

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



Estratégias biotecnológicas aplicadas à Anemia Infecciosa Equina: revisão de literatura

Fernanda Silva Carneiro

Pelotas, 2021

Fernanda Silva Carneiro

Estratégias biotecnológicas aplicadas à Anemia Infecciosa Equina: revisão de literatura

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Priscila Marques Moura de Leon

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C289e Carneiro, Fernanda Silva

Estratégias biotecnológicas aplicadas à anemia infecciosa equina : revisão de literatura / Fernanda Silva Carneiro ; Priscila Marques Moura de Leon, orientadora. — Pelotas, 2021.

63 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Equinos. 2. Lentivírus. 3. Caracterização de vírus. 4. Diagnóstico molecular. 5. Desenvolvimento de vacinas. I. Leon, Priscila Marques Moura de, orient. II. Título.

CDD : 636.10896152

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Fernanda Silva Carneiro

“Estratégias biotecnológicas aplicadas à Anemia Infecciosa Equina: revisão de literatura”

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09/06/2021

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Priscila Marques Moura de Leon (Presidente da Banca)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
PhD em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin-Madison

Prof.^a Dra. Bruna Cunha de Alencar Bargieri
Doutora em Micro-Imuno-Parasitologia pela Universidade Federal de São Paulo

Dra. Cristina Mendes Peter
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedicado aos pesquisadores da COVID-19.
A esperança de dias melhores nos mantém lutando.**

Agradecimentos

Aos meus pais, Renata e Rinaldo, pelo amor e apoio incondicional que me possibilitou seguir meu sonho de ser pesquisadora. Aos meus irmãos de sangue, Guilherme e Hênrica, que sempre acreditaram no meu potencial até mesmo quando eu não acreditei. Aos meus irmãos de trajetória, meus amigos que acompanharam meu crescimento como profissional e como pessoa dentro da graduação. Aos meus irmãos de longa data, meus amigos que sempre torceram por mim. Aos meus professores, por despertarem ainda mais meu gosto pela ciência e por permanecerem fortes na luta que é ser professor. A minha orientadora e amiga Priscila, por aceitar este desafio.

Essa conquista não é só minha.

Obrigada a todos, de coração.

Resumo

CARNEIRO, Fernanda Silva. **Estratégias biotecnológicas aplicadas à Anemia Infecciosa Equina: revisão de literatura**. 2021. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A anemia infecciosa equina é uma doença de distribuição global que acomete espécies de equídeos, causada pelo Vírus da Anemia Infecciosa Equina. Esse lentivírus é responsável por comprometer a saúde destes animais, tendo um impacto econômico significativo na equinocultura e exportação de equinos. A principal medida de controle da doença é através do diagnóstico dos animais, com isolamento ou eutanásia dos animais contaminados. Os principais métodos de diagnóstico utilizados são através dos testes de imunodifusão em gel de ágar e imunoabsorção enzimática, contudo, estes testes apresentam limitações no diagnóstico deste vírus, devido sua variabilidade genética e distribuição geográfica não totalmente elucidada. O presente trabalho, portanto, objetiva elucidar o panorama atual da epidemiologia molecular do vírus, bem como os métodos utilizados para caracterização de genomas, desenvolvimento de métodos de diagnóstico e vacinas para o vírus através de ferramentas biotecnológicas. A caracterização por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de Sanger forneceram importantes informações sobre a disseminação e epidemiologia do vírus, servindo como base para análises filogenéticas da distribuição do vírus, assim como, seu mecanismo de ação e transmissão. O sequenciamento de nova geração para caracterização de isolados do vírus apresenta-se uma nova alternativa frente às limitações das técnicas convencionais, com técnicas mais sensíveis e rápidas de sequenciamento, além da possibilidade de utilizar técnicas que contenham etapas limitantes para a caracterização de isolados do vírus. Frente a isso, ainda é necessário o desenvolvimento de testes sorológicos e moleculares com maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico do vírus. Ainda não existem vacinas comercialmente disponíveis para a anemia infecciosa equina, entretanto estudos baseados na vacina chinesa desenvolvida para o controle do surto no país apresentam dados sobre a integração do genoma viral e mecanismos de escape do vírus, concomitantemente a caracterização de isolados da espécie, que podem auxiliar no desenvolvimento de vacinas eficazes para uma maior diversidade genética do vírus, tal como servir de base para estudos de outros lentivírus. A utilização de técnicas e aplicações biotecnológicas permite esclarecer características do vírus, como sua filogenia, patogenia e transmissão, e com isso, sendo uma importante ferramenta para solucionar as limitações dos atuais testes de diagnóstico e caracterização do vírus.

Palavras-chave: Equinos; Lentivírus; Caracterização de vírus; Diagnóstico molecular; Desenvolvimento de vacinas.

Abstract

CARNEIRO, Fernanda Silva. **Biotechnological strategies applied to Equine Infectious Anemia: literature review.** 2021. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Equine infectious anemia is a disease with global distribution that affects equine species, caused by the Equine Infectious Anemia Virus. This lentivirus is responsible for compromising the health and physiology of these animals, having a significant economic impact on equine farming and horse exports. The main measure of disease control is through the diagnosis of animals, with isolation or euthanasia of contaminated animals. The main diagnostic methods used are through agar gel immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay, however these tests have limitations due to the genetic variability and geographic distribution not fully elucidated. The present work, therefore, aims to elucidate the current panorama of the molecular epidemiology of the virus, as well as the methods used for characterization of genomes, development of diagnostic methods and vaccines for the virus through biotechnological tools. Characterization by polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing provided important information about the spread and epidemiology of the virus, serving as a basis for phylogenetic analysis of the virus distribution, as well as the mechanism of action and transmission. Next-generation sequencing for characterization of virus isolates is a new alternative to the limitations of conventional techniques, with more sensitive and faster sequencing techniques, in addition to the possibility of using techniques that contain limiting steps for the characterization of virus isolates. In view of this, it is still necessary to develop serological and molecular tests with greater sensitivity and specificity for the diagnosis of the virus. There are still no commercially available vaccines for equine infectious anemia, however studies based on the Chinese vaccine developed to control the outbreak in the country present data on the integration of the viral genome and virus escape mechanisms, concomitantly with the characterization of isolates of the species, which they can aid in the development of effective vaccines for greater genetic diversity of the virus, as well as serving as a basis for studies of other lentiviruses. The use of biotechnological techniques and applications makes it possible to clarify the characteristics of the virus, such as its phylogeny, pathogenesis and transmission, making it an important tool to solve the limitations of current diagnostic tests and virus characterization.

Keywords: Equines; Lentiviruses; Virus characterization; Molecular diagnosis; Vaccine development.

Lista de Figuras

Figura 1	Linha do tempo dos principais surtos de AIEV	16
Figura 2	Esquema representativo do genoma do AIEV	22
Figura 3	Análise filogenética do gene <i>Gag</i> do AIEV	26

