correspondente ao gene <i>env</i> do EIAV.....	22

Lista de tabelas

Tabela 1: Lista dos spots reativos testados com soros de equinos, muares e asininos, nos ensaios imunquímicos, com a sequência de aminoácidos dos respectivos peptídeos e as intensidades das reatividades médias, em escala de 0 a 4	20
Tabela 2: Análise das sequências reativas pela técnica de <i>spot synthesis</i> e do Peptídeo sintetizado em fase solúvel, suas respectivas sequências de aminoácidos, massas moleculares, pI e índice GRAVY.....	22
Tabela 3: Análise da similaridade do epítipo selecionado comparado com amostras de genoma completo isoladas do EIAV, através de alinhamento realizado pelo programa bioedit.....	23
Tabela 4: Avaliação de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância entre ELISA pgp45 e IDGA e o índice kappa em amostras de campo de equinos, asininos e muares.....	25
Tabela 5: Resultados discordantes entre ELISA pgp45 e IDGA testadas em ELISA gp90, C-ELISA p26 e Imunoblot	27

Lista de gráficos

Gráfico 1: Resultado das 107 amostras de soros referências de equídeos cedidas pelo LANAGRO-MG no ELISA pgp45 comparado a IDGA.....	24
---	----

Gráfico 2: Avaliação da temperatura do animal e análise da reatividade dos soros no ELISA pgp45 e no ELISA rgp90 do animal experimentalmente infectado com amostra Wyoming do EIAV.....	24
Gráfico 3: Resultado das 859 amostras de equídeos (soros de campo) no ELISA pgp45 comparado ao teste de IDGA.....	26
Gráfico 4: Teste de reatividade cruzada utilizando peptídeo sintético gp45 como antígeno testando amostras de soro sanguíneo positivos para BIV, CAEV, FIV, HIV.....	26

Lista de abreviaturas

AAs	Aminoácidos
AIE	Anemia infecciosa equina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BIV	Vírus da imunodeficiência bovina
CAEV	Vírus da artrite encefalite caprina
CBS	Tampão salina citrato
C-ELISA	Ensaio imunoenzimático competitivo
Da	Daltons
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDT	Etanoditiol
EIAV	Equine infectious anemia vírus
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Env	Gene que codifica as proteínas do envelope viral dos retrovírus
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
Fmoc	Fluorenil-metil-oxicarbonila
Gag	Gene viral que codifica as proteínas internas dos retrovírus
gp45	Glicoproteína 45
gp90	Glicoproteína 90
GRAVY	Índice de hidropaticidade
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico

HI	Inibição da hemaglutinação
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDGA	Imunodifusão em gel Agar
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina- 2
K	Lisina
KCl	Cloreto de potássio
L	Leucina
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MTT	Bromídeo de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	Centro nacional de informações sobre biotecnologia
NH ₂	Hidróxido de nitrogênio
OIE	Organização mundial da saúde animal
OPD	O- Phenylenediamine dihydrochloride
P26	Proteína 26
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	Ponto isoelétrico
Pol	Gene que codifica as enzimas virais dos retrovírus
Q	Glutamina
R	Arginina
rgp90	Proteína recombinante gp90
S2	Gene de regulação viral
SDS	Sulfato dodecil sódico

Tat	Gene de regulação viral
TBS	Tampão Salina Tris
TES	Trietilsilano
TFA	Ácido trifluoracético
TFA	Ácido trifluoracético
TIPS	Tri-isopropilsilano
Tween-20	Tensoativo hidrofílico
USDA	United States Department of Agriculture

Resumo

O controle da anemia infecciosa equina (AIE), doença causada por um lentivírus, é realizado principalmente pela eliminação de animais positivos detectados pela técnica de imunodifusão em gel ágar (IDGA), que é o teste oficial e único utilizado para o diagnóstico desta enfermidade no Brasil. O teste de IDGA pode apresentar resultados falsos negativos ou duvidosos, formando uma linha de precipitação muito fraca, principalmente quando se trata de animais recém-infectados ou em amostras de asininos e muares. Em um estudo pioneiro, foi mapeado e identificado através da técnica de *spot synthesis* um epítopo consenso, localizado na região do gene que codifica a proteína gp45 transmembrana do envelope viral, para uso em diagnóstico e identificação de equinos, asininos e muares infectados pelo EIAV. Com base nesses resultados, foi sintetizado um peptídeo (pgp45) solúvel linear com 20 aminoácidos e utilizado como antígeno em um teste de ELISA indireto. Quando avaliado em amostras de campo, no qual foram testadas 859 amostras de soros de equídeos, observou-se uma concordância com IDGA de 96,1%, sensibilidade e especificidade de 98,6 e 95,6%, respectivamente. O pgp45 foi capaz de detectar um animal como soropositivo no 13º dia após inoculação experimental com amostra Wyoming do EIAV. O peptídeo pgp45 foi eficiente em detectar anticorpos anti-EIAV em equinos, asininos e muares infectados, podendo ser uma alternativa para o diagnóstico, principalmente se utilizado como um teste de triagem, pois obteve-se uma alta sensibilidade, contribuindo para o controle da AIE.

Palavras chave: Equídeos, *Spot synthesis*, Anemia infecciosa equina, Epítopos, ELISA indireto.

Abstract

The control of equine infectious anemia (EIA), a disease caused by a lentivirus, is made primarily by the elimination of positive animals detected by the agar gel immunodiffusion test (AGIDT), which is the official test and the only method used for the diagnosis of EIA in Brazil. The AGIDT may show false negative or doubtful results, since a very weak line of precipitation is formed, especially when it comes to newly infected animals or samples from donkeys and mules. In a pioneering study, we mapped and identified by spot synthesis technique an epitope consensus for identify equids infected with EIAV, located in the region encoding the envelope protein gp45 of EIAV. Based on these results, we synthesized a soluble peptide (pgp45) with 20 amino acids in length that was used as antigen in an indirect ELISA test. When evaluated on field, in which 859 equine serum samples were tested it revealed a correlation of 96.1% with AGID and 98.6 and 95.6%, of sensitivity and specificity respectively. The pgp45 was able to detect an animal as seropositive at 13^o day after experimental inoculation with the Wyoming strain of EIAV. The peptide pgp45 was efficient in detecting antibodies against EIA in horses, donkeys and mules infected with EIAV as well and, could be an alternative for the diagnosis, especially if used as a screening test, since it has a high sensitivity, contributing to the control of the EIA.

Keywords: Equidae, *spot synthesis*, equine infectious anemia, epitopes, ELISA.

1. Introdução

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença causada por um retrovírus, membro da família *Retroviridae* e do gênero *lentivírus*, o *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV) que infecta os equídeos, levando a uma infecção persistente. A AIE é uma doença de notificação obrigatória e é caracterizada como uma das principais doenças virais que acometem os equídeos no mundo, causando diversos prejuízos ao setor da equideocultura. Até o momento não existe vacina ou tratamento eficaz, sendo que os animais infectados podem se tornar portadores assintomáticos e potenciais transmissores da doença.

A principal forma de controle da AIE é a partir da identificação dos animais infectados pelo EIAV através do diagnóstico sorológico, e a imunodifusão em gel ágar (IDGA) sendo um dos testes recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o diagnóstico no Brasil. Apesar da facilidade de execução, a IDGA não é um teste rápido, pois a leitura é feita em até 48 horas e não permite automação na sua execução. Além disso, a baixa sensibilidade pode levar a obtenção de resultados falsos negativos ou duvidosos, principalmente quando se trata de animais recentemente infectados. Outro problema normalmente observado, porém, com pouca informação publicada é sobre a dificuldade do diagnóstico em asininos, que normalmente possuem baixos títulos de vírus e de anticorpos específicos no sangue.

A literatura tem mostrado a necessidade de desenvolvimento de novos testes de diagnóstico para a AIE que sejam mais rápidos, mais sensíveis e capazes de detectar animais em fases precoces da infecção. O diagnóstico é importante principalmente para as espécies de asininos e muares, que podem apresentar resultados falso-negativos na IDGA e apresentam resultados discordantes entre alguns testes sorológicos, o que dificulta ainda mais o controle da doença, pois animais infectados podem ser diagnosticados como negativos, facilitando a disseminação do EIAV, prejudicando o controle da doença.

A técnica de *Spot Synthesis* é uma metodologia que realiza o mapeamento de sítios imunogênicos em uma determinada proteína para avaliar os principais epítomos com potencial uso em imunodiagnóstico e vacinas. O mapeamento de uma região gênica do EIAV realizado através desta técnica visa encontrar epítomos imunodominantes comuns para as espécies de equinos, asininos e muares, sendo uma ferramenta útil no desenvolvimento de um antígeno eficaz para o uso no diagnóstico laboratorial da AIE.

2 Objetivos

O presente trabalho visa mapear e identificar epítomos da proteína correspondente ao gene *env* do EIAV através da técnica de *Spot Synthesis*, para subsequente síntese de peptídeo solúvel e aplicação deste em ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da AIE em asininos, equinos e muares.

3. Revisão de literatura

3.1 Histórico da AIE

O primeiro relato de sinais clínicos associados a anemia infecciosa equina ocorreu em 1843 na França. Em 1904, os pesquisadores Valle e Carré publicaram um trabalho descrevendo o vírus da anemia infecciosa equina, sendo este o primeiro vírus de equinos a ser identificado, afirmando que o EIAV era um agente infeccioso e filtrável. Eles observaram a transmissão do vírus através da transferência de pequenas quantidades de sangue retirado de um cavalo infectado e inoculado em um burro, mostrando que o vírus persistiu no animal receptor mesmo após o desaparecimento dos sinais clínicos (Montelaro et al., 1993).

No Brasil, a AIE foi diagnosticada pela primeira vez em 1968 no extinto Estado da Guanabara por Dupont et al. (1968) e neste mesmo ano Guerreiro et al. (1968) também descreveram o primeiro caso no Estado do Rio Grande do Sul. Em Minas Gerais a doença foi descrita também em 1968, em um cavalo na Vila Hípica de Belo Horizonte, mas a descoberta só foi publicada em 1971 através de exames anatomopatológicos, citando ainda a comprovação de mais 18 casos em equídeos do Jóquei Clube de Minas Gerais (Batista Júnior e Fonseca, 1971).

Os dados oficiais da AIE em todo mundo não apresentam a verdadeira prevalência da doença, uma vez que se referem, exclusivamente, aos exames laboratoriais realizados para trânsito com a finalidade de venda dos animais ou participação em eventos agropecuários controlados pelos serviços oficiais de defesa sanitária animal de cada país (Santos; Leite; Reis, 2012).

Em um levantamento soroepidemiológico realizado por Almeida et al. (2006), em equídeos de serviço no Estado de Minas Gerais, considerando uma amostragem de 6540 soros oriundos de todas as regiões do estado, o mesmo foi considerado área endêmica para AIE, com uma prevalência média de 5,3% para rebanhos e 3,1% para animais. As mais altas prevalências para rebanhos foram encontradas na região Norte/Nordeste (14,9%) e região Vale do Mucuri/Jequitinhonha (12,5%). Um estudo realizado no município de Poconé na região do Pantanal Mato-grossense observou-se uma prevalência de 31,5 % de equídeos positivos para AIE e 52% de propriedades que tinham pelo menos um animal confirmado com a doença (Borges et al., 2013).

3.2 Etiologia

A anemia infecciosa equina é causada pelo EIAV, pertencente ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae* e subfamília *Orthoretrovirinae*, um vírus envelopado que possui genoma constituído por duas fitas simples idênticas de RNA não complementares, de polaridade positiva. Seu núcleo tem forma cônica e a simetria do capsídeo é icosaédrica (Clements; Zink, 1996, Leurox; Cadore; Montelaro, 2004).

O EIAV possui o mais simples genoma dentre os lentivírus e contém três genes estruturais e funcionais denominados: *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas da estrutura viral e algumas enzimas (Montelaro, 1993; Clements; Zink, 1996). O gene *gag* codifica as proteínas p9, p11, p15 e p26 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 respectivamente (Leroux; Cadore; Montelaro, 2004). O EIAV apresenta ainda três fases abertas de leitura que codificam proteínas reguladoras da replicação viral (*tat*, *rev* e *S2*) (Stephens; Casey; Rice, 1986).

3.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos da AIE são variáveis, pois dependem da dose e da virulência da amostra infectante, como também da susceptibilidade individual do hospedeiro. Apesar disso, a resposta clínica dos equídeos acometidos pelo EIAV pode ser dividida em três fases: aguda, crônica e inaparente (Sellon et al., 1994).

As principais manifestações clínicas da fase aguda são a trombocitopenia associada à febre, anorexia, palidez de mucosas, hemorragias petequiais, icterícia e edema nas regiões inferiores do corpo, com uma duração de 5 a 30 dias pós-infecção (Cook et al., 1998).

A fase crônica da AIE é caracterizada por ciclos recorrentes de viremia que é associada aos sinais 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 a meses e, neste período, a maioria dos animais tornam-se assintomáticos (Newman et al., 1991). Equinos que estiveram assintomáticos por alguns meses ou anos podem apresentar episódios de febre após o tratamento com drogas imunossupressoras. Alguns animais infectados podem nunca demonstrar os sinais clínicos, passando ao estágio de portador inaparente, sem passar pelas fases aguda e crônica da doença (Issel; Coggins, 1979).

Achados clínico-patológicos e laboratoriais em muares mostraram que estes indivíduos produzem sinais clínicos semelhantes ou mais brandos que os observados em equinos (Spyrou et al., 2003). Os asininos, apesar de serem susceptíveis ao EIAV, apresentam títulos de viremia muito baixos quando comparados aos equinos, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem os sinais clínicos da doença (Cook et al., 2001).

3.4 Transmissão

O EIAV é transmitido por vetores mecânicos, que carregam o sangue infectado na probóscide e infectam os equídeos através da picada. Os principais insetos transmissores são os tabanídeos (*Tabanus sp.*), conhecidos como mutucas, as moscas do estábulo (*Stomoxys sp*) e também por alguns culicídeos que são conhecidos por mosquito pólvora (Leroux et al., 2004; Greg; Polejaeva, 2009). Nos vetores, o EIAV permanece vivo por um período de 30 minutos a 4 horas e a eficiência da transmissão é altamente dependente da carga viral dos animais infectados (Hawkins et al., 1976).

A transmissão também pode ocorrer de forma iatrogênica através de fômites contaminados, como arreios, agulhas, material cirúrgico, luvas de palpação, materiais para casqueamento e ferrageamento. Estudos sobre a viabilidade do EIAV em agulhas contaminadas com sangue indicam que este vírus permanece infectante por até 96 horas (Williams et al., 1981). O EIAV pode ser transmitido através da ingestão de leite e colostro e pela placenta em éguas com viremia que infectam o feto ao nascer (Issel et al., 1999; Clabough, 1990).

Outra possível fonte de transmissão relatada foi através das vias aéreas, por aerosol, em um surto de AIE na Irlanda em 2006, onde estavam confinados 12 animais, em condições de controle da doença, não sendo encontrados insetos hematófagos no período de confinamento e a transmissão iatrogênica foi praticamente descartada. A única fonte comum identificada neste caso foi a transmissão pelo ar, ocorrendo supostamente após lavagem com água pressurizada de uma baia que tinha grande quantidade de sangue de um animal que teve uma hemorragia profusa e era positivo para AIE. A suspeita se reforça depois que foi detectado o EIAV, através da técnica de imunistoquímica, no epitélio pulmonar do animal que foi infectado (Bolfi et al., 2013).

3.5 Tropismo Celular

O EIAV infecta principalmente monócitos e macrófagos. A viremia associada a células desenvolve-se, com disseminação pelo organismo. Os macrófagos são os principais reservatórios do vírus, que provocam a viremia e disseminação do mesmo para diferentes tecidos. Os equinos infectados não eliminam o vírus, apesar de produzirem uma forte resposta imunológica. Tornam-se persistentemente infectados após a inserção do provírus no genoma das células hospedeiras (Murphy, 1999).

A identificação do EIAV em células endoteliais e células dendríticas, sugerem que estes tipos celulares também sirvam de reservatório viral em portadores inaparentes (Maury et al., 1998). Durante os episódios febris, o EIAV se replica predominantemente nos macrófagos maduros no baço, fígado, linfonodo, pulmões, rins e na glândula adrenal (Sellon et al., 1994).