Lista de abreviaturas e siglas

AIEV	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
BIV	Vírus da Imunodeficiência bovina
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CRAIE	Centro Nacional de Referência Italiano para Anemia Infecciosa Equina
ED	Células fibroblásticas dérmicas equinas
EHR	Região potenciadora do LTR do vírus
EIA	<i>Equine Infectious Anemia</i> (Anemia Infecciosa Equina)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISA-AC	Ensaio de imunoabsorção enzimática de captura de antígeno
ELR-1	Receptor-1 de lentivírus equino
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas de Alimentação e Agricultura)
FDD	Células dérmicas de asno fetal
FED	Células dérmicas de equinos
FEK	Células de rim fetal equino
FPA	Teste de Imunoabsorção Fluorescente
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IL	Interleucina
JDV	Vírus da Doença de Jembrana
LFA	<i>Lateral flow assay</i> (ensaio de fluxo lateral)
MHR	<i>Major homology region</i> (principal região de homologia)
MV	Vírus Maedi Visna
NES	Sinal de exportação nuclear
NRE	Região de regulação negativa
ODE	Sistema de equação diferencial ordinária
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i> (Organização Mundial de Saúde Animal)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLV	Lentivírus de Puma
PNSE	Programa Nacional de Sanidade de Equinos
QPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SBS	<i>Sequencing by Synthesis</i> (sequenciamento por síntese)
SGA	<i>Single Genome Amplification</i> (sequenciamento de genoma único)
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SMS	<i>Single-molecule Sequencing</i> (sequenciamento de molécula única)
TGF β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivo	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Histórico e epidemiologia	16
3.1. Surgimento, histórico e epidemiologia do AIEV na Europa	16
3.2. Histórico e epidemiologia do AIEV na Ásia	19
3.3. Histórico e epidemiologia do AIEV na América	20
4. O vírus	22
4.1. Taxonomia e estrutura viral	22
4.2. Tropismo	22
4.3. Patologia da doença	23
4.4. Genes e proteínas	24
4.4.1. Gene <i>Gag</i> : proteínas p15, p26, p11 e p9	24
4.4.2. Gene <i>Pol</i> : proteínas Pr, RT, Int e dUTPase	26
4.4.3. Gene <i>Env</i> : glicoproteínas Gp90 e Gp45	26
4.4.4. Proteínas acessórias Tat, Rev e S2	27
4.4.5. Repetições terminais longas (LTRs)	27
4.5. Variabilidade genética	28
4.6. Resposta imune do hospedeiro	30
5. Estratégias e aplicações biotecnológicas	31
5.1. Caracterização de AIEV	31
5.1.1. Técnicas moleculares de análise e caracterização	31
5.1.1.1. Sequenciamento de Sanger	31
5.1.1.2. Sequenciamento por NGS	32
5.1.1.3. Caracterização estrutural do genoma do AIEV	35
5.1.2. Importância da caracterização de isolados de AIEV	35
5.2. Diagnóstico do AIEV	39
5.2.1. Técnicas de diagnóstico adotadas no Brasil e no mundo	39
5.2.2. Desenvolvimento, avaliação e caracterização de testes de diagnóstico para AIEV	40

5.3. Vacinação para AIEV	43
5.4. Modelos de estudo para AIEV	47
5.5. Tratamento para AIEV	48
6. Perspectivas sobre o uso da biotecnologia aplicada ao AIEV	49
6.1. Perspectivas para a caracterização do vírus	49
6.2. Perspectivas para o diagnóstico, vacinação e controle do AIEV ..	50
7. Conclusão	52

1. Introdução

A biotecnologia aplicada à saúde utiliza de técnicas imunológicas e moleculares para elucidar os mecanismos de ação e patogenicidade, ou seja, a capacidade de desenvolver a doença, de agentes infecciosos e as respostas imunes do hospedeiro, com o objetivo de desenvolver vacinas, diagnósticos ou métodos de caracterização para uma série de doenças. Para isso, é necessária a conexão da biotecnologia com conhecimentos de saúde animal e humana em seus ambientes social e epidemiológico, conceituada pelo termo Saúde Única (Zinsstag, 2011; Manolescu, 2017).

A equinocultura e o mercado de cavalos é um ramo do agronegócio com grande impacto no desenvolvimento econômico de vários países ao redor do mundo (Cross, 2019). Segundo a Organização das Nações Unidas de Alimentação e Agricultura (FAO - do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a população mundial de equinos se distribui de forma não homogênea em diversas continentes do mundo, como Ásia, Europa, África e Oceania, movimentando cerca de 280 bilhões de dólares ao redor do mundo (revisado em Cross, 2019). Os equinos são responsáveis por movimentar diversos setores econômicos, compreendendo um importante papel no agronegócio global que, devido à ausência de dados sobre a utilização desses animais em diversos períodos, ainda não é completamente elucidada, sugerindo que a importância econômica destes animais é maior que os números notificados (CEPEA, 2006; Bueno, 2020). Existem uma série de doenças infecciosas que podem comprometer a saúde destes animais, causando um grande impacto econômico. Programas de vigilância, como o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), foram criados em diversos países para prevenir, controlar ou erradicar doenças de equinos, e desenvolvem importantes atividades, como o diagnóstico e controle epidemiológico de doenças notificáveis, o tratamento, isolamento ou eutanásia dos animais infectados e a vacinação (Cook, 2013; CEPEA, 2006; Bueno, 2020).

A anemia infecciosa equina (EIA - do inglês *equine infectious anemia*) é uma doença global, transmissível, infecciosa e é uma das onze doenças equinas de ocorrência notificável listadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE - do inglês *World Organisation for Animal Health*). Essa doença acomete animais da família Equidae, como cavalos (*Equus caballus*) e asnos (*Equus asinus*), e a contaminação ocorre principalmente a partir do contato com o sangue de animais contaminados (OIE, 2021). A doença é causada pelo vírus da anemia infecciosa equina (AIEV - do inglês

equine infectious anemia virus). É um vírus do reino *Pararnavirae*, filo *Artverviricota*, classe *Revtraviricetes*, ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus*. Possui semelhança a outros lentivírus, como os vírus da imunodeficiência humana, símia, felina e bovina. A replicação viral do AIEV acontece a partir do tropismo para linhagens de monócitos e macrófagos de equinos, com a replicação do vírus em monócitos dependente da diferenciação em macrófagos. O agente é transmitido principalmente pelo contato do sangue contaminado entre animais, tendo os tabanídeos (*Tabanus sp.*) e moscas de estábulos (*Stomoxys calcitrans*) como principais vetores. Os principais reservatórios do vírus e que contribuem para a disseminação da doença são os portadores inaparentes, uma vez que não é identificada a infecção no animal (Autorino, 2016; Bueno, 2020; ICTV, 2021).

A principal medida para o controle e prevenção da anemia infecciosa equina recomendada pela OIE é o monitoramento e diagnóstico das infecções de AIEV na população de equinos e posterior segregação, seguida da eutanásia dos animais infectados (Bueno, 2020. OIE, 2021). Esse monitoramento é feito a partir de vigilâncias sorológicas regulares pela detecção de anticorpos específicos presentes no soro do animal pelos testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (Alnaeem, 2015; Alvarez, 2015; Bueno, 2020; Capelli, 2011). No entanto, pouco se tem conhecimento sobre a epidemiologia molecular do vírus e suas variações genéticas, e ainda são escassos os estudos que objetivam o sequenciamento e caracterização de diferentes cepas de AIEV ao redor do mundo (Bueno, 2020). Estudos mostraram uma extensa variabilidade genética do vírus, o que dificulta o desenvolvimento de medidas profiláticas como o desenvolvimento de vacinas e técnicas de diagnóstico universalmente aplicáveis, reforçando ainda mais a importância do aprofundamento de estudos na área (Capelli, 2017; Bueno, 2020).

Baseado nestes estudos, o presente trabalho aborda, em uma revisão narrativa, o panorama atual sobre as perspectivas e avanços científicos nos processos de caracterização e identificação de novas cepas, no desenvolvimento de vacinas e técnicas de diagnóstico para AIEV.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é sintetizar em uma revisão de literatura as técnicas e métodos biotecnológicos utilizados e desenvolvidos para o controle da anemia infecciosa equina.

2.1. Objetivos específicos

- Sintetizar o conhecimento produzido e publicado sobre a utilização e desenvolvimento de ferramentas e técnicas biotecnológicas na caracterização do vírus da anemia infecciosa equina;
- Sintetizar o conhecimento produzido e publicado na utilização e desenvolvimento de técnicas de diagnóstico para anemia infecciosa equina;
- Sintetizar o conhecimento produzido e publicado sobre o desenvolvimento de vacinas para anemia infecciosa equina;
- Elucidar o panorama atual das técnicas utilizadas e desenvolvidas a fim de relatar o estado da arte das principais abordagens para o controle da anemia infecciosa equina.