3.6 Imunidade celular e humoral

Além de infectar macrófagos, o EIAV induz a ativação de linfócitos T citotóxicos CD8+, que estão relacionados ao controle inicial da viremia. Subseqüentemente, os animais desenvolvem linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória, desenvolvendo assim uma resposta imune efetiva duradoura, capaz de manter a replicação viral abaixo do limiar para a indução da doença (Zhang, et al., 1999; McGuire et al., 2004). Os linfócitos T CD4+ induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (IFN- γ),

interleucina- 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12), que promovem a produção de células de defesa no organismo, ativando a resposta imune celular para combater o vírus (Wang et al., 2004).

Animais infectados pelo EIAV desenvolvem resposta imune contra as glicoproteínas de superfície (gp90) e transmembrana (gp45), e a principal proteína do core viral (p26). Apesar da p26 ser a mais abundante proteína da partícula viral, a resposta humoral anti-p26 é de 10 a 100 vezes menor do que a observada para a gp90 e a gp45 (Hammond et al., 1999). Baixos níveis de anticorpos neutralizantes apareceram 23 a 46 dias pós-infecção, demonstrando que altos níveis de atividade anti-glicoproteínas não têm ação antiviral (O'Rourke et al., 1988).

Nas fases iniciais da infecção, o controle da viremia coincide com o aparecimento de linfócitos T citotóxicos, o que ocorre antes do aparecimento de anticorpos neutralizantes. Em cavalos portadores, o tratamento com drogas imunossupressoras resultam em viremia antes que mudanças nos títulos de anticorpos neutralizantes ocorram (McGuire et al., 2004). Os anticorpos neutralizantes capazes de bloquear a infecção aparecem somente depois de 2 a 3 meses pós-infecção, sugerindo que não são responsáveis pelo término do episódio agudo inicial. Estudos sobre o EIAV indicam que o papel dos anticorpos neutralizantes na infecção ainda é incerto. Apesar disso, o reaparecimento dos sinais clínicos característicos da doença está associado com a emergência de variantes que escapam dos anticorpos neutralizantes, sugerindo que a resposta neutralizante é eficiente no controle da replicação das variantes virais (Montelaro et al., 1984; Leroux et al., 1997; Leroux et al., 2001).

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico da anemia infecciosa equina não é confiável se baseado apenas em sinais clínicos ou resultados das análises de patologia clínica. A maioria dos animais infectados com EIAV apresenta resultado positivo em um ou mais testes sorológicos, mas não apresentam nenhum sinal clínico característico da doença. Diversos trabalhos listam alterações nos parâmetros sanguíneos, mas nenhum deles é patognômico para AIE (Cook; Leuroux; Issel, 2013).

Diferentes testes sorológicos já foram usados para o diagnóstico da AIE, e o primeiro teste sorológico empregado foi a fixação de complemento, mas os resultados dos testes foram insatisfatórios, já que a IgG dos equinos não fixava bem o complemento (Nakajima et al., 1972). Outro teste sorológico testado foi o de inibição da hemaglutinação (HI), mas foi observado que o soro sanguíneo de cavalos infectados em estágios iniciais da doença era inibido por antissoro homólogo, e os anticorpos eram detectados antes da produção dos anticorpos neutralizantes (Sentsui e Kono, 1981).

A IDGA, uma prova de precipitação de complexos antígeno-anticorpo foi o primeiro teste confiável para detectar anticorpos específicos para EIAV em formato comercial, e utiliza a proteína p26 do capsídeo viral como antígeno para detecção de anticorpos anti-p26. O antígeno foi produzido inicialmente a partir de triturados de baço de animais infectados e, posteriormente, adaptado para a utilização de antígeno preparado em cultura de leucócitos de cavalo (Nakajima; Ushimi 1971; Nakajima; Fukunaga; Ushimi, 1974).

Os antígenos que são comumente utilizados nos kits de IDGA, proteína p26, são extraídos principalmente de células FEK (*Fetal equine kidney*) e ED (equine derm) infectadas com o EIAV (Issel; Cook, 1993). Os antígenos começaram a ser produzidos utilizando a tecnologia de DNA recombinante (proteínas recombinantes), e atualmente são produzidos com grande pureza. O diagnóstico a partir de proteínas recombinantes gera menos reações inespecíficas (Alvarez et al., 2007; Piza et al., 2007). Porém, os antígenos recombinantes apresentam linhas de precipitação com menor intensidade em relação aos antígenos produzidos a partir de células infectadas com o EIAV (Issel et al., 2012).

O teste de IDGA é recomendado para diagnóstico da AIE, e é oficial no Brasil, mas pode apresentar incapacidade de detectar anticorpos específicos no início da infecção, o que compromete a eficiência dos programas de controle e erradicação da doença (Reis et al., 1994; Reis et al., 1997). No estágio inicial da infecção os títulos de anticorpos séricos não são detectáveis no teste de IDGA, o que ocorre em média a partir de 45 dias pós-infecção. Resultados negativos nos exames sorológicos estão associados à ausência ou baixo título de anticorpos específicos (Coggins; Norcross; Nusbaum, 1972).

Desde 1980, para tentar aprimorar e melhorar o diagnóstico da AIE, uma série de testes sorológicos baseados em ELISA estão sendo descritos (Issel et al., 2012). Alguns destes testes têm sido desenvolvidos e aprovados em alguns países, apresentando boa correlação com o teste IDGA e melhor sensibilidade em muitos casos, principalmente na detecção de animais positivos na fase inicial da

infecção, considerado um excelente teste de triagem (Reis et al., 2012, Issel et al., 2012), além de apresentar menor subjetividade na leitura dos seus resultados, pois os anticorpos podem ser quantificados com a utilização de espectrofotômetros (Issel; Cook, 1993).

Em 1997, Reis et al. desenvolveram um ELISA utilizando a glicoproteína recombinante gp90 detectando anticorpos anti EIAV mais precocemente do que o ELISA que utiliza a proteína p26. O ELISA rgp90 apresentou maior sensibilidade que a IDGA, apresentando grande potencial para ser um teste de triagem no qual possa ser utilizado em grandes levantamentos soro epidemiológicos, além de detectar soros que apresentaram reações fraco positivas na IDGA (Martins, 2004). O ELISA rgp90 ainda não é considerado como teste oficial no Brasil e tem sido usado apenas em caráter experimental em levantamentos sorológicos e pesquisa (Almeida et al., 2006).

Diversos trabalhos mostraram a maior sensibilidade do ELISA comparada a IDGA (Sugiura et al., 1995; Reis et al., 2012, Scicluna et al., 2013). Reis et al., (1994) relataram um caso de erradicação da AIE em um rebanho de eqüídeos, onde 470 soros foram testados simultaneamente por ELISA e IDGA, demonstrando que os anticorpos específicos para EIAV foram detectados pelo ELISA um mês antes do que pela IDGA. O sucesso da erradicação foi atribuído ao uso de testes de maior sensibilidade como o ELISA

O *imunoblot* é um teste utilizado principalmente na pesquisa científica, mas foi implementado como teste confirmatório pelo Programa Nacional de Vigilância da Anemia Infecciosa Equina na Itália. Este teste detecta simultaneamente anticorpos anti-proteínas p26, gp45 e gp90 do EIAV e tem se mostrado sensível (Issel et. al., 1999, Cook, Leuroux, Issel, 2013). O *imunoblot* é recomendado como um complemento útil para o diagnóstico da AIE, pois os animais infectados que apresentavam baixos níveis de anticorpos anti-p26 e apresentaram resultados divergentes entre IDGA e ELISA, foram confirmados positivos pelo *imunoblot* (Issel et al., 2013; Cook, Leuroux, Issel, 2013). Esse método não está disponível comercialmente, mas é utilizado como um diagnóstico confirmatório da AIE no laboratório referência da Universidade de Kentucky, nos Estados Unidos da América (<http://dept.ca.uky.edu/eia/index.aspx>).

O diagnóstico molecular da AIE é realizado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA proviral do EIAV em células mononucleares do sangue periférico. É uma técnica específica e sensível não só para identificar cavalos em fase inaparente, como também cavalos recentemente infectados (Issel e Cook, 1993). A PCR tem sido proposta como método de diagnóstico confirmatório para a AIE e outras retrovirose, e para estudos da variabilidade genética desses vírus (Nagarajan; Simard, 2001; Camargos, 2005). Diversos trabalhos descreveram PCRs convencionais para detecção de amostras de campo do EIAV (Cappelli et al., 2011; Capomaccio et al., 2012; Dong et al., 2012). Existem algumas limitações no uso da PCR para o diagnóstico da AIE, como por exemplo a grande variabilidade genética do vírus, a baixa concentração de vírus presente no plasma e/ou provírus nas células mononucleares de sangue periférico, especialmente em animais em fase inaparente da infecção, dificultando o diagnóstico acurado da infecção (Issel et al., 2012, Scicluna et al., 2013, Cook; Leuroux; Issel, 2013). Adicionalmente, a especificidade do teste é considerada satisfatória quando são usados iniciadores dirigidos a uma região conservada no genoma do EIAV, como a região *gag* (KIM et al., 1992; LANGEMEIER et al., 1996).

Compreende-se que é necessário realizar o diagnóstico diferencial para AIE, já que outras infecções podem gerar sinais clínicos semelhantes, como a influenza e as encefalites equinas (Ravazzolo, Costa, 2007). Na doença aguda, o diagnóstico diferencial inclui: púrpura hemorrágica, babesiose, erliquiose granulocítica equina, arterite viral equina, anemia hemolítica auto-imune, leptospirose e trombocitopenia idiopática. Já na apresentação crônica considera-se: infecção por *Streptococcus equi*, doenças inflamatórias crônicas, neoplasias e hepatite crônica (Radostits et al., 2000).

3.8 Problemática do diagnóstico da AIE

A IDGA é a prova recomendada pela OIE (Alvarez et al., 2007, Piza, et al. 2007) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo o único teste autorizado para o diagnóstico da AIE no Brasil até novembro de 2014. Este teste necessita da presença de grandes quantidades de antígeno e anticorpos para produzir uma linha visível de precipitação, e animais em início de infecção podem não produzir anticorpos suficientes para a detecção pela IDGA (Alvarez et al., 2007, Piza, et al. 2007).

Este teste apresenta algumas desvantagens, como longo tempo de execução, visto que a leitura final leva até 48 horas para ser realizada, subjetividade na leitura dos resultados, como a necessidade de um médico veterinário experiente e bem treinado para dar o diagnóstico correto. Outra limitação seria a

menor sensibilidade em relação a outros testes utilizados, como ELISA e o *Imunoblot*, e pode ainda demonstrar resultados falsos negativos ou duvidosos, principalmente quando se trata de animais recentemente infectados ou asininos que normalmente possuem baixos títulos de viremia e, conseqüentemente, de anticorpos específicos (Cook et al., 2001; Motta, 2007, Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). Em relação aos asininos, tem sido descrita uma discordância entre os resultados da IDGA e do ELISA. Motta (2007) encontrou 12 amostras de soro sanguíneo de asininos positivas no ELISA sendo que sete foram positivas na nested-PCR e negativas na IDGA. Oliveira (2011) observou que de 122 amostras de soro sanguíneo testadas, 49 foram positivas em teste de ELISA rgp90 e negativas em IDGA.

Cook et al. (2001) realizaram um trabalho experimental utilizando cinco pôneis e três asininos inoculados com duas amostras patogênicas do EIAV. Um dos parâmetros avaliados foi comparar a resposta sorológica, sendo que os pôneis foram positivos em ELISA com a proteína p26 como antígeno entre os dias 21 e 28 pós infecção, e nos asininos não foram detectados anticorpos antes do 42º dia pós infecção. Além de se detectar reações positivas mais tardiamente, os asininos apresentavam reações fracamente positivas na IDGA. Como em algumas regiões do Brasil o número de asininos é expressivo, o controle da AIE baseado no diagnóstico pela IDGA pode estar comprometido nestas áreas, sendo necessário um estudo nesta espécie para se estimar o grau de sensibilidade da IDGA (Oliveira, 2011).

Em observações realizadas em muares, em experimento realizado por Spyrou et al., (2003), duas mulas foram inoculadas com 10 mL de sangue total de uma mula infectada com o EIAV. Os animais inoculados apresentaram alguns sinais clínicos sugestivos da AIE, no qual foi observada a presença de febre apenas no sexto dia de observação. Apesar de terem apresentados alguns sinais clínicos sugestivos da AIE, foram negativos à pesquisa de anticorpos específicos pela IDGA até 30 dias pós-inoculação.

Em um estudo realizado na Itália, alguns muares mostraram resultados contraditórios em testes de diagnóstico, sendo que foram positivos em ELISA e negativos na IDGA (Issel et al., 2012). Diante disso, um estudo foi conduzido nas mulas para investigar se havia uma correlação entre carga viral e a resposta sorológica. Foram avaliadas 5 mulas positivas e 5 mulas negativas ou com resultados fraco positivos em IDGA, mas todas positivas em ELISA e *imunoblot*. Os animais foram imunossuprimidos com dexametasona e acompanhados por 56 dias, e observaram que os animais não apresentaram sinais clínicos característicos da AIE neste período e não houve a soroconversão no diagnóstico pela IDGA. Porém, todas as mulas foram positivas em nested PCR e apresentaram sequências de DNA proviral semelhantes (Scicluna et al., 2013). Os ensaios baseados em PCR são uma valiosa ferramenta de pesquisa, mas conseguem detectar o EIAV apenas em casos de recente exposição quando a replicação viral ocorre em títulos elevados, e assim não são adequados para uso em diagnóstico de rotina, pois pode haver variação genética do vírus, impedindo sua detecção pela PCR, sendo assim, os testes sorológicos são os mais recomendados para o diagnóstico de rotina (Scicluna et al., 2013).

Alguns trabalhos mostraram que a realização de triagem em equídeos utilizando o teste de ELISA, usando a IDGA como teste confirmatório e o *imunoblot* como um teste final para esclarecer os resultados discordantes entre ELISA e IDGA, aumentou a identificação dos casos positivos de AIE em 17%. A pesquisa também demonstrou maior sensibilidade e menor especificidade do ELISA, sendo que 0,19% de amostras foram julgadas como falso positivas no ELISA e a IDGA teve uma menor sensibilidade, sendo que 0,026 % foram julgadas como falso negativas (Issel et al., 2013).

Uma combinação de testes para AIE, resulta em um diagnóstico mais acurado da infecção. Uma estratégia recomendada seria utilizar um fluxograma de investigação laboratorial realizado em três etapas (Figura 1), sendo a primeira etapa um teste de triagem utilizando um ELISA, caso o teste seja positivo realizar o reteste, e se persistir o resultado, seguir para a segunda etapa, que seria testar a amostra positiva em outro formato de ELISA, e caso a amostra se confirme positiva, utilizar o teste de IDGA, e caso os resultados dos testes de ELISA e IDGA fossem discordantes, seria realizado o *imunoblot* que é considerado um teste confirmatório. Este sistema tem sido utilizado pelo Programa Nacional de Vigilância da Anemia infecciosa equina na Itália, no qual houve um controle da AIE bastante eficaz desde que foi implementado (Cook, Leuroux, Issel, 2013).

1ª etapa – Diagnóstico de triagem utilizando ELISA

Negativo	Animal liberado
Positivo Reteste para verificação ; resultado negativo	Animal negativo
Se positivo, realizar segunda etapa	

2ª etapa – Testar amostra positiva em outro formato de ELISA

Negativo	Animal negativo
Positivo em apenas um teste de ELISA	Animal negativo
Positivo em 2 testes de ELISA, fazer teste de IDGA	

IDGA

Se positivo	Animal positivo
Se negativo, realizar a terceira etapa	

3ª etapa – Diagnóstico confirmatório utilizando o *Imunoblot*

Se positivo para proteínas gp90, gp45 e p26	Animal positivo
Se positivo para as proteínas gp90 e gp45	Animal positivo
Se positivo apenas para proteína p26	Animal negativo
Negativo para todas proteínas	Animal negativo

Figura 1: Proposta de fluxograma de diagnóstico para anemia infecciosa equina (Cook; Leuroux; Issel, 2013)..

Faz-se necessário o desenvolvimento de novos testes de diagnósticos para a AIE que sejam mais rápidos, tenham maior sensibilidade e capacidade em detectar animais em fases precoces da infecção, principalmente em surtos da doença (Cullinane et al., 2007, Issel et al., 2012), além de utilizar a combinação de testes de diagnóstico, semelhante ao utilizado pelo Programa Nacional de Vigilância da AIE na Itália em três níveis, para que se assegure que realmente todos os animais infectados sejam detectados, não havendo assim o risco de transmissão e manutenção da doença nos rebanhos (Scicluna et al., 2013; Cook; Leurox; Issel, 2013).

3.9 Controle

A AIE atualmente representa um grande obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, por ser uma doença transmissível e incurável, acarretando prejuízos aos proprietários que necessitam do trabalho desses animais e aos criadores interessados na melhoria das raças, além de impedir o acesso ao mercado internacional (Almeida et al., 2006). Considerando que mais de 95% dos animais infectados são portadores assintomáticos e que ainda não foi desenvolvida uma vacina eficaz contra a AIE, o diagnóstico laboratorial tem papel fundamental no controle e prevenção da doença (Ferraz, 1998).

De acordo com a legislação brasileira, os animais positivos em teste de IDGA devem ser indicados para a eutanásia ou segregados, dependendo da situação epidemiológica da região, que será definido pela Comissão Estadual para o Controle da Anemia Infecciosa Equina (CECAIE) de cada estado. Deve ser realizado exame da AIE em todos os equinos existentes em propriedade com animais infectados (Brasil, 2004). A detecção ativa de casos com testes sorológicos periódicos e separação dos potros filhos de éguas positivas, são também estratégias indicadas para o controle e erradicação da AIE (Brangan et al., 2008).

Em caso de surtos da AIE em uma propriedade, deve-se fazer a interdição da movimentação dos animais, isolamento dos suspeitos ou soropositivos, proibição da participação em eventos, feiras e leilões e eutanásia dos comprovadamente positivos. Quando houver a introdução de um animal no plantel, deve-se exigir o atestado negativo para AIE ou manter o mesmo isolado durante 30 dias e realizar um exame sorológico (Weiblen, 2001).

Em regiões como o Pantanal Mato-grossense, com alta prevalência da infecção pelo *EIAV*, a eutanásia de todos os animais positivos comprometeria significativamente a pecuária extensiva, que é a principal atividade econômica na região. Uma alternativa de controle da AIE em regiões com alta prevalência é a segregação dos animais positivos, sendo esta uma prática de prevenção e controle para a região como o Pantanal (Silva et al., 2001).

Recomenda-se fazer a desinfecção e esterilização de todos os instrumentais cirúrgicos, aparelhos dentários e qualquer outro material que possa ter entrado em contato com o sangue de um equino. A desinfecção química de instrumentos e equipamentos de marcação requer sua imersão por 10 minutos em desinfetantes. Todos os materiais a serem desinfetados precisam ter primeiramente, qualquer matéria orgânica removida (Radostits et al., 2000).

Pelo fato de não existirem vacinas disponíveis, o controle da AIE nos equídeos se faz com a identificação, segregação ou eutanásia dos animais infectados. Somente em países como China e Cuba tem sido executado um programa de vacinação usando amostras atenuadas do *EIAV*, que protege os animais apenas contra variantes homólogas do vírus (Montelaro et al., 1993).

3.10 Spot synthesis

A técnica de *Spot Synthesis* é uma metodologia que vem sendo utilizada no estudo de caracterização e mapeamento de epítomos (Laune et al., 2002; Alvarenga et al., 2002; Machado De Avila et al., 2004). Esta técnica baseia-se na verificação da reatividade de anticorpos monoclonais ou policlonais frente a peptídeos sobrepostos sintetizados sobre uma membrana de celulose de forma a percorrer parte ou toda proteína estudada, variando-se de dois em dois ou de três em três aminoácidos C-terminais (Frank, 1992).

Uma mesma membrana pode abrigar diversos peptídeos individualizados e assim, sequências peptídicas diferentes podem ser sintetizadas em uma pequena área, sem que haja interação significativa entre elas. Para a detecção da reatividade de epítomos específicos, pode-se utilizar qualquer sistema colorimétrico ou de fluorescência já estabelecido para outras técnicas, como ELISA ou Western blot. Uma vez que um possível sinal positivo estará limitado ao sítio ou spot reativo no qual será sintetizado, torna-se possível a sua identificação (Frank, 1992).

Esse é um método que permite análise da reatividade de várias moléculas diferentes de forma simultânea. A técnica de *spot synthesis* é automatizada, permitindo a síntese eficiente de centenas de peptídeos em uma mesma membrana, permitindo a geração de dados em larga escala (Durauer et al., 2006).

São poucas as técnicas desenvolvidas *in silico* para a identificação de epítomos, devido à inerente dificuldade de simular experimentalmente a conformação precisa dessas regiões (Van Regenmortel; Pellequer, 1994). A técnica de *Spot synthesis*, inicialmente, se prestou ao mapeamento de epítomos lineares, mas algumas modificações foram propostas para permitir a identificação também de epítomos descontínuos. O mapeamento de epítomos contínuos é extremamente importante para o entendimento das bases moleculares da imunogenicidade e pode ser utilizado para a geração de novas metodologias de diagnóstico, vacinas e tratamento (Reineke et al., 1999).

4. Material e Métodos

4.1 Locais de Realização do Experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) e no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG).

4.2 Mapeamento dos epítomos

Para realizar o mapeamento dos epítomos da proteína correspondente ao gene *env* do EIAV (acesso Genbank: AAB59863), foi realizada a síntese de peptídeos sobre membrana de celulose pela técnica de *Spot Synthesis* (Frank, 1992). Foram sintetizados 283 peptídeos construídos com 15 aminoácidos cada, seguindo a sequência linear da proteína, e sobrepondo de três em três aminoácidos em cada peptídeo até que toda a sequência de aminoácidos do gene *env* EIAV tivesse sido percorrida.

O protocolo de síntese utilizado é o mesmo descrito por Laune et al., (2002), utilizando sintetizador automático (ResPepSL/Automatic Spot Synthesizer, Intavis GmbH, Köln, Alemanha). Foram utilizados os aminoácidos-FMOC (fluorenil-metil-oxicarbonila) da marca Novabiochem®, contendo grupamentos FMOC acoplados à sua função amina e grupos protetores em suas cadeias laterais. Os peptídeos foram montados utilizando a química FMOC em uma membrana de celulose, obtendo-se aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana (Frank, 1992).

Foram realizados dois ciclos de acoplamento para cada aminoácido. Para evitar reações colaterais e acoplamentos de aminoácidos de forma irregular, as funções NH₂ que, porventura, permanecerem livres após o acoplamento foram acetiladas com anidrido acético 10% em dimetilformamida (DMF). O grupo FMOC do aminoácido recém-acoplado foi retirado em meio básico pela 4-metilpiperidina a 25%, possibilitando a adição do próximo aminoácido. Os ciclos se repetiram até a síntese total dos peptídeos. Ao final da síntese, os grupos protetores de cadeias laterais foram removidos por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA) a 95%, tri-isopropilsilano (TIPS) a 2,5% e água deionizada (2,5%). As membranas sintetizadas foram congeladas a -20°C até a realização dos ensaios imunoquímicos.

4.3 Ensaios imunoquímicos

Para os ensaios imunoquímicos, foram testadas amostras de soro sanguíneo (*pool* de 5 animais) de equinos, asininos e muares, testadas separadamente. Inicialmente foram testadas as amostras de animais com resultados negativos pela IDGA, para confirmar a especificidade dos peptídeos adsorvidos na membrana de celulose. Depois foram testadas as amostras dos animais com resultados positivos pela IDGA para determinação das regiões mais imunogênicas em cada espécie.

Para a realização de estudos acerca da ligação dos anticorpos aos peptídeos e mapeamento dos epítomos da proteína correspondente ao gene *env* do EIAV, a membrana foi retirada do freezer e tratada com etanol 96% por 5 minutos sob agitação. A membrana foi lavada com 15 mL de TBS 1x NaCl por 10 minutos por agitação e bloqueada com 15 mL tampão TBS tween 0,1% sacarose 5% e caseína 5%, incubada a temperatura ambiente sob agitação por 12-16 horas.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada sob agitação com 15 mL de tampão TBS-Tween-20 0,1% por 10 minutos e incubada sob agitação, por 2 horas com as amostras de soro sanguíneo diluído na solução de bloqueio. As diluições dos soros testados para avaliação da melhor diluição para se mapear os epítomos foram de 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween-20 0,01% por 10 minutos e incubada com 15 mL de conjugado anti-IgG equino marcado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluídos na solução bloqueio na proporção 1:2000, por uma hora, sob agitação. Após duas lavagens em TBS-Tween-20 0,1%, e outras duas lavagens em tampão salina citrato (CBS) pH 7 (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 2,1 g de ácido cítrico monoidratado; água q.s.p 1 L), por 10 minutos cada, à temperatura ambiente, foi adicionado substrato contendo MTT (Bromídeo de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e MgCl₂ (Sigma-Aldrich). Após 20 minutos, a reação foi interrompida com água destilada.

Após a realização de cada ensaio imunoquímico, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração. Foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada com DMF; três lavagens de 10 minutos cada com reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0,1% de 2-mercaptoetanol); e três lavagens de 10 minutos cada com reagente B (etanol, água, ácido acético nas proporções 50:40:10 v/v/v). As membranas não utilizadas imediatamente após a regeneração foram congeladas a -20 °C.

Os spots foram detectados pelo método de colorimetria direta, quando cinco avaliadores quantificaram visualmente as intensidades das colorações dos spots e classificaram as mesmas em uma escala de 0 a 4 (Figura 1). A partir dessas quantificações, as intensidades de coloração médias foram estabelecidas. Foram considerados reativos os spots que apresentaram médias de observações igual ou superior a 2. Com base nos resultados dos ensaios imunquímicos realizados, nas análises das reatividades dos spots e em dados da literatura, foi feita a seleção de prováveis epítomos imunodominantes do envelope do EIAV para as espécies de equinos, asininos e muares, para a síntese solúvel de um peptídeo consenso reativo com soro sanguíneo das três espécies.

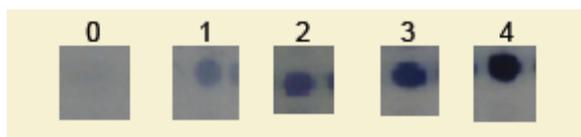


Figura 1: Classificação da intensidade de reatividade dos spots em uma escala de 0 a 4

4.4 Síntese solúvel do peptídeo

O epítopo selecionado foi sintetizado pelo método desenvolvido por Merrifield, (1969), com a utilização de um sintetizador automático (ResPepSL/Automatic Spot Synthesizer, Intavis GmbH, Köln, Alemanha) (GAUSEPOHL et al., 1992). O método consistiu em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel, uma resina, e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos. Os aminoácidos utilizados foram protegidos pelo grupamento FMOC em sua função amina e em sua cadeia lateral para evitar reações indesejadas. Foi utilizada a resina Rink Amide (Sigma-Aldrich), protegida por grupos FMOC, como suporte sólido.

O tubo de síntese contendo a resina foi lavado três vezes com 1 mL de DMF e em seguida foi adicionada 4-metilpiperidina a 25%, incubando sob agitação por 20 minutos para eliminar os grupos FMOC da resina. Após três novas lavagens com DMF, iniciou-se o acoplamento: o primeiro aminoácido (40 μ M) foi adicionado juntamente com os ativadores da função carboxila, Oxyma (100 μ M) e diisopropilcarbodiimida (DIPC) (100 μ M), sendo deixado sob agitação por 30 minutos. Após o acoplamento, três novas lavagens com DMF foram realizadas; e foi iniciada a etapa de desproteção, na qual o grupamento FMOC do aminoácido acoplado foi removido pela 4-metilpiperidina a 25%, por 20 minutos.

Posteriormente, três novas lavagens com DMF foram realizadas, e o protocolo de acoplamento do segundo aminoácido foi reiniciado. Este ciclo de desproteção/acoplamento foi realizado até que todos os aminoácidos do peptídeo em síntese fossem acoplados.

Após o acoplamento do último aminoácido, o peptídeo foi removido da resina por uma etapa de clivagem. Nessa etapa também foram eliminados os grupamentos protetores das cadeias laterais. Para isto, o peptídeo foi incubado por três horas com uma solução de clivagem contendo 2,5% de EDT (etanoditiol - Fluka), 2,5% de água destilada, 2,5% de TES (trietilsilano - Fluka) em TFA. Em seguida, essa solução foi filtrada e precipitada com éter etílico resfriado, obtendo-se o peptídeo. Finalmente, o éter foi eliminado após três ciclos de 20 minutos de centrifugação a 2000 g, o peptídeo foi ressuscitado em água deionizada e logo foi liofilizado. Os procedimentos descritos acima foram repetidos para a síntese de cada epítopo anteriormente selecionado.

4.5 Análises por bioinformática e predição da proteína 3D

As análises das massas moleculares, hidropaticidade e ponto isoeletrico (pI) dos prováveis epítomos foram realizados utilizando ferramentas disponibilizadas no portal Expsy (<http://expasy.org/proteomics>). Para as massas moleculares e o pI foi utilizada a ferramenta “Compute pI/MW” e para a análise da hidropaticidade foi utilizado o algoritmo de Hopp & Woods disponível em “ProtParam”. A predição da estrutura tridimensional da proteína correspondente ao gene *env* do EIAV foi realizada pela plataforma I-Tasser, disponível em <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Roy;

Kucukural; Zhangand, 2010) e a análise foi realizada utilizando o programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

A sequência de aminoácidos do epítipo foi analisada para se verificar a existência de homologia com as sequências de proteínas do envelope viral do EIAV, sendo as amostras Wyoming (Pretopoulos, 1997), Lyoming (Tu et al.; 2007), Ireland (Quinlivan et al.; 2013) e Miyazaki2011-A (Dong et al.; 2013), e de proteínas de envelope de outros lentivírus (HIV, FIV, BIV e CAEV) depositadas no *GenBank* através do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.) As sequências foram alinhadas e comparadas com o peptídeo utilizando o algoritmo clustalW2 do programa Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT/2K/XP (BioEdit) versão 7.0.9.0., disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> >.

4.6 Padronização de ELISA indireto

Para confirmar a reatividade e especificidade do peptídeo sintético, foi realizado o teste de ELISA indireto, denominado ELISA pgp45, com soro de equídeos naturalmente infectados pelo EIAV e não infectados. A padronização do teste de ELISA indireto foi realizada utilizando o peptídeo sintético solúvel selecionado pela técnica de *spot synthesis*.

O peptídeo pgp45 foi diluído em tampão carbonato/bicarbonato 50 mM (pH 9,6), nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 µg/poço e incubado em placas de ELISA de 96 cavidades (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) por 18 horas a 4° C. As placas foram lavadas por 2 vezes com salina tamponada (pH 7,0) contendo Tween 20 a 0,01% (PBS-Tween) e então incubadas por 1 hora com solução de bloqueio constituída de leite em pó desnatado a 5% em PBS-Tween. Nova lavagem foi realizada (3 vezes) e as amostras de um *pool* de soro sanguíneo de animais positivos ou negativos confirmados pela IDGA para AIE foram utilizadas em diluições partindo de soro puro até a diluição de 1:512, testadas em duplicata e, incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-Tween por 3 vezes e incubadas com conjugado na diluição 1:5000 (anticorpo secundário anti-IgG equina conjugado com peroxidase – (Sigma-Aldrich) por 1 h a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-Tween por 3 vezes, adicionou-se o substrato: solução de o-fenilenodiamina (OPD) (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato-citrato pH 5,0 (ácido cítrico 0,1 M; fosfato de sódio 0,2 M) por 10 minutos a temperatura ambiente. As reações foram interrompidas com solução de ácido sulfúrico 1N e as densidades ópticas lidas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492 nm.

4.7 Teste do ELISA utilizando o peptídeo pgp45

Depois de padronizado, o ELISA pgp45 foi testado nas seguintes amostras: em amostras cedidas pelo LANAGRO-MG com resultados em IDGA, em um animal experimentalmente inoculado com a amostra Wyoming do EIAV, no qual também foi testado em IDGA e ELISA gp90, em amostras de campo de equídeos do estado de Minas Gerais que foram testadas em IDGA e com soros sanguíneos de outras espécies animais que foram positivos para outros tipos de lentivírus.

Foram testados 107 soros de equídeos cedidos pelo LANAGRO-MG, sendo 63 positivos e 44 negativos para AIE em IDGA. Destes 14 eram de asininos, 49 de equinos e 44 de mueres, que foram testados no ELISA pgp45 para confirmar a especificidade e sensibilidade do ELISA. Também foi testado soro sanguíneo de um animal experimentalmente inoculado com a amostra "Wyoming" do EIAV, que foi utilizado em um experimento realizado no LANAGRO - MG, foram coletadas amostras do dia 0 ao dia 18 pós-inoculação.