3. Histórico e epidemiologia

3.1. Surgimento, histórico e epidemiologia do AIEV na Europa

A AIE foi reportada pela primeira vez em 1843 na França a partir de manifestações clínicas em equinos, onde foi descrita a doença nos estágios agudo, subagudo e crônico (Lignee, 1843). Foi apenas com Vallee e Carre, em 1904, que foi descrito o agente causador da EIA, classificando-o como um agente filtrável (que seria capaz de reter outros microrganismos maiores, como a maioria das bactérias), e que se tratava de um agente infeccioso. Os autores relataram experimentalmente que a transferência acontecia a partir do contato com o sangue do animal contaminado e que a infecção pelo agente continuava após a ausência de sinais clínicos (Vallee, 1904). O AIEV foi então o primeiro vírus atribuído a uma doença animal classificado como retrovírus (Cook, 2013; Nakai, 2020). Sua ocorrência é de forma global, e sua prevalência pode chegar a 70% dos animais adultos em áreas endêmicas. Ao longo do século XXI, surtos em países da Europa, América e Ásia (Figura 1) implicaram no aumento de programas de vigilância ao redor do mundo, sendo o diagnóstico dos animais infectados a principal medida para o controle epidemiológico da disseminação da doença (Franco, 2011).

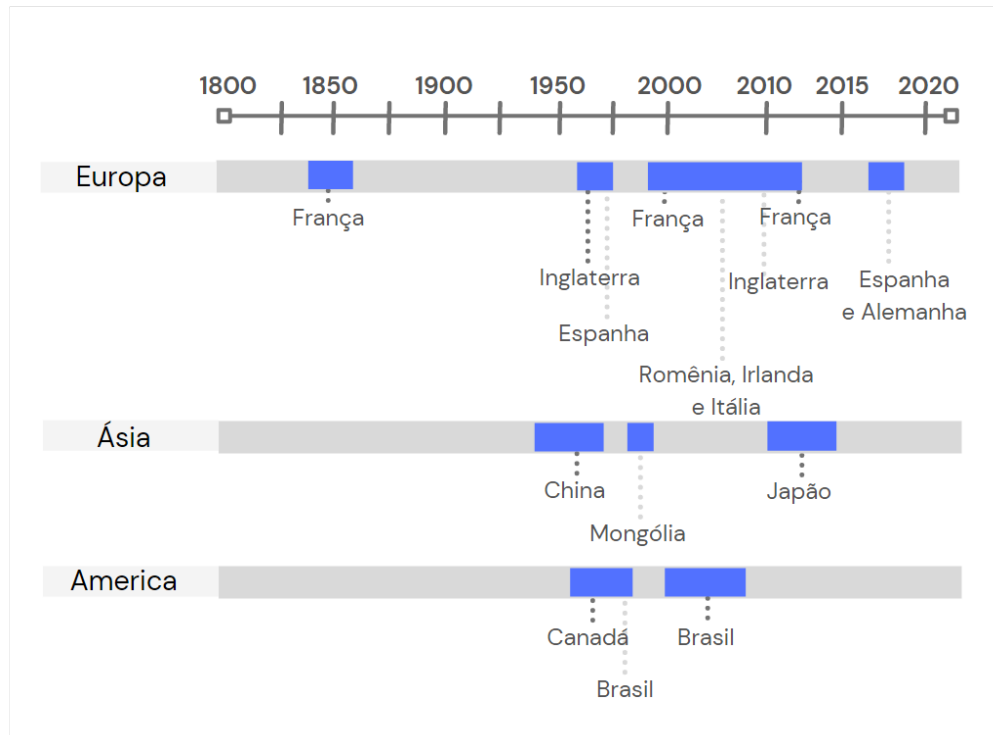


Figura 1. Linha do tempo dos principais surtos do vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV) na Europa, Ásia e América (fonte: autor).

Na Europa, os primeiros casos de surtos notificados surgiram na França, sendo o primeiro relato deles em 2000. Entretanto, o maior surto no país só aconteceu em 2009 em uma região isolada no sudeste da França em que 90% dos cavalos infectados não apresentavam sintomas. Hipóteses sobre a origem do surto sugerem que este pode ter ressurgido do surto de 2000. Entretanto, a falta de coleta de amostras de sangue do surto de 2000 impossibilitou a comparação entre as cepas para confirmar essa hipótese. Outras hipóteses da origem do surto são a compra dos cavalos de um mesmo vendedor e as condições sanitárias da escola de equitação de onde originaram os cavalos (Gaudaire, 2017). Estudos filogenéticos com as cepas do surto de 2009 mostraram identidade entre si nas sequências da proteína p9, além de homologia com isolados da Bélgica, originados da Romênia (Caij, 2014). Após o surto de 2009, mais dois surtos em equídeos foram identificados em 2010 e 2012 (Gaudaire, 2017; Roberts, 2017; Deshiere, 2019).

Em 2006, surtos na Romênia, Irlanda e Itália foram responsáveis pela disseminação de cepas em diversos outros países da Europa, sendo considerados os

principais países endêmicos para a doença no continente. Os surtos na Itália e na Irlanda ocorreram simultaneamente, causados pela cepa europeia AIEV_{IRE}. Acredita-se que os surtos tenham se originado de uma mesma fonte devido as sequências idênticas da proteína p9 dos vírus isolados. Essa transmissão ocorreu de forma iatrogênica, devido a infusão de produtos de plasma de cavalo em potros recém nascidos nos países, sendo um surto considerado grave por se apresentar fatal para grande parte dos animais infectados (Cook, 2013; Cappelli, 2017). Os animais confinados na fazenda onde aconteceram os primeiros casos de surto na Itália foram inicialmente diagnosticados por IDGA, com falsos resultados negativos resultando na continuação do surto (Cappelli, 2010). Entre 2007 e 2012, a triagem com testes ELISA e IDGA foi feita para o controle epidemiológico do surto na Itália. Contudo, a prevalência em espécies híbridas (como asnos, mulas ou bardotos) não é completamente conhecida, dificultando o diagnóstico nestas espécies (Cappelli, 2017; Bueno, 2020). Estudos experimentais mostraram que a infecção em asnos é capaz de ser mantida em níveis virais mais baixos que em cavalos, devido aos resultados errôneos dos testes de IDGA para as espécies (Cappelli, 2017).

O teste de IDGA também falhou no diagnóstico em cavalos durante o surto, com uma taxa de falha na identificação de 17% de todos os casos infectados. Essa falha foi identificada posteriormente por ELISA com amostras de soro provenientes de animais do surto, que haviam sido diagnosticados positivamente (Quinlivan, 2013; Autorino, 2016; Cappelli, 2017). A utilização de testes de diagnóstico mais sensíveis como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - do inglês *Polymerase chain reaction*) poderiam ter sido aplicadas, porém o desenvolvimento de *primers* específicos para a cepa não foram desenvolvidos rápido o suficiente para serem usados durante o período do surto, e as tentativas foram ineficientes. Ademais, são necessárias altas concentrações de proteínas virais do AIEV presentes no sangue do animal para serem detectados por PCR convencional, devido a baixa sensibilidade do teste para diagnosticar a infecção por essa técnica (Autorino, 2016; Cappelli, 2017). Os surtos na Itália foram controlados a partir das medidas de vigilância e controle epidemiológico durante alguns anos, entretanto em 2017 ocorreu a reincidência da doença no país, sendo notificados 22 surtos. Na Romênia, mais de cem surtos em diversas regiões após o surto de 2006, onde o Sistema de Notificação de Doenças de Animais do Reino Unido (sistema utilizado na Romênia) decidiu abater todas as espécies que testaram positivo para o vírus para o controle da disseminação (revisado em Roberts, 2017).

Na Inglaterra, o AIEV foi identificado pela primeira vez em 1975, seguido por uma ausência de notificação da doença até 2010 (Rossdale, 1975; Dorey-Robinson, 2018). O sequenciamento e caracterização de cepas inglesas entre 2010-2012 expandiu o número de grupos filogenéticos na Europa, demonstrando alta variabilidade em regiões com proximidades geográficas, sugerindo que diferentes variações podem ter sido originadas na Europa de diferentes países, se disseminando pelo continente (Dorey-Robinson, 2019). Os animais testados positivamente após os surtos na Alemanha em 2017 sugeriram que as cepas do vírus no país não tinham origem europeia, sendo a origem dos surtos ainda é desconhecida (Roberts, 2017). Na Espanha, os primeiros casos de AIE surgiram em 1983, com sinais clínicos da doença que só voltaram a ser relatados no oeste do país, em 2017 (Roberts, 2017).

Em alguns países europeus a AIE ressurgiu após anos sem notificações, como ocorreu na Bélgica, Alemanha e Reino Unido (Autorino, 2016). Estudos sugeriram que a importação de produtos biológicos equinos contaminados de países como Romênia e Itália foram as causas da infecção (Autorino, 2016). Outros países também apresentaram relatos de cepas com grande diversidade genética, como na Eslovênia, onde foram identificadas nove cepas diferentes de nove possíveis ramos diferentes na árvore filogenética, sugerindo que as cepas têm proximidade evolutiva com as cepas americana e italiana (Kuhar, 2015).

3.2. Histórico e epidemiologia do AIEV na Ásia

Na China, não se tinham relatos de AIE até o início do século XX, até que a espécie foi introduzida ocasionando surtos nacionais (Wang, 2016). Os surtos em 1950 foram reportados em apenas nove províncias, enquanto apenas 30 anos depois, um total de 23 províncias relataram casos de EIA. A importação de animais, a falta de controle efetivo e a falta do diagnóstico nos primeiros estágios da infecção eram alguns dos principais motivos da prevalência e disseminação do vírus, entre 1954 e 1973, o diagnóstico clínico era o principal método de detecção da doença. O método diagnóstico que passou a ser utilizado após o início dos surtos foram os testes de fixação de complemento (CF) e teste IDGA, mas ainda havia muita discordância entre os testes, até que a utilização do teste de ELISA foi implementada em 1979 (Wang, 2018). O teste de fixação de complemento avalia a resposta imune humoral durante infecções primárias, porém o soro do animal pode ser anticomplementar, gerando

anticorpos que podem dar falsos resultados positivos, por isso essa técnica aplicada ao AIEV caiu em desuso (Meri, 1998; Wang, 2018).

Na Mongólia, os programas de vigilância e controle desempenham um importante papel na epidemiologia de doenças equinas, uma vez que estes animais desempenham importantes papéis econômicos e sociais no país, onde casos esporádicos de AIE são detectados com frequência no país desde 1990, principalmente devido a movimentação de equinos vindos da fronteira com a Rússia e a homologia das cepas no país com isolados provenientes da Europa, a partir das análises filogenéticas do gene *Gag*. Contudo, os casos na Mongólia ainda não são sistematicamente documentados, dificultando o entendimento da epidemiologia da doença no país e a transmissão do vírus entre Rússia e Mongólia (Sharav, 2017).

Em 2011, no Japão, novas cepas foram detectadas em cavalos selvagens em Misaki, compreendendo a identificação de uma nova cepa pertencente a um grupo monofilético separado, com 8208 pb e com apenas 77,2% e 78,7% de identidade com as cepas AIEV_{WY} e AIEV_{LIA}, respectivamente (Dong, 2013). Assim como no surto ítalo-irlandês, durante o surto no Japão não se conseguiu amplificar as sequências dos isolados de AIEV devido a necessidade de primers específicos para a cepa identificada, reforçando mais ainda a necessidade do estudo da epidemiologia molecular deste vírus (Cappelli, 2017; Dong, 2013; Quinlivan, 2013).

3.3. Histórico e epidemiologia do AIEV na América

Em 1971 surgiram os primeiros relatos de AIEV no Canadá a partir do surgimento dos testes comercialmente disponíveis, e então foi implementado o programa nacional para controle da doença em 1972. Como iniciativa no país para vigilância da propagação da doença, dados são coletados sobre os animais importados e exportados no país, servindo como base para avaliar o impacto do programa no controle da doença, como nos processos de exportação para os EUA ou México, onde é exigido resultado negativo do teste por IDGA e ELISA até 180 dias antes da viagem (Higgins, 2017).

Enquanto no Brasil, a primeira notificação de AIE foi em 1968 nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Tigre, 2017). A prevalência no país varia entre áreas, sendo as regiões do Mato Grosso, Ilha de Marajó, Bahia e Minas Gerais as com maior prevalência, com média de 23% entre si, enquanto estados como o Rio Grande

do Norte (que possui a maior população de asininos do mundo) a prevalência notificada é considerada baixa para EIA, com 3,3%. Esse baixo valor pode estar relacionado ao difícil diagnóstico destas subespécies, devido à baixa carga viral presente (MAPA, 2016; Bueno, 2020). Uma análise temporal entre 2005-2016 no estudo de Costa e colaboradores (2018) mostrou que a dificuldade no cumprimento das medidas de controle no país manteve a estabilidade na prevalência da doença, nos índices de morbidade, na razão entre os animais sacrificados e os reagentes positivados nos testes de diagnóstico e no índice de notificação de casos na maioria dos estados do país, com algumas variações entre estados ou regiões. Contudo, a ausência de notificações entre longos períodos em alguns estados dificultou uma análise fiel dos dados, podendo indicar que o número de animais infectados pode ser superior aos números notificados. O aumento dos focos confirmados mesmo com a diminuição dos animais positivos entre 1999 e 2007 diagnosticados no país e a ausência de sinais clínicos nos animais só corrobora a hipótese de que exista uma subnotificação dos casos, especialmente quando utilizado apenas o teste por IDGA (sem a triagem por ELISA) para a detecção de AIEV, como ocorria até 2007 (Franco, 2011; Bueno, 2020).

4. O vírus

4.1. Taxonomia e estrutura viral

O vírus anemia infecciosa equina é um vírus pertencente ao reino *Pararnavirae*, o qual inclui todos os vírus transcritos a partir da transcriptase reversa. Este reino conta apenas com o filo *Artverviricota* e a classe *Revtraviricetes*. Dentro desta classe, o vírus classifica-se como pertencente a ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus*, assim como os vírus da imunodeficiência humana (HIV), símia (SIV), bovina (BIV), felina (FIV), o vírus da doença de Jembrana que acomete bovinos (JDV), a artrite encefalite caprina (CAE), o lentivírus de puma (PLV) e a doença de Maedi Visna que acomete ovinos (MV) (ICTV, 2021).

Os vírus pertencentes à família *retroviridae* são conhecidos por evoluírem em diferentes hospedeiros por cerca de 400 milhões de anos, abrangendo praticamente todos os vertebrados conhecidos (Cook, 2013). Estudos de Wertheim e Worobey (2009) sugerem que o gênero lentivírus surgiu há mais de 1 milhão de anos, a partir do estudo com os vírus que deram origem ao HIV-1, HIV-2 e o SIV. Os lentivírus atualmente infectam equinos, bovinos, alguns primatas, ruminantes e felinos, e acredita-se que a infecção em equinos surgiu há cerca de 50 mil anos (Cook, 2013).

Assim como os demais retrovírus, o AIEV é um vírus envelopado diplóide, ou seja, contém duas moléculas de RNA de fita simples, que condensados à nucleoproteínas formam o núcleo cônico do vírus. Quando transcrito, o genoma do vírus possui cerca de 8,2 kpb. O genoma é envolto por um capsídeo formado pelo antígeno de capsídeo (p26), com uma camada externa de proteínas da matriz (p15). Essa camada externa é revestida com glicoproteínas transmembrana e de superfície. O vírus possui 115 nm de diâmetro (Flores, 2007; Cook, 2013).

4.2. Tropismo e transmissão

O AIEV apresenta tropismo para as linhagens celulares de monócitos e macrófagos, pois são as únicas células descritas que possuem a expressão do receptor-1 de lentivírus equinos (ELR-1), responsável pela entrada do vírus nas células-alvo. Contudo, os monócitos não expressam as citocinas e o receptor do fator

de crescimento hematopoiético (Csf1) que são necessários para o processo de replicação do vírus, e por isso, a diferenciação dos monócitos em macrófagos é necessária para o ciclo de replicação do vírus (Flores, 2007; Cook, 2013). Além disso, proteínas virais também já foram detectadas em células epiteliais em diversos órgãos, mas pouco se sabe sobre o metabolismo e função delas nestas células (Cook, 2013; Bueno, 2020).

A transmissão geralmente ocorre a partir do contato com o sangue contaminado, sendo os principais vetores da doença os tabanídeos, que são capazes de carregar grandes quantidades do vírus (até 10 nl). A transmissão iatrogênica também já foi identificada, a partir da transfusão de partículas virais de sangue contaminado por agulhas, instrumentos cirúrgicos ou acessórios equestres. A transmissão iatrogênica também pode acontecer, a partir da infusão de amostras do vírus em animais. A transmissão vertical ou transplacentária também pode ocorrer, sendo mais comum em casos sintomáticos da égua infectada devido ao alto título da viremia, enquanto é menos comum a detecção da infecção vertical em potros jovens nascidos de éguas que são assintomáticas (Sellon, 1994; Cook, 2013).