Foram utilizadas 859 amostras de soro sanguíneo de equídeos, sendo 474 amostras de equinos, 179 amostras de asininos e 206 amostras de mueres de Minas Gerais que pertencem ao banco de soro do Laboratório de Retrovírus (RETROLAB) da Escola de Veterinária da UFMG, que foram testadas em IDGA. Para avaliar a especificidade do peptídeo sintético utilizado como antígeno no ELISA pgp45, foram utilizadas amostras de soro sanguíneo de humano, felino, bovino e caprino (n=5 para cada espécie) infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da imunodeficiência bovina (BIV) e o vírus da artrite encefalite caprina (CAE) respectivamente, utilizando o mesmo protocolo previamente descrito, alterando apenas a utilização dos conjugados específicos contra cada espécie (Sigma-Aldrich).

A determinação do ponto de corte do teste de ELISA pgp45 indireto foi realizada através da análise de Curva Roc utilizando o programa MedCalc versão 13.0.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Foi calculado valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, sensibilidade e especificidade relativa das amostras de campo que foram avaliadas. Para comparação entre as concordâncias observadas e esperadas entre os testes de diagnóstico realizados foi utilizado o teste Kappa (Landis; Kock, 1977), utilizando o Programa Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2007).

4.8 Análise de amostras discordantes entre ELISA pgp45 e IDGA

As amostras de campo que apresentaram resultados discordantes entre o ELISA pgp45 e a IDGA, foram avaliadas em ELISA rgp90 (Reis et al., 2012), ELISA competitivo p26 (kit autorizado nos Estados Unidos) e pelo *imunoblot* (Cook et al., 2005). Neste caso o *imunoblot* foi utilizado como o teste padrão ouro para a confirmação dos resultados, observando a concordância através do teste Kappa e calculando a sensibilidade e especificidade.

Para realizar o teste ELISA rgp90, a proteína rgp90 foi diluída em tampão carbonato 50 mM (pH 9,6), na concentração de 0,5µg/cavidade e incubada em placas de ELISA de 96 cavidades (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) por 18 h a 4° C. As placas foram lavadas por 2 vezes com salina tamponada (pH 7,0) contendo Tween 20 a 0.05% (PBS-Tween) e então incubadas por 1 hora com solução de bloqueio constituída de leite em pó desnatado a 5% em PBS-Tween. Nova lavagem foi realizada (3 vezes) e o soro na diluição 1:50 foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-Tween por 3 vezes e incubadas com solução de conjugado na diluição 1:10.000 (anticorpo secundário anti-IgG equina conjugado com peroxidase –Sigma-Aldrich) por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-Tween por 3 vezes, adicionou-se o substrato: solução de o-fenilenodiamina (OPD) (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tampão fosfato-citrato (pH 5,0) por 10 minutos em temperatura ambiente. As reações foram interrompidas com solução de ácido sulfúrico 1N e as densidades ópticas foram lidas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 492 nm (Reis et al; 2012).

Para o teste de ELISA competitivo, o protocolo foi utilizado de acordo com as instruções do Kit do cELISA EIA da marca IDEXX, lote 00124-GJ841 (http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/livestock-poultry/equine/equine-infectious-anemia.jsf).

Para realizar o teste de imunoblot, membranas de nitrocelulose foram bloqueadas em PBS com 5% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação. Após essa etapa, as membranas foram cortadas em tiras de 4 mm de largura e incubadas com os soros diluídos 1:20 em PBS com 1% de leite em pó desnatado durante 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente, seguido por quatro lavagens com PBS saturado com NaCl acrescido de 0,05% Tween 20. O conjugado (anticorpo secundário anti-IgG equina conjugado com peroxidase –Sigma-Aldrich) foi diluído 1:1500 em PBS com 1% de leite em pó desnatado e incubado com as tiras da membrana durante 1 hora, sob agitação. Lavou-se durante 10 minutos com PBS saturado com NaCl acrescido de 0,05% de Tween 20. Depois, lavou-se novamente por 10 minutos, com PBS saturado com NaCl. Por último, lavou-se com PBS durante mais 10 minutos. Todas as lavagens foram realizadas sob agitação. Adicionou-se o substrato de TMB (Promega), incubando as amostras por 5 minutos protegidos da luz. Retirou-se o substrato e adicionou-se água destilada para parar a reação. As membranas foram secadas em papel de filtro antes da visualização das reações. Foram consideradas positivas as amostras que apresentem reatividade com as proteínas p26, gp45 e gp90 ou apenas gp45 e gp90 (Cook et al., 2005).

5 Resultados

5.1 Mapeamento de epítomos e ensaios imunquímicos

Foram sintetizados 283 peptídeos, cada um contendo 15 aminoácidos, seguindo a sequência linear da proteína correspondente ao gene *env* do EIAV, e sobrepondo de três em três aminoácidos em cada peptídeo até que toda a sequência de aminoácidos correspondente ao gene *env* do EIAV tenha sido coberta. As sequências dos *spots* sintetizados na membrana de celulose estão expressas no anexo 1.

Para realizar o mapeamento do epítomos do gene *env* do EIAV, através da técnica de *spot synthesis*, foram utilizados *pool* de soro sanguíneo de equinos, asininos e muares positivos no teste de IDGA, sendo que cada espécie foi testada separadamente. O primeiro teste realizado foi para verificar se o conjugado anti-IgG de equino marcado com fosfatase alcalina apresentaria possíveis reações inespecíficas (figura 2). Nenhum *spot* teve uma reatividade evidenciada, mostrando ausência de reação inespecífica entre o conjugado anti-IgG de equino marcado com fosfatase alcalina e os peptídeos sintetizados na membrana de celulose.

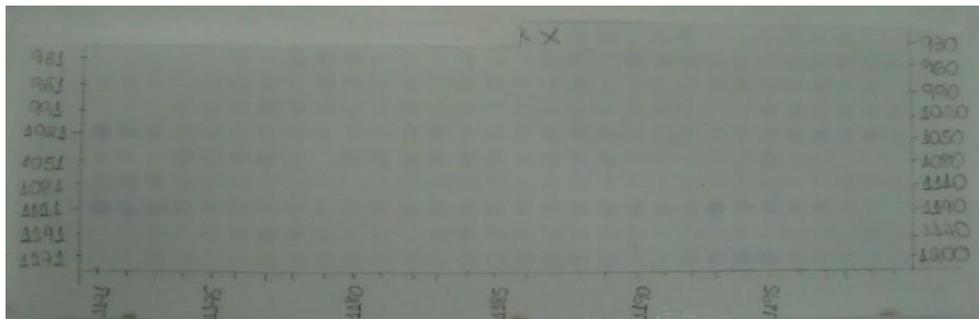


Figura 2: Ensaio imunológico para teste do conjugado anti-IgG equino marcado com fosfatase alcalina.

Os ensaios imunológicos realizados foram testados com os soros das três espécies de equídeos nas diluições 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000. As reações inespecíficas foram eliminadas na medida em que se aumentou a diluição do soro, sendo a diluição ideal definida em 1:1000. Nos testes imunológicos realizados para cada espécie de equídeo, foi observado que tanto equinos, asininos e muares, apresentaram reação nos mesmos epítomos, sendo possível identificar uma região imunogênica comum dentro do gene *env* do EIAV para as três espécies (figura 3).

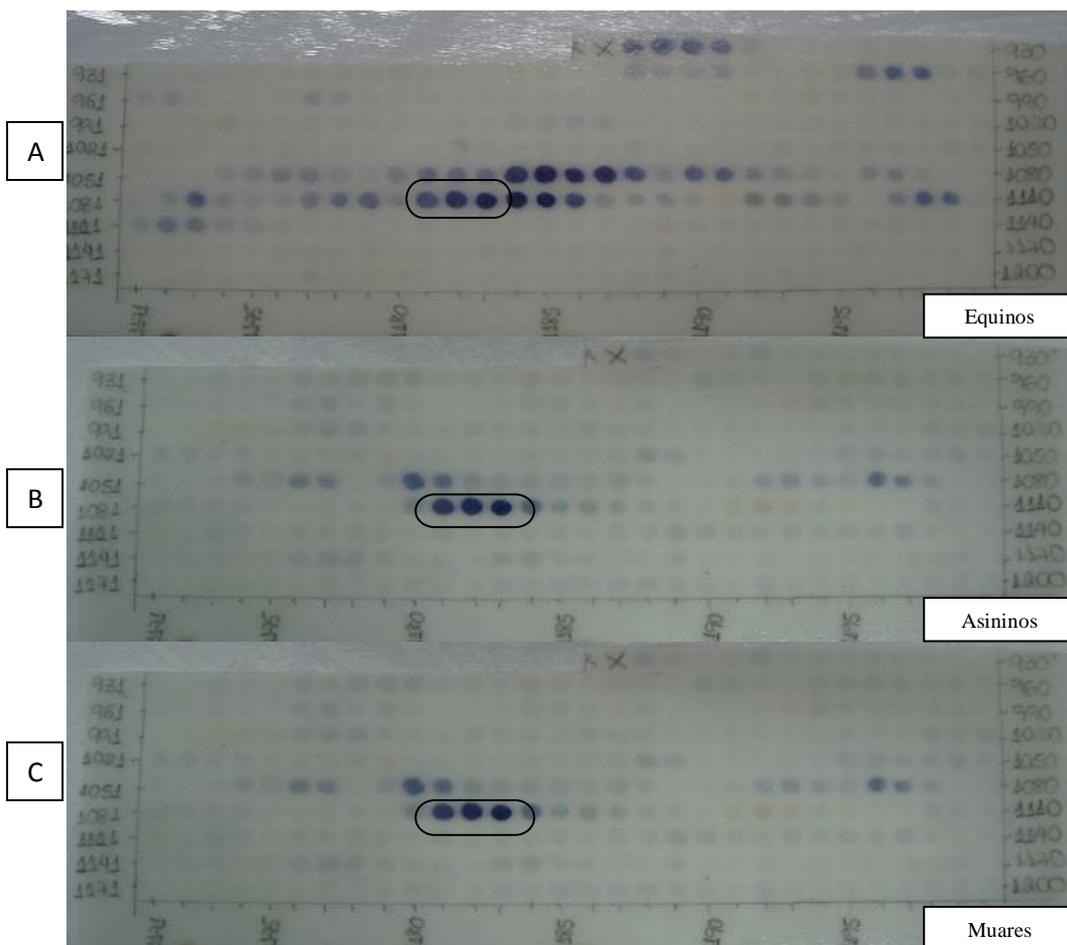


Figura 3: Reação de um pool de soros reativos para AIE em membranas com peptídeos correspondentes ao gene *env* do EIAV. Os spots reativos, onde houve a detecção dos epítomos, adquiriram coloração azulada. **A.** Ensaio imunológico realizado com *pool* de soros de equinos. **B.** soros de asininos. **C.** e soros de muares.

Os equinos apresentaram mais regiões imunogênicas em relação aos asininos e muares, mas as três espécies apresentaram epítomos reativos comuns, sendo possível sintetizar um peptídeo solúvel linear consenso para ser utilizado como uma ferramenta para o diagnóstico da AIE nas três espécies de equídeos. A Tabela 1 lista os peptídeos que foram reativos para as três espécies concomitantemente nos ensaios imunológicos realizados.

Tabela 1: Lista dos spots reativos testados com soros de equinos, muares e asininos, nos ensaios imunológicos, com a sequência de aminoácidos dos respectivos peptídeos e as intensidades das reatividades médias, em escala de 0 a 4.

Nº Spot	Sequência	Intensidade Equino	Intensidade Muar	Intensidade Asinino
174	LKERQQVEETFNLIG	3.4	3.4	2
175	RQQVEETFNLIGCIE	4	3.4	2
176	VEETFNLIGCIERTH	4	3.2	2

Os ensaios imunológicos em que foram utilizados *pools* de soros de equinos, asininos e muares negativos na IDGA para AIE, não apresentaram reatividade em nenhum spot. Este resultado mostra que não houve reação inespecífica nos ensaios imunológicos. Os spots que foram mais reativos para as três espécies simultaneamente (174, 175 e 176) foram escolhidos para ser realizada a síntese do peptídeo linear solúvel. O design da sequência KERQQVEETFNLIGCIERTH com 20 resíduos de aminoácidos,

foi feito a partir da combinação dos spots mais reativos. Através da análise no site do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), observamos que o epítipo selecionado pela técnica de *spot synthesis* está na região do gene *env* que codifica a glicoproteína transmembrana gp45 do envelope viral, disponível no link: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=110073>).

O peptídeo encontra-se em uma região do gene *env* em que não é comum acontecer variabilidade genética e a sequência de aminoácidos correspondente ao gene *env* do EIAV que foi utilizada para o mapeamento antigênico está representada pela Figura 4, sendo que as letras na cor vermelha são representadas pela região que codifica a gp90 e cor preta representa a região que codifica a gp45, o que está marcado na cor verde são as oito regiões de hipervariabilidade do envelope viral e na cor amarela o local da sequência onde o epítipo foi identificado e selecionado para síntese.

```

MVSIAFYGGIPGGISTP TQQSEKSKCEENTMFQPYCYNNDKINSM ESKEARDQEMNLK 60
EESKEEKRRNDWVKIGMFLLCIAGTTGGILWVYEGLPQQHYIGLVAIGGRLNGSGQSNAI 120
ECWGSFPGCRPFQNYFSYETNRSMHMDNNTA TLEAYHRETFIYKSSCTDS DHCQEYQC 180
KKNVNLSSDS INSVRVEDVTNTAEYWGFW LECNQTENFKTILVPENEMVNINDTDTWIF 240
KGCNETW ARVKRCPIDILYGIHPIRLCVQPPFFLVQEKGIADTS RIGNOGPTIFLGVLLE 300
N KGVVRGDYTACNVRRLNINPKDVTGLYQVP LFTCTFTITSCNNEPIISVIMYETNQV 360
QYLLCNMNSN IYNCVQSEFGVIGQAHLELPRPKRIRNQS FNQYNCSINNKTELETNK 420
VKTSGV TPLPISSEANTGLIRHKRDFGISAIVAAIVAATAIAASATMSYVALTEVNKIME 480
VQNHTFEVENSTLNGMDLIERQIKILYAMILQTHADVQLL KERQQVEETFNLIGCIERTH 540
VFCHTGHPWNMSWGHLINESTQWDDWVSKMEDLNQEILTTLHGARNNLAQSMITFNTPDSI 600
AQFGKDLWSHIGNWIPGLGASIIKYIVMFLLIYLLLTSSPKILRALWKVTSAGSSGSRYS 660
LKKKFHHKHASREDTWDQAQHNHLAGVTGGSGDKYYKQKYSRNDWNGESEYNNRRPKSW 720
VKSIEAFGESYISEKTKGEISQPGAAINEHKNSSGGNNPHQGS LDLEIRSEGGNIYDCCI 780
KAQEGTLAIPCCGFPLWLFWGLVIVGRIAGYGLRGLAVIIRICIRGLNLI FEIIRKMLD 840
YIGRALNPGTSHVSMPOYV 859

```

Figura 4: Sequência de aminoácidos da proteína correspondente ao envelope do EIAV (acesso GenBank AAB59863), aminoácidos na cor vermelha representam a região que codifica a gp90 e aminoácidos na cor preta representam a região que codifica a gp45, determinando as 8 regiões de hipervariabilidade na cor verde e identificação do epítipo selecionado em amarelo.

5.2 Análises de bioinformática e predição da proteína 3D

A predição da proteína tridimensional correspondente ao gene *env* do EIAV realizada através da plataforma I-TASSER, utilizou como molde as seguintes sequências depositadas no banco de dados de proteínas PDB – *Protein Data Bank* : 2b4cG, 1z8IA, 3j5mA, 2cmrA, 4n4jA, 1g9mG. Através do programa PyMOL, foi realizada a análise do epítipo selecionado pela técnica de *spot synthesis*, sendo que este se apresentou na superfície da proteína (parte externa) marcado em amarelo (figura 5), indicando que, apesar do gp45 ser uma proteína transmembrana, o peptídeo alvo está localizado em uma região externa, o que facilitaria o reconhecimento de um anticorpo específico anti-gp45.