4.3. Patologia da doença

Durante o processo de infecção da doença, ocorre a proliferação de linfócitos T CD8 citotóxicos e macrófagos em resposta à infecção. O nível de plaquetas diminui, junto ao aumento da temperatura corporal do animal, podendo resultar em episódios febris nos primeiros dias da infecção. A doença tem este nome devido ao quadro de anemia grave observado nos animais portadores crônicos da doença, sendo um dos sintomas que mais comprometem a qualidade de vida e que levam ao óbito do animal (Sellon, 1994). Os sinais clínicos da infecção aguda da doença são mediados por citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), o fator de transformação do crescimento beta ($TGF\beta$) e a interleucina 6 (IL-6), responsáveis por induzir episódios de febre, trombocitopenia e a desregulação da eritropoiese, causando anemia no animal (Cook, 2013).

4.4. Genes e proteínas

O genoma do AIEV é constituído pelos genes *Gag*, *Pol* e *Env*, limitados por extremidades contendo repetições terminais longas (LTRs). Também possui quadros de leitura abertos (ORFs) que codificam as proteínas regulatórias Tat, Rev e S2 (Figura 2). Os genes *Gag* e *Pol* estão codificados em diferentes quadros de leitura, e ocorre um deslocamento do quadro ribossômico para iniciar a tradução do gene *Pol*, causada por uma sequência AAAAAAC, um segmento emparelhado com conteúdo GC e uma estrutura de pseudo-nó. Esses componentes responsáveis pelo deslocamento da estrutura ribossômica são conservados entre as cepas de AIEV sequenciadas (Cook, 2013).

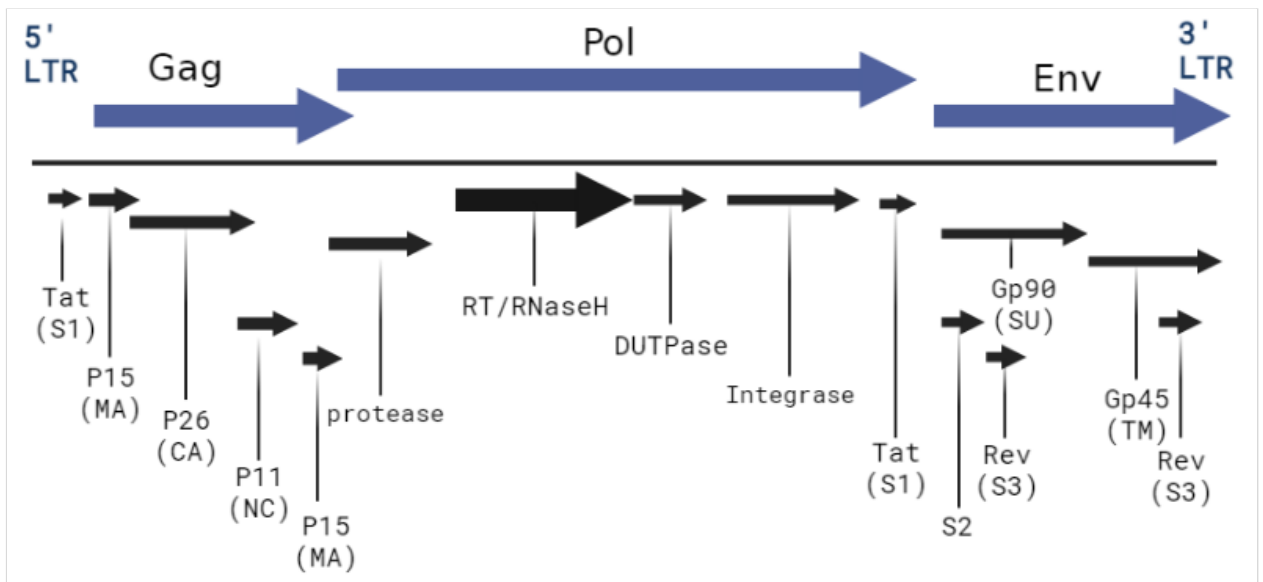


Figura 2. Esquema representativo do genoma do AIEV. Sequência de aproximadamente 8,2 kpb contendo as ORFs para Tat, Rev e S2, e os genes *Gag*, *Pol* e *Env*, capazes de codificar as proteínas estruturais p15 (MA), p26 (CA), p11 (NC) e p15 (MA); as enzimas transcriptase reversa/ribonuclease H (RT/RNase H), a desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) e a Integrase (Int); as glicoproteínas Gp90 (SU) e Gp45 (TM), respectivamente. (Adaptado de Cook, 2013 e Deshiere, 2019).

4.4.1. Gene *Gag*: proteínas p15, p26, p11 e p9

O gene *Gag*, quando clivado, produz quatro proteínas estruturais: a proteína de matriz p15 (MA), o antígeno do capsídeo p26 (CA), o nucleocapsídeo de ligação ao RNA genômico p11 (NC) e a proteína de “domínio tardio” p9 (Cook, 2013).

A proteína p15 (MA) é responsável pela ligação com fosfoinosítídeos da célula hospedeira e inicia o processo de montagem da partícula viral, formando a matriz do vírus. Sua estrutura é semelhante a p17 do HIV-1 e SIV, exceto pela localização da sequência do sinal de exportação nuclear rico em leucina (NES) e a ausência de sítios de miristoilação. Entre as cepas de AIEV, as regiões responsáveis pela substituição dos ácidos nucleicos do NES são altamente conservadas, sendo a região responsável por marcar a proteína para ser exportada do núcleo para o citoplasma. A ausência de sítios de miristoilação no AIEV, responsáveis por introduzir grupos acila na porção N-terminal das proteínas, faz com que o vírus não faça sua ligação à célula hospedeira mediada por miristatos a partir da ligação ao fosfatodilinositol-4,5-difosfato (PIP2), como ocorre no HIV-1, mas pela ligação com o fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) (Cook, 2013).

A proteína p26 (CA) tem papel estrutural no controle do empacotamento do vírus a partir da sua polimerização e montagem do *core* viral, com a formação de uma cápsula em torno do RNA genômico e das proteínas NC. Nesta proteína contém a principal região de homologia (MHR) entre retrovírus, sendo uma sequência de vinte aminoácidos (glutamina, ácido glutâmico e arginina) altamente conservados. A ocorrência de substituições nestas regiões pode comprometer a formação do capsídeo maduro, inviabilizando o ciclo de replicação do vírus (Purdy, 2008; Cook, 2013). A proteína p11 (NC) atua no empacotamento do RNA genômico em partículas de lentivírus e também está envolvida junto a p9 na liberação do vírus na célula. Possui sítios de ligação ao zinco (CCHC) e um ligante curto de cinco aminoácidos com uma sequência de prolina, glicina e histidina (PGH) (Cook, 2013).

A proteína p9 se associa à proteína X de interação com ALG-2 (ALIX) e a subunidade m2 do complexo de proteína adaptadora (AP-2), mediando a liberação das partículas virais. Contém um domínio tardio constituído de quatro aminoácidos (tirosina, prolina, ácido aspártico e leucina), funcionando no processo de montagem tardia para liberar partículas virais da membrana plasmática. Contudo, a p9 do AIEV não é absolutamente necessária para a replicação do vírus, onde outras proteínas podem desempenhar parcialmente suas funções (Chen, 2001).

4.4.2. Gene Pol: proteínas Pr, RT, Int e dUTPase

A clivagem do gene *Pol* dá origem a quatro enzimas: a proteinase aspártica (Pr), uma transcriptase reversa (RT), uma integrase (Int) e a desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase). Assim como outros retrovírus, a sua estratégia de replicação depende da transcrição reversa das fitas de RNA pela ação da transcriptase reversa (RT) e integração do DNA sintetizado no DNA genômico da célula através da ação das integrases (Cook, 2013).

A maioria dos medicamentos inibidores anti-HIV atuam nas enzimas Pr, RT e Int codificadas pelo gene Pol (Cook, 2013). Em alguns lentivírus, como o HIV e o SIV, as dUTPases são ausentes. O AIEV codifica dUTPases, que hidrolisam o dUTP em dois produtos, o dUMP e o pirofosfato (PPi). O acúmulo das dUTPs pode proporcionar um ambiente hostil para a replicação do vírus, aumentando a propensão de erros (Hizi, 2015). Essa hidrólise capacita o vírus de infectar células não replicantes, como células fibroblásticas e linhagens de macrófagos e monócitos, pois estas células com baixos níveis de dNTPs e acúmulo de dUTPs, resultando em um ambiente hostil para a replicação viral e por isso, sendo enzimas essenciais para a viabilidade do vírus na célula. As DNA polimerases não conseguem distinguir entre timinas e uracilas e por isso, as dUTPases impedem o excesso de incorporação de uracilas, diminuindo a propensão de erros na replicação viral (Cook, 2013; Hizi, 2015).

4.4.3. Gene Env: glicoproteínas gp90 e gp45

O gene *Env* do AIEV, assim como em outros retrovírus, codifica uma poliproteína que posteriormente é clivada em glicoproteínas de envelope da superfície gp90 (SU) e proteínas transmembrana gp45 (TM), responsáveis pela interação entre os receptores da célula-alvo e início do processo de entrada do vírus na célula.

A gp90 (SU) atua na ligação ao receptor da célula hospedeira, o receptor 1 de lentivírus equino ELR-1 (um membro da família de proteínas receptoras do fator de necrose tumoral), com o sítio de ligação ao ELR-1 está localizado nos dois terços da porção C-terminal da gp90, enquanto possui um domínio de fusão de membrana na porção N-terminal (Cook, 2013). É uma proteína glicosilada, contendo duas sequências de codificação com mais de 17 sítios de N-glicosilação nas cepas patogênicas, e estas regiões estão sujeitas a alterações no curso da infecção. A gp90 tem um importante

papel no estabelecimento da infecção devido a capacidade de sofrer alterações na sua sequência genômica sem alterar sua função, e por isso, atua na resistência à neutralização do vírus (Chong, 1991; Craig, 2002). Apesar de ser o principal, não é considerado o único fator determinante no processo de neutralização dos anticorpos como resposta ao vírus (Leroux, 2004; Naves, 2015).

4.4.4. Proteínas acessórias Tat, Rev e S2

Em resposta aos fatores de restrição do hospedeiro, alguns retrovírus desenvolvem respostas a partir de quadros de leitura abertos (ORFs), codificando proteínas que atuam inibindo a ação destes fatores. As proteínas acessórias codificadas em ORFs são as proteínas transativadoras de transcrição (Tat), Rev, S2, tendo importantes papéis na persistência da infecção e na resposta aos fatores de restrição do hospedeiro (Cook, 2013).

A Tat atua aumentando a eficiência do alongamento da RNA polimerase II do hospedeiro a partir da formação de uma estrutura chamada de elemento de resposta da transativação (TAR) devido a interação da Tat com o RNA viral transcrito. O Tat do AIEV contribui para a restrição da infecção a espécie hospedeira, devido às interações da proteína que se restringem às espécies caninas e equinas (Cook, 2013). A proteína S2 é exclusiva do AIEV, sendo um importante fator de virulência *in vivo* (Cook, 2013). A proteína Rev é responsável pela exportação nuclear do RNA viral não processado, se ligando ao RNA viral por meio de um elemento específico de resposta ao Rev (RRE), sofrendo multimerização, e assim atravessando a membrana nuclear dependente de um sinal de exportação nuclear, sendo necessária a mediação da célula hospedeira via exportina para a exportação do RNA viral pela Rev (Cook, 2013).

4.4.5. Repetições Terminais Longas (LTRs)

As LTRs são sequências repetitivas de nucleotídeos, onde o comprimento das LTRs varia entre cepas, podendo ser de 306 a 323 pb, onde controle da transcrição é mediado principalmente pelas interações entre fatores celulares e os LTRs (Cook, 2013). Elas possuem diversos papéis na replicação do vírus que ainda não foram totalmente elucidados (Cook, 2013; Cook, 2019).

A identidade das sequências de Pr, da Transcriptase Reversa, de dUTPases e integrinas varia entre 80,4-84,6%, 79,8-83,2%, 80,0-90% e 85,3-85,7%, respectivamente. As variações genéticas destas sequências geralmente são ocasionadas por substituições de um único resíduo geralmente com alterações conservativas, diminuindo assim a variabilidade genética destas sequências. As dUTPases também são altamente conservadas, não só entre retrovírus, mas também em outras espécies como humanos ou *Escherichia coli*. A transcriptase reversa do AIEV, assim como ocorre em outros retrovírus, muitas vezes é responsável por erros de transcrição e que posteriormente não são corrigidos, dado que a replicação viral ocorre no citoplasma na ausência de DNA polimerase, responsável por corrigir e reparar erros neste processo. Devido a isso, cada transcrição reversa do RNA resulta em pelo menos uma mutação no genoma do vírus, aumentando a variabilidade genética do genoma viral (Dauter, 1999; Cook, 2013).

A gp90 é a principal proteína do AIEV que contém epítomos capazes de gerar anticorpos neutralizantes, e assim como a proteína gp120 do HIV, a gp90 possui um domínio neutralizante principal (PND), com dois dos três epítomos neutralizantes conhecidos (Cook, 2013; Issel, 2014). Devido a capacidade de deleção nas sequências do PND da proteína, o vírus é capaz de adquirir resistência à neutralização, através de variações que estão restritas a oito regiões hipervariáveis (Leroux, 2001; Issel, 2014).

A proteína Tat possui 75% de identidade compartilhada entre cepas, onde acredita-se que as substituições dos aminoácidos não afetam a conservação da sequência (Cook, 2013). A proteína S2, exclusiva do AIEV, não é conservada de forma homogênea entre cepas, onde o vírus AIEV_{WY} apresenta identidade de 24,8%, 54,4% e 38,7% com AIEV_{IRE}, AIEV_{LIA} e AIEV_{MIY} respectivamente, com porções conservadas na região das nucleoporinas. As sequências de Rev entre as quatro cepas sequenciadas variam de 68% a 73% de identidade entre as cepas, sendo o domínio N-terminal o de maior variação, com conservação total nos resíduos hidrofóbicos da proteína. As variações de aminoácidos na porção C-terminal de Rev sugerem que os grupos monofiléticos podem ter diferentes vias na replicação do vírus, onde estas variações implicam diretamente no processo de ligação do RNA viral (Cook, 2013; Issel, 2014). Ao mesmo tempo que as LTRs têm em média 80% de identidade entre as quatro sequências, onde suas variações estão em maior concentração na região U3; também contém sítios de adição de poli-A e o motivo *stem-loop domain*, ou *hairpin* (TAR), que também são conservados entre as cepas (Cook, 2013).

4.6. Resposta imune do hospedeiro e mecanismo de infecção

Animais infectados pelo AIEV desenvolvem resposta imune contra as gp90, gp45 e p26 (Cook, 2013). A resposta do hospedeiro contra p26 é, no entanto, significativamente menor que a resposta contra as proteínas gp90 e gp45 (Naves, 2015). Proteínas virais e vestígios do RNA genômico do vírus é facilmente encontrado em órgãos ricos em macrófagos, como baço, medula óssea, pulmões, fígado e nódulos linfáticos, além de proteínas virais em células epiteliais bronco-alveolares e células endoteliais (Cook, 2013). Estudos sugerem que a replicação *in vivo* pode acontecer em outras linhagens celulares, uma vez que já foi detectado material genético do AIE em células endoteliais de outros órgãos (Bueno, 2020).

O AIEV infecta linhagens de macrófagos e monócitos, sendo os principais alvos da infecção do vírus. No processo de infecção, o AIEV induz a ativação de linfócitos T CD8 citotóxicos, que mantêm baixos os níveis de replicação do vírus, e também induz a proliferação de linfócitos CD4 e CD8 de memória (Naves, 2015).