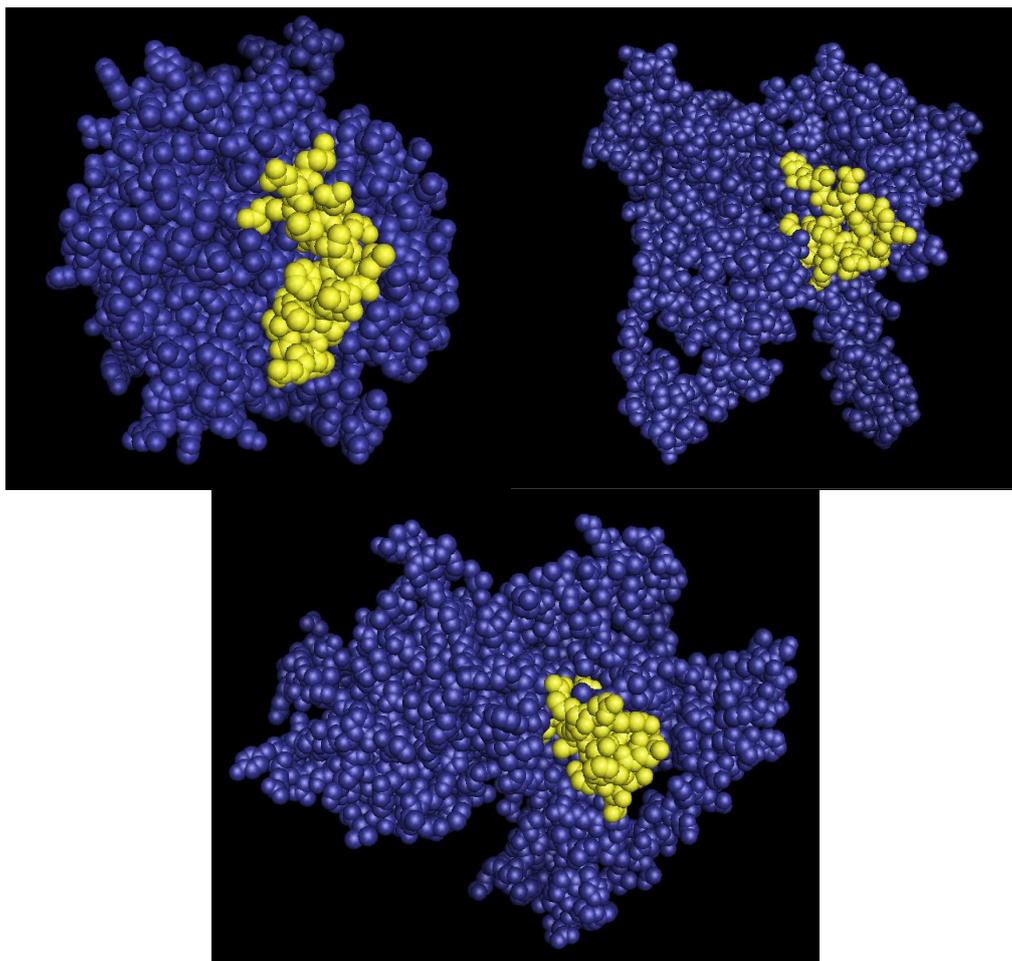


Figura 5: Predição em três possíveis modelos da estrutura tridimensional da proteína correspondente ao gene *env* do EIAV. As esferas em amarelo representam o epítipo selecionado pela técnica de *spot synthesis*.

Foram calculados as massas moleculares, índice de hidropaticidade média e ponto isoeletrico (pI) dos spots mais reativos e do epítipo selecionado (tabela 2), utilizando as ferramentas disponibilizadas no portal ExPASy (<http://expasy.org/proteomics>).

Tabela 2: Análise das sequências reativas pela técnica de *spot synthesis* e do peptídeo sintetizado em fase solúvel, suas respectivas sequências de aminoácidos, massas moleculares, pI e índice GRAVY.

<i>SPOT</i>	Sequência	Nº de AAs*	Massa (Da) **	pI***	GRAVY****
174	LKERQQVEETFNLIG	15	1804,0	4,79	-0,760
175	RQQVEETFNLIGCIE	15	1779,0	4,25	-0,080
176	VEETFNLIGCIERTH	15	1760,9	4,75	-0,853
Peptídeo	KERQQVEETFNLIGCIERTH	20	2430,72	5,57	-1,005

* Aas: Aminoácidos; ** (Da): Daltons; *** pI: ponto isoeletrico; **** GRAVY (Grand average of hydropathicity): índice de hidropaticidade média.

Pela análise do índice de hidropaticidade média (GRAVY), observou-se que os epítipos 174, 175, 176 e o peptídeo sintético linear são classificados como hidrofílicos, pois o seu índice GRAVY

calculado foi negativo. O índice GRAVY tem a capacidade de informar a localização da sequência de aminoácidos em relação à proteína de onde é originada. Desta forma, peptídeos classificados como hidrofóbicos estão, em teoria, concentrados no interior ou em regiões pouco expostas da proteína de origem, enquanto os peptídeos classificados como hidrofílicos estão em regiões mais expostas da mesma, o que foi confirmado pela análise da localização do epítipo na predição da proteína tridimensional.

A sequência do peptídeo selecionado (KERQQVEETFNLIGCIERTH) foi analisada quanto a similaridade com sequências do gene *env* de isolados do EIAV depositadas no *GenBank* com uso do programa BLAST. As sequências foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW2 pelo programa Bioedit. Os aminoácidos semelhantes com a sequência do peptídeo estão indicados com um ponto, e os aminoácidos que sofreram alguma alteração estão indicados com a respectiva letra de sua nomenclatura, e as que estão marcadas em verde foram as que sofreram mudança na sua classificação (apolar, aromático, polar neutro, polar básico e polar ácido) de acordo com suas cadeias laterais (Tabela3).

Tabela 3: Análise da similaridade do epítipo selecionado comparado com amostras de genoma completo de isolados do EIAV, através de alinhamento realizado pelo programa bioedit.

NºAAS	Sequência alinhada	Acesso genbank	Amostra	Referência
20	KERQQVEETFNLIGCIERTH	-	-	-
859	AAC82601	Wyoming	Pretopoulos,1997
842	.. Q I	AAK21107	Lyoming	Tu et al., 2007
867	..K.....K..	AFW99167	Ireland	Quinlivan et al., 2013
866	.. Q IM...A...S..	AFV61762	Miyazaki2011-A	Dong, et al., 2013

5.3 Padronização de ELISA indireto pgp45

O ELISA pgp45 foi padronizado com o peptídeo nas seguintes condições: 0,5 µg por poço, soro na diluição de 1:100 e conjugado na diluição de 1:5000. Nestas condições obteve-se uma maior discriminação entre pool de soros positivos e negativos pela IDGA, utilizado como referência nesta padronização. A análise do ponto de corte realizado através do cálculo da Curva Roc (programa MedCalc versão 13.0.0.0, Mariakerke, Bélgica), utilizando as amostras de campo, indicou um ponto de corte em 0,251 de densidade óptica.

5.4 Teste em ELISA pgp45

Das 107 amostras de equídeos cedidas pelo (LANAGRO – MG), todas as 63 amostras positivas foram confirmadas pelo ELISA pgp45 e das 44 negativas, 5 amostras foram diagnosticadas como positivas no ELISA pgp45, apresentando uma sensibilidade de 100%, especificidade de 86,4% e concordância de 96,2% tendo como referência o teste de IDGA (gráfico 1).

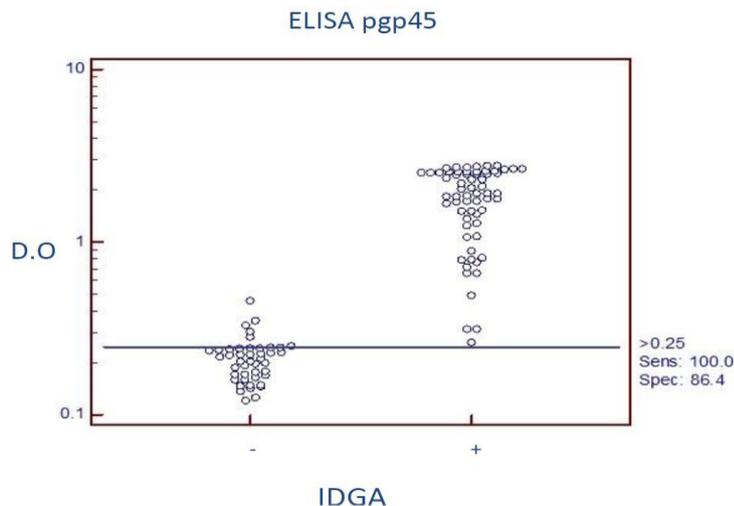


Gráfico 1: Resultado das 107 amostras de soros de equídeos cedidas pelo LANAGRO-MG no ELISA pgp45 comparado aos resultados na IDGA.

O soro sanguíneo coletado de um animal experimentalmente inoculado com amostra *Wyoming* do EIAV foi avaliado pelos testes ELISA pgp45, ELISA rgp90 e IDGA. O animal foi inoculado no dia 0 e foram feitas sete coletas de sangue de três em três dias, para avaliar o momento que o animal apresentava soroconversão nos 3 testes (gráfico 2).

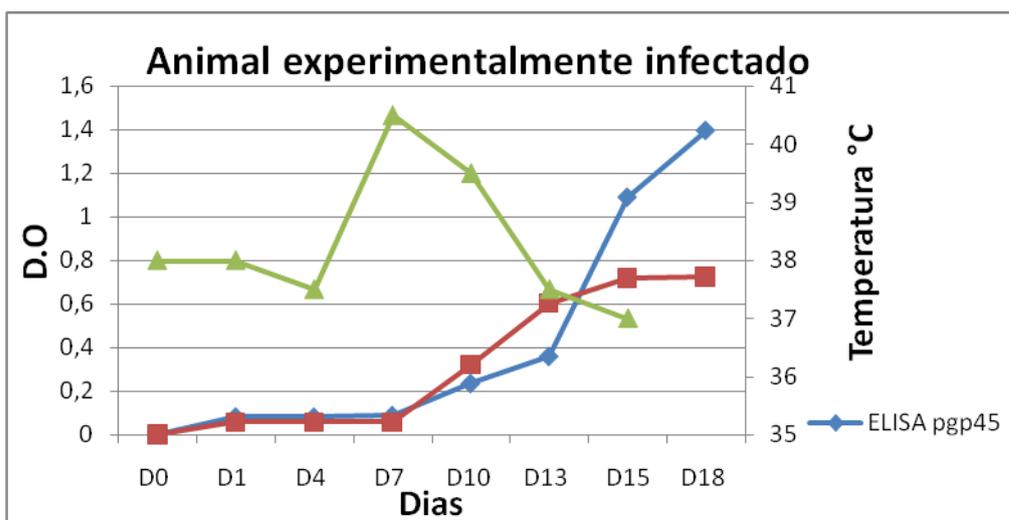


Gráfico 2: Temperatura corporal do animal e análise da reatividade dos soros no ELISA pgp45 e no ELISA rgp90 do animal experimentalmente inoculado com amostra *Wyoming* do EIAV.

Ao testar soros no ELISA pgp45 e ELISA rgp90, observou-se que a partir do 7º dia pós infecção, foram detectados título de anticorpos em ambos testes, porém os mesmos foram considerados positivos apenas nos dias 13 e 10 respectivamente, mostrando que são eficazes para detectar animais em fase inicial de infecção, o que não ocorreu no teste de IDGA onde todas as amostras de soro sanguíneo do animal experimentalmente infectado foram negativas durante todo o experimento. O animal apresentou pico febril do dia 10 ao dia 14 PI o que corresponde ao pico de viremia.

Para o teste com as amostras de campo, foram utilizadas 474 amostras de soros sanguíneos de equinos, 206 de muare e 179 de asininos, em um total de 859 amostras de equídeos. Os animais foram considerados positivos quando apresentaram um valor de densidade óptica acima de 0,251. Foram avaliados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo

negativo, a concordância entre os testes de ELISA pgp45 e IDGA e o índice kappa, que estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Avaliação de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância entre ELISA pgp45 e IDGA e o índice kappa em amostras de campo de equinos, asininos, muares e o total de equídeos.

IDGA									
ELISA pgp45 Equinos	Positivo	Negativo	Total	Sens.%	Esp%	VPP%	VPN%	Conc.	Kappa
Positivo	65	10	75	98	97,5	86,6	99,7	97,68	0.90
Negativo	1	398	399						
Total	66	408	474						

IDGA									
ELISA pgp45 Asininos	Positivo	Negativo	Total	Sens.%	Esp%	VPP%	VPN%	Conc.%	Kappa
Positivo	41	7	48	97	95	85,4	100	95	0.88
Negativo	1	130	131						
Total	42	137	179						

IDGA									
ELISA pgp45 Muares	Positivo	Negativo	Total	Sens.%	Esp%	VPP%	VPN%	Conc.%	Kappa
Positivo	35	14	49	100	91	71	100	93,2	0.79
Negativo	0	157	157						
Total	35	171	206						

IDGA									
ELISA pgp45 Equídeos	Positivo	Negativo	Total	Sens.%	Esp%	VPP%	VPN%	Conc.%	Kappa
Positivo	141	31	172	98,6	95,6	81,9	99,7	96,1	0.85
Negativo	2	685	687						
Total	143	716	859						

Sens.- sensibilidade; Esp. – especificidade; VPP – valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; Conc.- Concordância

Das 859 amostras de soro testadas, apenas 33 apresentaram resultados discordantes (8 asininos, 11 equinos e 14 muares) em comparação a IDGA, sendo que 31 animais foram positivos pelo ELISA pgp45 e negativas na IDGA e 2 animais que eram positivos pela IDGA foram considerados negativos pelo ELISA pgp45 (gráfico 3).

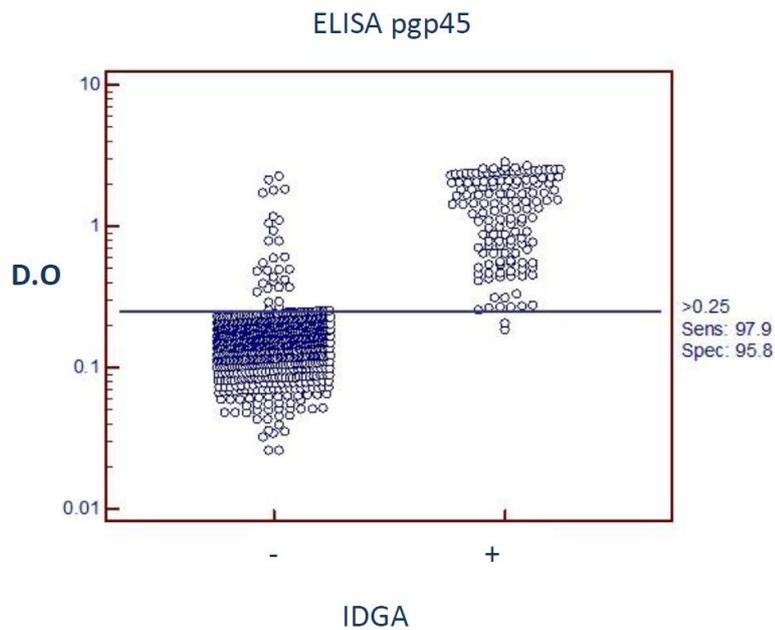


Gráfico 3: Resultado das 859 amostras de equídeos (soros de campo) no ELISA pgp45 comparado ao teste de IDGA.

Para averiguar se o peptídeo selecionado utilizado como antígeno no ELISA pgp45 apresentava alguma reatividade cruzada com alguns anticorpos produzidos contra alguns lentívirus como o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV), foram testados 5 soros positivos para essas respectivas doenças e 5 soros positivos e negativos para AIE usados como controles (gráfico 4).

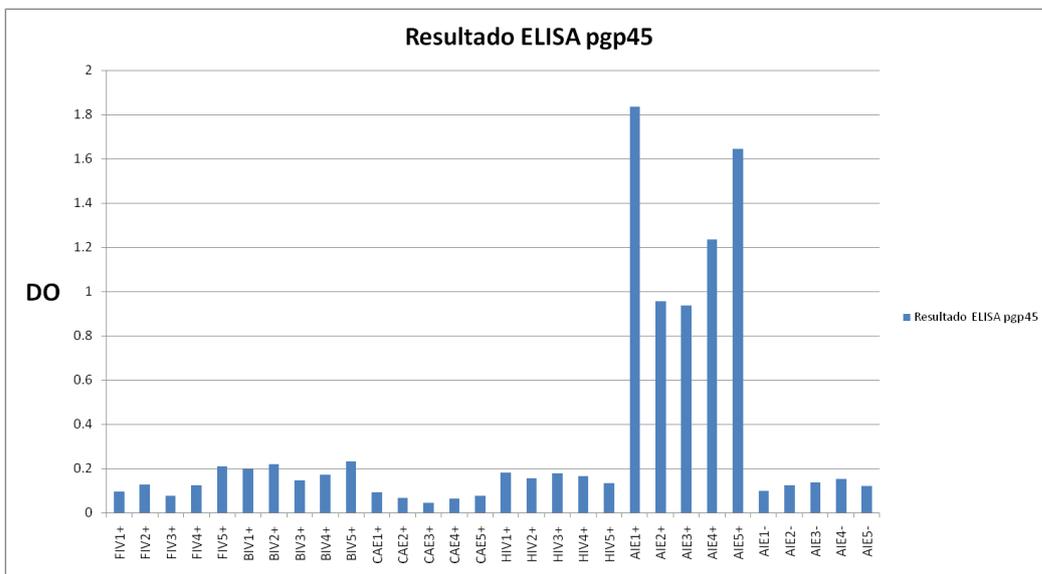


Gráfico 4: Teste de reatividade cruzada utilizando peptídeo sintético gp45 como antígeno testando amostras de soro sanguíneo positivos para imunodeficiência bovina, artrite encefalite caprina, imunodeficiência felina e imunodeficiência humana.

Podemos observar que os soros positivos para os respectivos lentívirus testados não foram reativos com o peptídeo gp45, observando um resultado de densidade óptica muito baixo, sendo todos considerados negativos. Apenas os 5 animais considerados positivos para AIE foram reativos, e os cinco animais negativos para AIE considerados não reativos no ELISA pgp45.

5.5 Análise de amostras discordantes entre ELISA pgp45 e IDGA

As 33 (3,8%) amostras de campo de soro de equídeos que apresentaram resultados discordantes entre o ELISA pgp45 e IDGA foram submetidas à avaliação com C-ELISA p26 (IDEXX), ELISA rgp90 (Reis et. al. 2012) e *imunoblot* (Cook et al.; 2005), sendo que os resultados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Resultados discordantes entre ELISA pgp45 e IDGA testadas em ELISA gp90, C-ELISA p26 e Imunoblot.

Animal	Espécie	ELISA pgp45	IDGA	ELISA p26	ELISA rgp90	p26	<i>Imunoblot</i> gp45	gp90
1	A	+	-	-	-	-	-	-
2	A	+	-	-	-	+	-	-
3	A	+	-	+	-	+	+	+
4	A	+	-	+	+	+	+	+
5	A	+	-	-	+	+	+	+
6	A	+	-	-	+	+	+	+
7	A	+	-	-	+	-	-	+
8	A	-	+	-	+	-	-	-
9	E	+	-	-	+	+	+	+
10	E	+	-	+	+	+	+	+
11	E	+	-	-	+	+	+	+
12	E	+	-	-	+	+	+	+
13	E	+	-	-	+	+	+	+
14	E	+	-	-	+	-	-	-
15	E	+	-	-	+	+	+	+
16	E	+	-	-	+	+	+	+
17	E	+	-	-	+	+	+	+
18	E	-	+	-	+	+	+	+
19	E	+	-	-	+	+	+	+
20	M	+	-	-	+	+	+	+
21	M	+	-	-	+	+	+	+
22	M	+	-	-	+	+	-	-
23	M	+	-	-	+	+	+	+
24	M	+	-	-	+	+	-	-
25	M	+	-	-	+	+	-	+
26	M	+	-	-	+	+	+	+
27	M	+	-	-	-	-	-	-
28	M	+	-	-	-	+	+	+
29	M	+	-	+	+	+	+	+
30	M	+	-	-	-	+	+	+
31	M	+	-	-	+	-	-	-
32	M	+	-	-	+	+	+	+
33	M	+	-	-	+	+	+	+

Das duas amostras que foram negativas no ELISA pgp45 e positivas em IDGA, quando avaliadas pelos outros testes, o animal 8 foi positivo apenas no ELISA rgp90 e negativo em todos os outros testes e o animal 18 foi negativo no ELISA p26 e positivo no ELISA rgp90 e *imunoblot*. Das 31 amostras que foram positivas no ELISA pgp45 e negativas na IDGA, 23 foram positivas para as três proteínas do *imunoblot* e duas foram positivas apenas para duas proteínas (gp45 e gp90), totalizando 25 amostras positivas neste teste que é considerado um teste confirmatório. Uma foi reativa apenas com gp90 e uma reativa apenas para p26 e 6 foram negativas para as três proteínas, totalizando 8 amostras consideradas negativas.

Como o *imunoblot* é considerado o teste confirmatório no fluxograma de testes de laboratório para AIE e o considerando o padrão ouro nesta análise dos resultados discordantes, quando avaliamos a concordância dos resultados positivos, observamos que o ELISA pgp45 concordou em 92% das amostras (23/25), o ELISA rgp90 concordou em 80% (20/25), o C-ELISA p26 concordou em 16% (4/25) e a IDGA concordou em apenas 4% (1/25). O único teste que era autorizado e recomendado para o diagnóstico da

AIE no Brasil até o final do ano de 2014, a IDGA, não reconheceria como positivos 96% (24/25) das amostras discordantes. Dos 31 animais que foram positivos no ELISA gp45 e negativos na IDGA, 25 foram confirmados no *immunoblot*, o que corresponde a 80,6 % dos animais discordantes e 2,9% do total de equídeos testados.

6 Discussão

A busca de antígenos com alta capacidade reativa contra soros de equídeos infectados pelo EIAV possibilita a elaboração de imunoenaios de melhor acurácia. Com o propósito de obter um antígeno capaz de detectar equídeos (equinos, asininos e muares) infectados pelo EIAV, foi realizado um mapeamento e identificação de um epítipo da região do gene *env* que codifica as proteínas do envelope viral gp45 e gp90. A região *env* do EIAV foi escolhida pelo fato de já ter sido demonstrado que os níveis de anticorpos específicos contra gp45 e gp90 são cerca de 10 a 100 vezes mais abundantes do que os anticorpos específicos contra a p26 do capsídeo viral (Montelaro et al., 1984; Rwambo et al., 1990).

Dentro do gene *env* há regiões conservadas e hipervariáveis (Montelaro, Ball, Rushlow, 1993; Quinlivan et al., 2013; Cook, Leuroux, Issel, 2013) e ao realizar o alinhamento das sequências dos aminoácidos dos isolados do EIAV das amostras Wyoming, Lyoming, Ireland e Miyazaki2011-A em comparação com a sequência do peptídeo sintetizado neste trabalho, observou-se que o peptídeo está em uma região conservada do gene *env* do EIAV, mais especificamente dentro da região que codifica a gp45, que não apresenta regiões de hipervariabilidade (Chong et al., 1991). Epítipos conservados foram identificados na proteína gp45 (Belshan et al., 2001), no qual tem um domínio imunodominante principal que constitui um epítipo altamente conservado nos retrovírus (Chong et al., 1991). Ao analisar a sequência de aminoácidos do peptídeo em comparação com as sequências Wyoming, Lyoming, Ireland e Miyazaki2011-A observaram-se apenas duas mudanças de classificação dos aminoácidos, sendo elas nas sequências Lyoming e Miyazaki2011-A, a primeira na posição três na sequência do peptídeo, no qual houve a troca da arginina (R), que é um aminoácido polar carregado positivamente, por uma glutamina (Q), que é classificado como polar neutro e a outra na posição cinco na sequência do peptídeo, sendo que a glutamina (polar neutro) foi substituída pela lisina (polar carregado positivamente). Através da predição da proteína, pode-se observar nos três modelos de estruturas 3D construídos, que o epítipo está em uma região exposta, localizado em uma região hidrofílica, o deixando com caráter imunogênico, facilitando o acesso e conseqüentemente o reconhecimento por anticorpos anti-EIAV.

Uma das dificuldades de se trabalhar com peptídeos sintéticos, especialmente em testes com antígenos imunoabsorvidos, como o ELISA, é a de aderência de peptídeos sintéticos nas placas de poliestireno, e essa dificuldade pode ser atribuída ao tamanho do peptídeo e cargas eletrostáticas dos aminoácidos que o compõem (Geerlings et al., 1988, Ball et al., 1994). Para se obter uma melhor adsorção do peptídeo à placa, foi retirada uma leucina (L) da extremidade inicial do epítipo, para que na extremidade contenha lisina (K), pois a lisina quando está na extremidade de um peptídeo, é capaz de realizar ligações de hidrogênio ficando carregado positivamente, tornando-o hidrofílico e favorecendo a ligação com regiões carregadas negativamente nos anticorpos (Machado De Ávila et al., 2011). O peptídeo desenvolvido neste trabalho foi eficiente em sua adsorção na placa, já que foi capaz de distinguir os soros positivos dos negativos para AIE no ELISA desenvolvido.

Alguns peptídeos sintéticos da região gp45 já foram desenvolvidos e testados em alguns trabalhos utilizando soro de equinos positivos e negativos para AIE. Chong et al., (1991) utilizando um peptídeo sintético linear (IERTHVF) não obtiveram bons resultados, detectando apenas 45% de animais que são comprovadamente positivos para AIE. Soutullo et al., (2001) desenvolveram um peptídeo sintético cíclico, selecionado por bioinformática, com uma sequência de aminoácidos da região gp45 (ERQQVEETFNLIGCIERTHV) o qual mostrou excelente reatividade, detectando 92% dos animais comprovadamente positivos, sugerindo que a sua atividade funcional depende significativamente da sua conformação, uma vez que foi muito baixa reatividade observada sob a forma linear. Já no presente trabalho, com um peptídeo de menor tamanho muito semelhante ao usado por Soutullo et al. (2001), não foi preciso utilizar o peptídeo sintético na forma cíclica, sendo que o peptídeo na conformação linear conseguiu detectar 98,6% dos animais comprovadamente positivos para AIE.

O uso do peptídeo sintético como antígeno apresenta algumas vantagens em relação a alguns métodos de produção de antígenos convencionais e por expressão em sistemas heterólogos.

Primeiramente, não é necessário o cultivo do vírus para a produção do antígeno, que é um processo trabalhoso e demorado, podendo ocorrer a contaminação com algumas proteínas das células ou do meio de cultura onde o vírus foi cultivado (Sugiura et al., 1995). Na expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos, em alguns casos, pode ocorrer que algumas estirpes do vírus apresentam dificuldades de produzir proteínas funcionais, biologicamente ativas e solúveis. A produção de proteínas complexas, com pontes de enxofre, múltiplas subunidades ou modificações pós-traducionais é dificultada em alguns microorganismos, principalmente em *Escherichia coli*, pela falta da maquinaria necessária para fazer estes tipos de modificações (Baneyx, 1999, Costa et al.; 2014).

Os testes de IDGA e ELISAs disponíveis utilizam em sua maioria a proteína p26 como antígeno para detecção de anticorpos anti-p26 do EIAV (Issel e Cook, 1993; Alvarez et al., 2007; Soutullo et al., 2007; Coutinho et al., 2013). O uso apenas dessa proteína como antígeno diminui o nível de sensibilidade do diagnóstico (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). Existe uma difícil interpretação no diagnóstico da AIE principalmente em asininos e muares quando utilizado apenas o teste de IDGA. Algumas vezes os animais que são comprovadamente positivos através de inoculação do vírus não são detectados no teste ou apresentam linhas de precipitação muito fracas, possivelmente pelo fato da viremia estar baixa, produzindo assim uma quantidade pequena de anticorpos específicos para serem detectados (Cook et al., 2001; Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). Já foi observado que asininos infectados experimentalmente com duas estirpes diferentes de EIAV tiveram uma quantidade de vírus associados no plasma e níveis de ácidos nucleicos significativamente menores em relação a um pônei que foi inoculado com as mesmas estirpes (Cook et al., 2001). Os muares podem apresentar resultados contraditórios em testes de diagnóstico, sendo que em um estudo realizado na Itália, foram positivos em ELISA e *imunoblot* e negativos na IDGA, e quando avaliado a existência de correlação entre carga viral e a resposta sorológica, em 5 mulas positivas em testes sorológicos que foram imunossuprimidas com dexametasona, houve resultados contraditórios entre IDGA, ELISA e *imunoblot*, sendo que apenas três foram positivas em IDGA e as 5 mulas foram positivas em ELISA e *imunoblot*, mas todas as mulas foram positivas em *nested PCR* e apresentaram sequências de DNA proviral semelhantes (Scicluna et al., 2013). Diante da dificuldade do diagnóstico preciso em asininos e muares foi proposto o mapeamento de um epítipo consenso para as espécies de equinos asininos e muares, que fosse capaz de identificar os animais que são verdadeiramente positivos em um teste de diagnóstico para AIE, o qual foi possível com o desenvolvimento de ELISA pgp45, que foi mais eficaz que o teste de IDGA.

Issel et al., (1988) e Chong et al., (1991) propuseram a produção de testes mais sensíveis de diagnóstico utilizando como antígeno proteínas do envelope do EIAV, que poderiam detectar o verdadeiro “*status*” sorológico dos animais, diminuindo os resultados inespecíficos ou de difícil interpretação da IDGA. Um teste de ELISA indireto utilizando um antígeno recombinante da proteína gp90 do EIAV foi utilizado para o diagnóstico da AIE em soros de animais de campo (Reis et al., 2012), sendo que o teste apresentou sensibilidade de 96,4% e especificidade de 96,1%, sendo eficaz para o diagnóstico da AIE. Diante do fato de que amostras de asininos e muares podem ter uma difícil interpretação em IDGA, resultando em alguns casos em animais falsos negativos, o ELISA pgp45 mostrou-se muito eficiente, obtendo alta sensibilidade (98,6%) e especificidade (95,6%) para equinos, asininos e muares. De fato, o ELISA pgp45 mostrou grande capacidade na detecção de animais infectados pelo EIAV, incluindo asininos e muares sendo uma alternativa para sanar a dificuldade do diagnóstico da AIE nestas espécies.

Os resultados do presente estudo mostraram que das 859 amostras testadas, 33 apresentaram resultados discordantes entre o ELISA pgp45 e IDGA no qual 31 animais foram positivos ELISA pgp45 e negativos na IDGA, representando 3,6 % das amostras testadas. Um trabalho desenvolvido na Itália, demonstrou uma alta sensibilidade e especificidade do ELISA, sendo 0,19% das amostras falso positivas e 0,026 % foram julgados como falso negativos em relação ao IDGA (Issel et al., 2012). No presente estudo, apenas dois animais foram negativos no ELISA pgp45 e positivos em IDGA, sendo que o ELISA pgp45 teve alta concordância (96,1%) comparado ao teste de IDGA.

Quando avaliamos o ELISA pgp45 com soro de um animal experimentalmente infectado, observou-se que a partir do 7º dia pós infecção, foi detectado título de anticorpos específicos anti-EIAV, mas o mesmo só foi considerado positivo a partir do 13º dia, mostrando que o mesmo se mostrou eficaz em detectar animais em fase inicial da infecção, concordando com os resultados descritos por alguns autores, que detectaram títulos de anticorpos entre os dias 14 e 28 pós infecção em testes de ELISA e *Imunoblot*, o que não ocorreu quando somente a IDGA foi utilizada (Ball et al., 1992; Hammond et al., 1997; O'Rourke et al., 1988; Rwambo et al., 1990). No trabalho de Issel et al., (2012), equinos que foram

inoculados pela via intravenosa com estirpes mutantes do EIAV, em 25% dos casos não foram detectados como positivos no teste de IDGA por até 180 dias pós inoculação, mas foram diagnosticados como positivos em ELISA e Imunoblot a partir dos 35 dias PI.

Realizando o teste de especificidade com soros de animais positivos pra outros lentívirus (BIV, CAEV, FIV e HIV), nenhuma amostra reagiu no ELISA pgp45, sendo que não houve nenhuma reação cruzada com outros lentívirus, mostrando que a região onde está o peptídeo, reconhece apenas soro de equídeos positivos para AIE, apesar de existirem relatos de antígenos derivados da região que codifica a proteína p26 do capsídeo viral apresentarem reatividade com amostras positivas para HIV possivelmente com anticorpos anti-p24 do HIV, já que a p24 é análoga a p26, proteína do capsídeo deste vírus (Montagnier et al., 1984; Goudsmit et al., 1986; Henderson et al., 1987).