O mecanismo de infecção das células ainda não está totalmente elucidado, uma vez que modelos de células endoteliais *in vitro* ainda não apresentam-se como confiáveis na representação dos mecanismos *in vivo*. A cultura de macrófagos e monócitos é bastante difícil, e portanto geralmente são utilizadas linhagens de células dermais nos estudos *in vitro* devido sua cultura ser menos laboriosa (Wang, 2016; Bueno, 2020). Técnicas como hibridização *in situ* e PCR convencional possuem limitações para entender o funcionamento por trás da função das células endoteliais no processo de infecção do AIEV, por isso é necessário o desenvolvimento e utilização de outras técnicas, como a cultura de tecidos, para elucidar o envolvimento destas linhagens celulares na patogenicidade do vírus.

5. Estratégias e aplicações biotecnológicas

5.1. Caracterização do AIEV

As análises epidemiológicas e o desenvolvimento de vacinas e de técnicas de diagnóstico para AIEV ainda são grandes desafios, onde informações sobre a genética do vírus e sua variabilidade são fatores determinantes para o desenvolvimento de ferramentas de ampla aplicação. A ausência de evidências da recombinação ou mosaico entre as sequências das cepas sugerem fortemente que os isolados pertencem a grupos monofiléticos ou clados distintos, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento destas técnicas (Cook, 2019). Os processos de caracterização de isolados do vírus e a anotação de genomas são importantes para elucidar diversos mecanismos de ação e patogenicidade do vírus, bem como compreender sua filogenia e epidemiologia para o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas aplicáveis para o controle da disseminação da doença. Contudo, a maioria das sequências depositadas em bancos de dados e disponíveis na literatura contemplam apenas algumas regiões do vírus, e advém principalmente das cepas americanas e chinesas, já previamente caracterizadas (Cook, 2019).

5.1.1. Técnicas moleculares de análise e caracterização

5.1.1.1. Sequenciamento de Sanger

Estudos com base em técnicas moleculares, como a reação da cadeia polimerase (PCR) e o sequenciamento de Sanger, são importantes ferramentas para caracterizar o genoma de organismos, identificando assim a função dos genes e elementos de controle transcricional em diferentes cepas, além de permitir as análises filogenéticas e epidemiológicas com base na comparação de dados. A extensa diversidade genética do AIEV, a presença de motivos pouco elucidados no genoma do organismo e a alta taxa de mutação viral reforçam a necessidade da caracterização do genoma completo dos vírus isolados. Como no trabalho de Cervantes e colaboradores (2016), onde cavalos do Texas diagnosticados positivamente pelo teste IDGA foram utilizados para examinar o genoma e a filogenia do AIEV, foi aplicada a técnica de PCR

para amplificação das sequências de SU e de LTRs e o sequenciamento por Sanger foi realizado. As análises filogenéticas da região SU dos isolados, junto a sequências de outras localizações geográficas (China, Japão, Irlanda e outras regiões do EUA), identificou quatro ramos principais na distribuição geográfica do vírus, onde os isolados possuíam identidade de 91,9 e 99,9% com as demais sequências (Wang, 2016). Em 2017, Sharav e colaboradores, utilizaram *Nested* PCR para amplificar e caracterizar a prevalência do AIEV nas regiões endêmicas da Mongólia, que não haviam sido caracterizadas até o momento. A *Nested* PCR, ainda que tenha falhado na amplificação de oito das treze amostras, foi suficiente para sugerir que a reintrodução da doença no país veio do continente europeu, a partir da fronteira entre a Rússia e a Mongólia, dando suporte científico na escolha de estratégias de controle da entrada do país pela Europa (Sharav, 2017).

Contudo, o uso de técnicas moleculares como PCR convencional ou hibridização *in situ*, e até mesmo o método Sanger de sequenciamento para o estudo do AIEV é bastante limitado, considerando que não se tem conhecimento suficiente sobre a variabilidade genética do vírus, atrapalhando a identificação dos locais de interação do vírus com o hospedeiro para entender seus mecanismos de ação. A falta de conhecimento disponível sobre as variações genéticas também dificulta as análises da epidemiologia molecular do vírus, impossibilitando a amplificação de isolados de cepas (Cappelli, 2017; Sharav, 2017; Bueno, 2020). Técnicas como *long-range* PCR (ou PCR de longo alcance) se apresentam como uma alternativa a algumas das desvantagens da técnica de PCR convencional. A PCR de longo alcance pode ser usada para sequenciar regiões genômicas de um pequeno número de amostras, aumentando o tamanho dos *amplicons*, evitando assim a criação clones quiméricos (Jia, 2014; Cappelli, 2017). Concomitantemente ao uso de técnicas mais sensíveis para amplificar o genoma viral, as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) também vem ganhando destaque no sequenciamento do AIEV.

5.1.1.2. Sequenciamento por NGS

O primeiro trabalho a utilizar sequenciamento de nova geração para sequências de RNA viral e proviral do AIEV, Cappelli e colaboradores (2017), utilizaram a técnica de PCR de longo alcance aplicada com o método de sequenciamento Roche 454 para amplificar 95% do genoma proviral de dois equídeos do surto italiano de 2006, onde

foram identificados noventa polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), sendo 80% deles na região do gene *Env*, 13% nas LTRs e 6% na região do gene *Gag*. O Roche 454 utiliza o pirosequenciamento, a partir da detecção do pirofosfato que é liberado durante o processo de incorporação de nucleotídeos, lendo os sinais ópticos conforme são adicionadas as bases (Liu, 2012). A identidade de 99% entre os três isolados utilizados sugeriu que estes foram derivados de uma mesma fonte, mesmo que com localizações geográficas distintas, onde a maioria das mutações não eram sinônimos, sugerindo influência da pressão seletiva do hospedeiro no processo de mutação durante a replicação do vírus. Outro importante achado no trabalho foi que 56% das mutações ocorreram fora das oito regiões hipervariáveis, sugerindo que dependendo da cepa do vírus estas regiões podem diferir em número e/ou limite. A aplicação das técnicas de PCR de longo alcance combinada com NGS foram capazes de fornecer resultados mais precisos sobre as sequências do AIEV e com menos propensão a erros de montagem, quando comparado à amplificação por fragmentos curtos, além de possibilitar o entendimento das mutações em diferentes pontos no tempo, o que não seria possível a partir do sequenciamento por Sanger (Cappelli, 2017).

Posterior aos estudos de Cappelli, a utilização de *long-range* PCR com sequenciamento por NGS foi feita para caracterização molecular das principais ORFs, além dos motivos de controle transcricional conhecidos nas LTRs de isolados americanos por Cook e colaboradores (2019). As sequências foram comparadas com sequências da Ásia, Europa, América do Norte e uma cepa variante de fibroblastos. Foram feitas análises da possibilidade de recombinação ou mosaico entre as cepas do continente americano, incluindo os isolados entre si, pelo algoritmo SimPlot, uma ferramenta que permite analisar até dez sequências, onde estas são comparadas umas às outras ou a sequências fora da análise, em uma interface e ferramentas simples de utilizar (Racaniello, 2010). Neste trabalho, o sequenciamento foi feito por MiSeq da Illumina. Esta tecnologia é baseada na tecnologia de sequenciamento por síntese (SBS - do inglês *sequencing by synthesis*), onde são feitas leituras de 100-150 pb. O diferencial desta técnica aplicada ao AIEV é a velocidade dos dados analisados e a verificação de clones em uma única execução do sequenciamento, além de fazer a análise dos dados, fornecendo as informações do sequenciamento em tempo real (Liu, 2012; Ravi, 2018). Como desvantagens, o uso de PCR de longo alcance ainda amplifica um número pequeno de amostras devido sua baixa sensibilidade, além de ser

muitas vezes incompatível com *primers* depositados nos bancos de dados (Cappelli, 2017; Cook, 2019).

Dorey-Robinson e colaboradores (2019) utilizaram o sequenciamento Illumina MiSeq para a caracterização de isolados dos surtos da Inglaterra de 2010 e 2012, onde as análises do genoma completo de dois diferentes genomas indicaram que estes representam um novo grupo monofilético, diferindo entre 21,1% 25,5% das sequências disponíveis, expandindo os grupos monofiléticos de cepas inglesas de um para três. Análises anteriores por sequenciamento por Sanger para as amostras não foram bem sucedidas, mostrando que a tecnologia NGS é uma alternativa viável para quando as técnicas convencionais não apresentarem resultados. A utilização de métodos NGS para casos assintomáticos do vírus também foram mais bem sucedidas do que pelo sequenciamento convencional, uma vez que são técnicas mais sensíveis e os casos assintomáticos apresentam poucas cópias do genoma do vírus (revisado em Dorey-Robinson, 2019).