No Brasil, o único teste considerado oficial para o diagnóstico da AIE até o final de 2014 é a IDGA, o qual pode apresentar algumas falhas no diagnóstico como resultados falsos negativos ou com difícil interpretação, (Toma, 1980; Issel e Adams, 1982; Langemeier et al., 1996). A partir de 2014 o ELISA também passou a ser permitido como diagnóstico complementar ao IDGA. Para conseguir detectar a maior quantidade de animais que realmente estejam infectados, é necessário fazer uma associação de testes sorológicos (Issel; Rwanbo; Montelaro, 1988; Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). A utilização do fluxograma de investigação laboratorial, que foi implantado com bastante sucesso na Itália, preconiza o ELISA como um teste de triagem, já que é um teste mais sensível, sendo os animais positivos confirmados na IDGA, pois este teste possui uma melhor especificidade. Os animais que ainda forem discordantes entre esses dois testes, são reavaliados pelo *imunoblot*, considerado o teste confirmatório (Issel, et al., 2012, Scicluna et al., 2013).

Neste trabalho, utilizando o fluxograma de investigação laboratorial para o diagnóstico da AIE, observamos que dos 31 animais que foram positivos no ELISA pgp45 e negativos na IDGA, 25 foram confirmados no *imunoblot* ou por um segundo teste de ELISA realizado, o que corresponde a 80,6 % dos animais discordantes. Tendo o *imunoblot* como referência, o ELISA pgp45 concordou em 92% das amostras (23/25), o ELISA rgp90 em 80% (20/25), o C-ELISA p26 em 16% (4/25) e a IDGA em apenas 4% (1/25). O ELISA pgp45 foi o teste que obteve melhor concordância com o *imunoblot*, mostrando ser bastante eficiente. Apenas dois animais foram negativos no ELISA pgp45 e positivos em IDGA, podendo isto ocorrer devido a problemas técnicos na manipulação do teste ou alterações biológicas na amostra em que foi determinada a reatividade, sendo que nem todas as reações falso-positivas têm causa definida ou podem ser evitadas.

O único teste autorizado e recomendado para o diagnóstico da AIE no Brasil, a IDGA, não diagnosticou como positivos 96% (24/25) dos animais discordantes, sendo que esses animais ficariam livres no campo como potenciais transmissores da doença. No trabalho realizado por Issel et al. 2012, utilizando o fluxograma de investigação laboratorial, houve um aumento na identificação dos casos positivos de AIE em 17% dos testes que foram discordantes. O controle efetivo da AIE pode ser realizado utilizando testes sorológicos, pois as técnicas moleculares apresentam algumas limitações, como a variabilidade genética do vírus e em alguns casos a baixa quantidade de vírus presente no plasma ou provirus nas células mononucleares de sangue periférico, especialmente em animais infectados e inaparentes, o que dificulta o diagnóstico efetivo da doença (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013).

O uso do peptídeo pgp45 como antígeno em ELISA indireto pode ser uma excelente alternativa como teste de triagem, auxiliando no diagnóstico e controle da AIE, pois obteve alta sensibilidade, além de ser um método de produção eficiente e viável. O teste se mostrou eficiente na detecção de anticorpos anti-EIAV em asininos e muare, já que supostamente estes animais possuem viremia baixa e não são capazes de produzir níveis de anticorpos sorológicos detectáveis no teste oficial que é a IDGA.

7 Conclusão

Através da técnica de *spot synthesis*, foi possível mapear um epítipo específico de uma região conservada da proteína correspondente ao gene *env* (gp45) do EIAV comum para as espécies de equinos, asininos e muare, sendo desenvolvido um peptídeo sintético solúvel para ser utilizado como antígeno no teste de ELISA pgp45 indireto.

O peptídeo pgp45 utilizado como antígeno em teste de ELISA indireto apresentou alta sensibilidade e especificidade sendo uma alternativa para o uso no diagnóstico da AIE, podendo

contribuir para o controle da doença e seria recomendado como um teste de triagem, pois se mostrou mais sensível que a IDGA.

8 Referências

ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. ; HADDAD, J. P. A.; DIAS, R. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 141-148, 2006.

ALVARENGA, L. M.; DINIZ, C. R.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Induction of neutralizing serrulatus scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes Toxicon. v. 40, p. 89-95, 2002.

ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; VISSANI, A.; RODRIGUEZ, S.; BARRANDEGUY, M.; TRONO, K. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. Veterinary Microbiology, v. 121, p. 344-351, 2007.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A. A. S. Bioestat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 6.ed. Belém, 2007.

BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Detailed mapping of the antigenicity of the surface unit glycoprotein of equine infectious anemia virus by using synthetic peptide strategies. Journal of Virology, v.66, n. 2, p. 732-742, 1992.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli", Current Opinion in Biotechnology, v. 10, p. 411-421, 1999.

BATISTA JÚNIOR, J. A.; FONSCCECA, V. O. Anemia infecciosa equina. Arquivos da Escola de Veterinária. v. 23, p.281-290, 1971.

BELSHAN, M.; BACCAM, P.; OAKS, J. L.; SPONSELLER, B. A.; MURPHY, S. C.; CORNETTE, J.; CARPENTER, S.; Genetic and biological variation in equine infectious anemia virus Rev correlates with variable stages of clinical disease in an experimentally infected pony. Virology, n. 279, p. 185-200, 2001.

BOLFA, P.F.; NOLF, M.; CADORE, J.L.; CATOI, C.; ARCHER, F.; DOLMAZON, C.; MORNEX, J.F.; LEROUX, C. Interstitial lung disease associated with EIAV infection in horses. Veterinary Research, in press, 2013.

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

BRANGAN, P., BAILEY, D. C., LARKIN, J. F., MYERS, T.; MORE, S.J. Management of the national programme to eradicate equine infectious anaemia from Ireland during 2006: A review. Equine Veterinary Journal. v. 40, p. 702-704, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 45, de 15 de junho de 2004. Normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 114, 16 jun. 2004. Seção 1, p. 7.

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

CAPOMACCIO, S., WILLAND, Z.A., COOK, S.J., ISSEL, C.J., SANTOS, E.M., REIS, J.K., COOK, R.F. Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious

anemia (EIAV) *gag* genes isolated from Shackleford Banks wild horses. *Veterinary Microbiology*, v.157, p. 320–332, 2012.

CAPPELLI, K., CAPOMACCIO, S., COOK, F.R., FELICETTI, M., MARENZONI, M.L., COPPOLA, G., VERINI SUPPLIZI, A., COLETTI, M., PASSAMONTI, F. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.49, p. 27–33, 2011.

CHONG, Y. H.; BALL, J. M.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C.; RUSHLOW, K. E. Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp 45) of equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v. 65, n. 2, p. 1013-1018, 1991.

CLABOUGH, D.L. Equine infectious anemia: the clinical signs, transmission, and diagnostic procedures. *Veterinary Medicine*, v.85, n.9, p.1007-1019, 1990.

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

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Veterinarian*, 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.; LEROUX, C.; COOK, S. J.; BERGER, S. L.; LICHTENSETEIN, D. L., GHABRIAL, N. N.; MONTELARO, R. C., ISSEL, C. J. Development and characterization of an *in vivo* pathogenic molecular clone of equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v. 72, p. 1383–1393, 1998.

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

COOK, R. F., COOK, S. J., BOLIN, P. S., Laryssa J. Howe, L. J., Zhou, W., Montelaro, R. C., Issel, C. J. Genetic immunization with codon-optimized equine infectious anemia virus (EIAV) surface unit (SU) envelope sequences stimulate immune responses in ponies. *Veterinary Microbiology*, v.108, p.23-37, 2005.

COOK, R.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Veterinary Microbiology*, v. 167, n. 1–2, p. 181–204, 2013.

COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, v.5, p. 1-20, 2014.

COUTINHO, L. C. A.; JESUS, A. L. S.; FONTES, K. F. L. P.; COIMBRA, E. C.; MARIZ, F. C.; FREITAS, A. C.; MAIA, R. C. C.; CASTRO, R. S. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*, v.191, n. 2, p. 95–100, 2013.

CULLINANE, A, QUINLIVAN, M.; NELLY, M.; PATTERSON, H.; KENNA, R.; GARVEY, M.; GILDEA, S.; LAYONS, P.; FLYNN, M.; GALVIN, P.; NEYLON M.; JANKOWSKA, K. Diagnosis of equine infectious anemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Veterinary Records*, v.161, p. 647-652, 2007.

DONG, J.B., ZHU, W., COOK, F.R., GOTO, Y., HORII, Y., HAGA, T. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Archives of Virology*, v.157, p. 2105–2111, 2012b.

- DONG, J. B.; ZHU, W.; COOK, F. R.; GOTO, Y.; HORII, Y.; HAGA T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. *Journal of General Virology*, v.94, n. 2, p. 360-365, 2013.
- DUPONT, O. DACORSO FILHO, P.; MUCHALUAT, M.A. Diagnóstico da anemia infecciosa equine no Rio de Janeiro In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 11. Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, 1968, Niterói. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 160-161, 1968.
- DURAUER, A.; KOPECKY, E.; BERGER, E.; SEIFERT, M.; HAHN, R.; JUNGBAUER, A. Evaluation of a sensitive detection method for peptide arrays prepared by *spot synthesis*. *Journal of biochemical and biophysical methods*, v. 66, p. 45-57, 2006.
- 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.
- FRANK, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*. v. 48, p. 9217, 1992.
- GAUSEPOHL, H.; BOULIN, C.; KRAFT, M. et al. Automated multiple peptide synthesis. *Peptide Research*, v. 5, p. 315-320, 1992.
- GEERLINGS, H. J.; WEIJER, W. J.; BLOEMHOFF, W.; WELLING, G. W.; WELLING-WESTER, S. The influence of pH and ionic strength on the coating of peptide of herpes simplex virus type 1 in a enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 106, n. 2, p. 239 - 244, 1988.
- GOUDSMIT, J.; HOUWERS, D. J.; SMIT, L.; NAUTA, I. M. LAV/HTLV-III gag gene product p24 shares antigenic determinants with equine infectious anemia virus but not with visna virus or caprine arthritis encephalitis virus. *Intervirology*, v. 26, p.169-173, 1986.
- GREGG, K.; POLEJAEVA, I. Risk of equine infectious anemia virus disease transmission through in vitro embryo production using somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, v.72, p. 289–299, 2009.
- GUERREIRO, M. G.; BAUER, A. G.; GLOSS, R. M.; VIDOR, T.; FARIAS, M. T.; TREIN, E.; MANCUSO, P. C. Simpósio sobre anemia infecciosa equina . Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor", Porto Alegre, n.1/2, p.3-4, 1968.
- HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; LICHTENSTEIN, D. L.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *Journal of Virology*. v.71, p. 3840–3852, 1997.
- HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; FALO, L. D. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. A particulate viral protein vaccine reduces viral load and delays progression to disease in immunized ponies challenged with equine infectious anemia virus, *Virology*,v. 254, p. 37–49, 1999.
- HAWKINS J.A., ADAMS W.V., WILSON B.H., ISSEL C.J., ROTH E. E. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 168, p. 63-64, 1976.
- HENDERSON, L. E.; SOWDER, R. C.; SMYTHERS, G. W.; OROSZLAN, S. Chemical and immunological characterization of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. *Journal of Virology*, v. 61, p.1116-1124, 1987.
- HOPP, T. P.; WOODS, K. R. A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Molecular Immunology*, v.20, n. 4, p. 483-489, 1983.

ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 174, 727–733, 1979.

ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V. Detection of Equine Infectious Anemia Virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.180, n.3, p.276-278, 1982.

ISSEL, C. J.; RWAMBO, P. M.; MONTELARO, R. C. Evolution of equine infectious anemia diagnostic tests: recognition of a need for detection of anti-EIAV glycoprotein antibodies. In: Powell, D.G. (Ed.), *Equine Infectious Diseases*, vol. 5. The University Press of Kentucky, Lexington, KY, pp. 196–200, 1988.

ISSEL, C.J.; MACMANUS, J.M.; HAGIUS, S.D.; FOIL, L.D.; ADAMS, W.V.; KIM, C.H.; CASEY, J.W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. *Journal of Virology*, v. 66, p. 3879-3882, 1992.

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

ISSEL, C. J.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; CORDES, T.R. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 19, p. 732–738, 1999.

ISSEL, C. J.; SCICLUNA, M. T.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; CAPRIOLI, A.; RICCI, I.; ROSONE, F.; CRAIGO, J.K.; MONTELARO, R.C.; AUTORINO, G.L. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record*, v. 165, p. 123 – 134, 2012.

KATZ, C.; LEVY-BELADEV, L.; ROTEM-BAMBERGER, S. et al. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. *Chemical Society Reviews*, v. 40, p. 2131-2145, 2011.

KIM, C.H.; CASEY, J.W. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. *Journal of Virology*, v. 66, p. 3879-3882, 1992.

LANDIS, J. R.; KOCK, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, p. 159–174, 1977.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.1481-1487, 1996.

LAUNE, D.; MOLINA, F.; FERRIERES, G.; VILLARD, S.; BES, C.; RIEUNIER, F.; CHARDES, T.; GRANIER, C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunol. Methods* v. 267, p. 53-70, 2002.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, p. 2002.

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. *Journal of Virology*, 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. *Journal of Virology*, v.75, p. 4570-4583, 2001.

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, p. 485–512, 2004.

MACHADO DE AVILA, R. A.; ALVARENGA, L. A.; TAVARES, C. A, MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, v. 44, p. 233-41, 2004.

- MACHADO DE AVILA, R. A.; STRANSKY, S.; VELLOSO, M.; CASTANHEIRA, P.; SCHNEIDER, F. S.; KALAPOTHAKIS, E.; SANCHEZ, E. F.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. *Peptides*, v. 32, p. 1640-1646, 2011.
- MARTARANO, L.; STEPHENS, R.; RICE, N.; DERSE, D. Equine infectious anemia virus transregulatory protein Rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. *J. Virol.*, v. 68, p. 3102- 3111, 1994.
- MARTINS, M. F. Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (gp90) no diagnóstico da anemia infecciosa Equina. 2004.59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MAURY, W., OAKS, J.L.; BRADLEY, S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v. 72, p. 9291-9297, 1998.
- MCGUIRE T. C.; FRASER, D. G.; MEALEY, R. H. Cytotoxic T lymphocytes in protection against equine infectious anemia virus. *Animal Health Research Review*, v. 2, n. 5, p. 271-276, 2004.
- MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C. J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus, *Journal of Biology Chemistry*, v.259, p. 10539–10544, 1984.
- MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.) *The retroviridae*. New York: Plenum Press, v. 2, cap. 5, p. 257-359, 1993.
- MOTTA, P.M.C. Comparação da IDGA, ELISA e “NESTED” PCR no diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muare. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MURPHY, F. A.; PAUL, E.; GIBBS, J.; HORZINEK, C.; STUDDERT, J. *Veterinary Virology*. 3ª ed. Academic Press, San Diego, 1999. 629p.
- NAGARAJAN, M.M.; SIMARD, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *Journal of virologicals Methods*, v.94, p.97-109, 2001.
- NAKAJIMA, H.; USHIMI, C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. *Infection and Immunity*, 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. *Infection and Immunity*, v.6, p. 416, 1972.
- NAKAJIMA, H.; FUKUNAGA, Y.; USHIMI, C. Titration of precipitating antibody in equine infectious anemia. *Natural Institute of Animal Health*, v. 14, n.1, p. 1-8, 1974.
- NEWMAN, M.J.; ISSEL, C.J.; TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; HOROHOV, D.W.; MONTELARO, R.C. Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV). *Virology*, v.184, n.1, p.55-66, 1991.
- OLIVEIRA, F. G. Validação da imunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico da anemia infecciosa equina em equídeos e comparação com oELISA rgp90 e *imunoblot*. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PIZA, A. S.T.; PEREIRA, A. R.; TERRERAN, M. T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Sorodiagnosis os equine infectious anemia by Agar gel immunodiffusion and

ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 78, p. 239-245, 2007.

PETROPOULOS, C. J. Retroviral taxonomy, protein structures, sequences, and genetic maps. In *Retroviruses*, pp. 757. Edited by Coffin J. M. . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

O'ROURKE, K.; PERRYMAN, L. E.; MCGUIRE, T. C. Antiviral, antiglycoprotein, and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anemia virus. *Journal of General Virology*, v. 69, p. 667-674, 1988.

QUINLIVAN, M.; COOK, F.; KENNA, R.; CALLINAN, J. J.; 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. *The Journal of General Virology*, v. 94, p. 612-622, 2013.

RADOSTITS, O. M, GAY, C.C, BLOOD, D.C, HINCHCLIFF KW. *Veterinary medicine*. 9^a ed. New York: WB Saunders; 2000.

RWAMBO, P. M.; ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V. J.; HUSSAIN, K. A.; MILLER, M.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV) humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Archives of virology*, v. 111, p. 199-212, 1990.

RAVAZZOLO, A. P, COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM; 2007. p.809-38.

REINEKE, U.; SABAT, R.; MISSELWITZ, R.; WELFLE, H.; VOLK, H. D.,; SCHNEIDER-MERGENER, J. A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nature Biotechnology*, v.1, p. 271-275, 1999.

REIS, J. K. P.; MELO, L. M.; REZENDE, M. R.; LEITE, R.C., Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. *Tropical Animal Health Production*, 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. 184f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

REIS, J. K. P. ; DINIZ, R. S. ; HADDAD, J. P. A. ; FERRAZ, I. B. F. ; CARVALHO, A. F. ; KROON, E. G. ; FERREIRA, P. C. P. ; LEITE, R. C. . Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *Journal of Virological Methods*, v. 180, p. 62-67 2012.

ROY, A.; KUCUKURAL, A; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, v. 5, p. 725-738, 2010.

SANTOS, E.M.; MOTTA, P.M.C.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P. Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.2, p.296-301, 2011.

SANTOS, E. M; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Anemia infecciosa equina. In: *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Retrovírus de animais domésticos*. 64^a ed. Belo Horizonte: Editora FEPMVZ, p. 73-84, 2012.

SCICLUNA, M.T.; ISSEL, J. C.; COOK, F. R.; MANNA, G.; CERSINI, A.; ROSONE, F.; FRONTOSO, R.; CAPRIOLI, A.; ANTOGNETTI, V. AUTORINO, G. L. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology*. v. 165, p. 123-134, 2013.

SELLON, D. C.; FULLER, F. J.; MCGUIRE, T. C. The immunopathogenesis of equine infeccious anemia virus. *Virus Research*. v. 32, p.111-138, 1994.

- SENTSUI, H.; KONO, Y. Hemagglutination inhibition tests with different strains of equine infectious anemia virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 42, p. 1949, 1981.
- SILVA, R. A. M. S.; ABREU, U.G. P.; BARROS, A T. M. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 2001.
- SOUTULLO, A.; VERWIMP.; RIVEROS, M.; PAULI, R.; TONARELLI, G. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Veterinary Microbiology*, v. 79, p. 111-121, 2001.
- SOUTULLO, A.; SANTI, M. N; PERIN, J. C.; BELTRAMINI, L. M.; BOREL, I. M.; FRANK, R.; TONARELLI, G. G. Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. *Journal of Molecular Recognition*, v.20, n. 4, p. 227-37, 2007.
- STEPHENS R. M.; CASEY, J. W.; RICE N. R. Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus, *Science*, v. 231, p. 589–594, 1986.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*, v. 95, p. 49-59, 2003.
- SUGIURA, T.; KONDO, T.; MATSUMURA, T.; IMAGAWA, H.; KAMADA, M.; IHARA, T. Field application of Enzyme-linked immunosorbent assay for screening of equine infectious anemia. *Journal of Equine Science*, v. 6, p. 15–20, 1995.
- TOMA, B. Persistent negative serologic reaction in a mare infected with equine infectious anemia virus. *Recueil de Medecine Veterinaire*, v.156, p.55-63, 1980.
- TU, Y. B.; ZHOU, T.; YUAN, X. F.; QIU, H. J.; XUE, F.; SUN, C. Q.; WANG, L.; WU, D. L.; PENG, J. M.; KONG, X. G.; TONG, G. Z. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. *Archives of Virology*, v. 152, p. 209–218, 2007.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; PELLEQUER, J. L. Predicting antigenic determinants in proteins: looking for unidimensional solutions to a three-dimensional problem? *Peptide Research*. v. 7, n. 4, p. 224-228, 1994.
- WANG, H.; MACHESKY, N. J., MANSKY, L. M. Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release. *Journal of Virology*. v.78, p. 1503–1512, 2004.
- WEIBLEN, R. Doenças Víricas. Anemia Infecciosa Equina. IN: RIET-CORREA F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A. Doenças de Ruminantes e equinos. 2 ed. Editora Varela. 2001. v. 1. , p.49-55.
- WILLIAMS, DL., ISSEL, CJ., STEELMAN, CD., ADAMS, WV., BENTON, CV. 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. *American Journal of Veterinary Research*, n.42, v.9, p.1469-1473, 1981.
- ZHANG, W.; AUYONG, D. B.; OAKS, J. L.; MCGUIRE, T. C. Natural variation of equine infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes, *Virology* v. 2, n. 261, p. 242–252, 1999.

Anexo 1: Lista de todos os peptídeos sintetizados em membrana de celulose, cobrindo toda a proteína correspondente a região do gene env do EIAV.

1.	MVSIAFYGGIPGGIS	49. HMDNNTATLLEAYHR	97. CGPTIFLGVLEDNKG	145. SEANTGLIRHKRDFG	193. LTTLHGARNNLAQSM	241. VKSIEAFGESYISEK
2.	IAFYGGIPGGISTPI	50. NNTATLLEAYHREIT	98. TIFLGVLEDNKGVVR	146. NTGLIRHKRDFGISA	194. LHGARNNLAQSMITF	242. IEAFGESYISEKTKG
3.	YGGIPGGISTPITQQ	51. ATLLEAYHREITFIY	99. LGVLEDNKGVVVRGDY	147. LIRHKRDFGISAIVA	195. ARNNLAQSMITFNTF	243. FGESYISEKTKGEIS
4.	IPGGISTPITQQSEK	52. LEAYHREITFIYKSS	100. LEDNKGVVVRGDYTAC	148. HKRDFGISAIVAAIV	196. NLAQSMITFNTFSDSI	244. SYISEKTKGEISQPG
5.	GISTPITQQSEKSKC	53. YHREITFIYKSSCTD	101. NKGVVVRGDYTACNVR	149. DFGISAIVAAIVAAT	197. QSMITFNTFSDSIAQF	245. SEKTKGEISQPGAAI
6.	TPITQQSEKSKCEEN	54. EITFIYKSSCTDSDH	102. VVVRGDYTACNVRRLN	150. ISAIVAAIVAATAIA	198. ITFNTFSDSIAQFGKD	246. TKGEISQPGAAINEH
7.	TQQSEKSKCEENTMF	55. FIYKSSCTDSDHCQE	103. GDYTACNVRRLNINR	151. IVAAIVAATAIAASA	199. NTPDSIAQFGKDLWS	247. EISQPGAAINEHKNG
8.	SEKSKCEENTMFQPY	56. KSSCTDSDHCQEYQC	104. TACNVRRLNINRKDY	152. AIVAATAIAASATMS	200. DSIAQFGKDLWSHIG	248. QPGAAINEHKNGSGG
9.	SKCEENTMFQPYCYN	57. CTDSDHCQEYQCKKV	105. NVRRLNINRKDYTGI	153. AATAIAASATMSYVA	201. AQFGKDLWSHIGNWI	249. AAINEHKNGSGGNNP
10.	EENTMFQPYCYNND	58. SDHCQEYQCKKVNLN	106. RLNINRKDYTGIIYQV	154. AIAASATMSYVALTE	202. GKDLWSHIGNWIPGL	250. NEHKNGSGGNNPHQG
11.	TMFQPYCYNNDKNS	59. CQEYQCKKVNLNSSD	107. INRKDYTGIIYQVPIF	155. ASATMSYVALTEVNK	203. LWSHIGNWIPGLGAS	251. KNGSGGNNPHQGS
12.	QPYCYNNDKNSMAE	60. YQCKKVNLNSSDSSN	108. KDYTGIIYQVPIFYTC	156. TMSYVALTEVNKIME	204. HIGNWIPGLGASIIK	252. SGGNNPHQGS
13.	CYNNDKNSMAESKE	61. KKVNLNSSDSSNSVR	109. TGIIYQVPIFYTCTFT	157. YVALTEVNKIMEVQN	205. NWIPGLGASIIKYIV	253. NNPHQGS
14.	NDSKNSMAESKEARD	62. NLNSSDSSNSVRVED	110. YQVPIFYTCTFTNIT	158. LTEVNKIMEVQNHTF	206. PGLGASIIKYIVMFL	254. HQGS
15.	KNSMAESKEARDQEM	63. SSDSSNSVRVEDVTN	111. PIFYTCTFTNITSCN	159. VNKIMEVQNHTFEVE	207. GASIIKYIVMFLLIY	255. SLDLEIRSEGGNIYD
16.	MAESKEARDQEMNLK	64. SSNSVRVEDVTNTAE	112. YTCTFTNITSCNNEP	160. IMEVQNHTFEVENST	208. IIKYIVMFLLIYLLL	256. LEIRSEGGNIYDCCI
17.	SKEARDQEMNLKEES	65. SVRVEDVTNTAEYWG	113. TFTNITSCNNEPIIS	161. VQNHTFEVENSTLNG	209. YIVMFLLIYLLLTSS	257. RSEGGNIYDCCIKAQ
18.		66.	114.	162.	210.	258.

ARDQEMNLKEESKEE	VEDVTNTAEYWGFKW	NITSCNNEPIISVIM	HTFEVENSTLNGMDL	MFLLIYLLLTSSPKI	GGNIYDCCIKAQEGT
19.	67.	115.	163.	211.	259.
QEMNLKEESKEEKRR	VTNTAEYWGFKWLEC	SCNNEPIISVIMYET	EVENSTLNGMDLIER	LIYLLLTSSPKILRA	IYDCCIKAQEGTLAI
20.	68.	116.	164.	212.	260.
NLKEESKEEKRRNDW	TAEYWGFKWLECNQT	NEPIISVIMYETNQV	NSTLNGMDLIERQIK	LLLTSSPKILRALWK	CCIKAQEGTLAIPCC
21.	69.	117.	165.	213.	261.
EESKEEKRRNDWWKI	YWGFKWLECNQTENF	IISVIMYETNQVQYL	LNGMDLIERQIKILY	TSSPKILRALWKVTS	KAQEGTLAIPCCGFP
22.	70.	118.	166.	214.	262.
KEEKRRNDWWKIGMF	FKWLECNQTENFKTI	VIMYETNQVQYLLCN	MDLIERQIKILYAMI	PKILRALWKVTSGAG	EGTLAIPCCGFPPLWL
23.	71.	119.	167.	215.	263.
KRRNDWWKIGMFLLC	LECNQTENFKTILVP	YETNQVQYLLCNNNN	IERQIKILYAMILQT	LRALWKVTSGAGSSG	LAIPCCGFPPLWLFWG
24.	72.	120.	168.	216.	264.
NDWWKIGMFLLCLAG	NQTENFKTILVPENE	NQVQYLLCNNNNSNN	QIKILYAMILQTHAD	LWKVTSGAGSSGSR	PCCGFPPLWLFWGLVI
25.	73.	121.	169.	217.	265.
WKIGMFLLCLAGTTG	ENFKTILVPENEMVN	QYLLCNNNNSNNYNC	ILYAMILQTHADVQL	VTSGAGSSGSRYLK	GFPLWLFWGLVIIVG
26.	74.	122.	170.	218.	266.
GMFLLCLAGTTGGIL	KTILVPENEMVNIND	LCNNNNSNNYNCVVQ	AMILQTHADVQLLKE	GAGSSGSRYLKFKFH	LWLFWGLVIIVGRIA
27.	75.	123.	171.	219.	267.
LLCLAGTTGGILWWY	LVPENEMVNINDTDT	NNNSNNYNCVVQSF	LQTHADVQLLKERQQ	SSGSRYLKFKFHFKH	FWGLVIIVGRIAGYG
28.	76.	124.	172.	220.	268.
LAGTTGGILWWYEG	ENEMVNINDTDTWIP	SNNYNCVVQSFVIG	HADVQLLKERQQVEE	SRYLKFKFHFKHSHR	LVIIVGRIAGYGLRG
29.	77.	125.	173.	221.	269.
TTGGILWWYEGLPQQ	MVNINDTDTWIPKGC	YNCVVQSFVIGQAH	VQLLKERQQVEETFN	LKFKFHFKHSHRSDT	IVGRIAGYGLRGLAV
30.	78.	126.	174.	222.	270.
GILWWYEGLPQQHYI	INDTDTWIPKGCNET	VVQSFVIGQAHLEL	LKERQQVEETFNLI	KFHFKHSHRSDTWDQ	RIAGYGLRGLAVIIR
31.	79.	127.	175.	223.	271.
WWYEGLPQQHYIGLV	TDTWIPKGCNETWAR	SFGVIGQAHLELPRP	RQQVEETFNLI	HKSHRSDTWDQAQH	GYGLRGLAVIIRICI
32.	80.	128.	176.	224.	272.
EGLPQQHYIGLVAIG	WIPKGCNETWARVKR	VIGQAHLELPRPNKR	VEETFNLI	ASREDTWDQAQHNH	LRGLAVIIRICIRGL
33.	81.	129.	CIERTH	225.	273.
PQQHYIGLVAIGGRL	KGCNETWARVKRCPI	QAHLELPRPNKRIRN	TFNLI	EDTWDQAQHNHLAG	LAVIIRICIRGLNLI
34.	82.	130.	CIERTH	226.	274.
HYIGLVAIGGRLNGS	NETWARVKRCPIDIL	LELPRPNKRIRNQSF	LVFC	WDQAQHNHLAGVTG	IIRICIRGLNLIFEI
35.	83.	131.	VFCHT	227.	275.
GLVAIGGRLNGSGQS	WARVKRCPIDILYGI	PRPNKRIRNQSFNQY	GPW	AQHNHLAGVTGGSG	ICIRGLNLIFEIIRK
36.	84.	132.		228.	276.

AIGRLNGSGQSNAI	VKRCPIDILYGIHPI	NKRIRNQSFNQYNCS	RTHVFCHTGHPWNMS	NIHLAGVTGGSGDKY	RLNLIFEIIRKMLD
37.	85.	133.	181.	229.	277.
GRLNGSGQSNAIECW	CPIDILYGIHPIRLC	IRNQSFNQYNCSINN	VFCHTGHPWNMSWGH	LAGVTGGSGDKYYKQ	NLIFEIIRKMLDYIG
38.	86.	134.	182.	230.	278.
NGSGQSNAIECWGSF	DILYGIHPIRLCVQP	QSFNQYNCSINNKTE	HTGHPWNMSWGHLE	VTGGSGDKYYKQKYS	FEIIRKMLDYIGRAL
39.	87.	135.	183.	231.	279.
GQSNAIECWGSFPGC	YGIHPIRLCVQPPFF	NQYNCSINNKTELET	HPWNMSWGHLESTQ	GSGDKYYKQKYSRND	IRKMLDYIGRALNPG
40.	88.	136.	184.	232.	280.
NAIECWGSFPGCRPF	HPIRLCVQPPFFLVQ	NCSINNKTELETWKL	NMSWGHLESTQWDD	DKYYKQKYSRNDWNG	MLDYIGRALNPGTSH
41.	89.	137.	185.	233.	281.
ECWGSFPGCRPFQNY	RLCVQPPFFLVQEK	INNKTELETWKLKVT	WGHLESTQWDDWVS	YKQKYSRNDWNGESE	YIGRALNPGTSHVSM
42.	90.	138.	186.	234.	282.
GSFPGCRPFQNYFSY	VQPPFFLVQEKGIAD	KTELETWKLKVTSGV	LNSTQWDDWVSKME	KYSRNDWNGESEEEYN	RALNPGTSHVSMPQY
43.	91.	139.	187.	235.	283.
PGCRPFQNYFSYETN	PFFLVQEKGIADTSR	LETWKLKVTSGVTPL	STQWDDWVSKMEDLN	RNDWNGESEEEYNRRP	ALNPGTSHVSMPQYV
44.	92.	140.	188.	236.	
RPFQNYFSYETNRSM	LVQEKGIADTSRIGN	WKLKVTSGVTPLPIS	WDDWVSKMEDLNQEI	WNGESEEEYNRRPKSW	
45.	93.	141.	189.	237.	
QNYFSYETNRSMHMD	EKGIADTSRIGNCGP	VKTSGVTPLPISSEA	WVSKMEDLNQEILTT	ESEEEYNRRPKSWVKS	
46.	94.	142.	190.	238.	
FSYETNRSMHMDNNT	IADTSRIGNCGPTIF	SGVTPLPISSEANTG	KMEDLNQEILTTLHG	EYNRRPKSWVKSIEA	
47.	95.	143.	191.	239.	
ETNRSMHMDNNTATL	TSRIGNCGPTIFLGV	TPLPISSEANTGLIR	DLNQEILTTLHGARN	RRPKSWVKSIEAFGE	
48.	96.	144.	192.	240.	
RSMHMDNNTATLLEA	IGNCGPTIFLGVLED	PISSEANTGLIRHKR	QEILTTLHGARNNLA	KSWVKSIEAFGESYI	