O trabalho de Deshiere e colaboradores (2019) foi o primeiro estudo a utilizar o sistema de enriquecimento de alvo SureSelect (Illumina) combinado ao sequenciamento por Illumina para caracterizar o DNA proviral do AIEV, onde foi utilizada as técnicas para o diagnóstico em cavalos assintomáticos no surto de 2014 na França. O método SureSelect captura os ácidos nucleicos alvos usando RNAs biotinilados ligadas a esferas complementares ao alvo, capturando assim as regiões alvo do DNA genômico, e posteriormente submetidos a sequenciamento por NGS. Essa tecnologia permite a detecção, diferentemente da maioria das técnicas baseadas em PCR, de amostras com baixas quantidades do vírus, sendo útil para as análises de amostras provenientes de animais assintomáticos. Além disso, o método SureSelect não requer iniciadores específicos, podendo ser utilizado então para sequências não totalmente conhecidas. Sem as etapas de clonagem e amplificação, foi possível a análise completa da sequência de DNA das amostras e analisar a relação filogenética e a variabilidade genômica dos isolados e comparar com outras 17 sequências. As amostras do surto francês já haviam sido caracterizadas por semi-nested PCR (snPCR), porém devido às altas mutações do vírus, a falta de *primers* universais para AIEV e as baixas cargas virais das amostras, o genoma completo não pode ser sequenciado por esta técnica (Gnirke, 2009; Dao, 2018; Deshiere, 2019). As técnicas de nested PCR e snPCR são consideradas as mais sensíveis para detectar RNA viral em baixas quantidades (Moreira, 2019). O posterior sequenciamento por Sanger no

trabalho permitiu identificar partes da sequência que não haviam sido identificadas por Illumina, como algumas regiões do gene *Env*, indicando a importância de uma análise posterior por outros métodos.

5.1.1.3. Caracterização estrutural do genoma do AIEV

A caracterização estrutural também pode revelar importantes informações conformacionais, como alterações em regiões que podem conferir perdas ou ganhos de estabilidade, funcionamento e/ou conservação de proteínas. Estes estudos também podem ser comparativos com sequências de outras cepas ou outros lentivírus, como o trabalho de Duan e colaboradores (2016), que analisou a conformação estrutural cristalina da glicoproteína gp45, uma proteína fusogênica que é responsável por mediar a fusão do vírus à célula hospedeira, comparada a glicoproteína muito similar gp41 do HIV (Checkley, 2011). Estas análises revelaram uma conformação estrutural diferentes na região proximal do peptídeo de fusão e na camada rica em asparagina entre as duas proteínas, e revelando também que a mutagênese dirigida ao local na gp45 do AIEV não afeta a replicação viral, o que não acontece com a gp41 do HIV. Indicando que o AIEV é ainda mais adaptável a mutações, podendo favorecer a evolução de quasispécies com mutações em gp45. As análises de estabilidade desta glicoproteína indicaram que sua transformação conformacional poderia resultar numa maior exposição de seus epítopos localizados no envelope celular, capaz de induzir anticorpos neutralizantes com mais eficácia (Duan, 2016).

Apesar da clara importância da caracterização de isolados provenientes de surtos, para entender a patogenia e distribuição do agente de forma global, ainda são realizados poucos estudos para a caracterização de isolados de surtos em diversos países endêmicos para o AIEV, como nos surtos relatados na América Central e do Sul e em diversas regiões da Europa entre 2016 e 2018, dificultando assim estas análises (OIE, 2018; Dorey-Robinson, 2019).

5.1.2. Importância da caracterização de isolados de AIEV

Uma das principais ferramentas eficazes no controle de doenças virais é o entendimento da filogenia do agente viral. As análises da variabilidade genética do vírus e sua distribuição geográfica, classificando-os filogeneticamente, são

fundamentais no desenvolvimento de métodos e protocolos de diagnóstico mais específicos, assim como o desenvolvimento de vacinas para o controle destes surtos. Apesar da importância da caracterização do genoma completo do vírus, diversos fatores limitantes das técnicas de caracterização fazem com que a grande maioria dos trabalhos publicados se concentrem nas mesmas regiões do genoma (Cook, 2019; Bueno, 2020).

As principais regiões caracterizadas do genoma do vírus pertencem ao gene *Gag*, região do genoma responsável por codificar a principal região homóloga (MHR - do inglês *major homology region*) na proteína p26, sendo a principal métrica utilizada para análises filogenéticas entre isolados (Cook, 2013; Bueno, 2020). Este gene representa menos de 18% do genoma total do vírus (Cook, 2019), reforçando a necessidade da caracterização de outras regiões como os genes *Pol* e *Env*, as ORFs e os LTRs, para elucidar a conservação e a variabilidade genética destes genes entre cepas e que possam estar envolvidos em processos de virulência e patogenicidade. Estudos da identidade genética do gene *Gag* entre sequências de isolados norte americanos e sequências de dados europeus e asiáticos (já caracterizados) feitos no trabalho de Cook e colaboradores (2019) mostraram uma identidade em média de 88,2% para a proteína p26, enquanto para a proteína p9 foi de 63,6%, sugerindo que as sequências que codificam para a p9 podem ter sofrido diferentes processos de mutação entre diferentes isolados; entre as cepas isoladas do estudo, as análises filogenéticas compreenderam como um único grupo monofilético. Neste mesmo trabalho, as análises do gene *Pol* mostraram ser o gene mais conservado em comparação a SU, TM e ORFs que codificam proteínas acessórias entre as mesmas cepas, o que já foi apresentado em outros estudos, já que codifica as enzimas do vírus.

Variações na glicoproteína de envelope (SU) do gene *Env* são importantes para entender a persistência e a virulência do vírus (Cook, 2019). A análise comparativa de amostras do surto de 2014 no trabalho de Deshiere (2019) sugeriram que as amostras não estão relacionadas a nenhum dos grupos monofiléticos caracterizados, reforçando a importância do rastreamento filogenético das cepas de surtos. Este rastreamento permite que seja possível analisar e compreender as diferentes vias de contaminação.

A presença de quasispécies também é uma característica do AIEV e de outros lentivírus e outros vírus de RNA devido suas altas taxas de mutação, gerando um grande número de genomas variantes em um mesmo isolado, o que pode ser identificado pela caracterização de amostras isoladas. O termo quasispécie é utilizado

para classificar cópias de uma molécula replicante que foi produzida a partir de mutações, e que são capazes de popular alguma linhagem celular ou indivíduo, onde estas distribuições de genomas não idênticos possuem contínuos processos de variação genética, competindo entre si naquela população hospedeira e sofrendo efeitos dos processos de seleção (Liu, 2019).

A teoria das quasispécies não inclui somente mutações como fonte da variabilidade genética entre as cepas, mas também podendo ocorrer outros processos, como recombinação ou duplicação de genes, embora ainda não existam estudos que objetivam analisar a ocorrência destes processos no AIEV (Cook, 2019; Liu, 2019). A amplificação de sequências do vírus a partir de amostras *in vivo* muitas vezes incluem a presença das quasispécies, dificultando as análises moleculares destas sequências e posterior montagens *in silico* (Cook, 2019). Para elucidar mutações presentes no vírus que estejam envolvidas na evolução de quasispécies do vírus e na sua patogênese, o sequenciamento do gene *Env* por *Nested* PCR, qPCR (PCR quantitativo em tempo real) e por amplificação de genoma único (SGA - do inglês *Single Genome Amplification*) foi realizado para o gene *Env* por Liu e colaboradores (2019), identificando regiões de mutações que estivessem diretamente associadas à atenuação do vírus, onde foi descrito que mutações de perda da virulência ocorrem de forma evolutiva. Foram identificados padrões na perda evolutiva da virulência, com inserções e deleções em diferentes frequências e locais de mutação, com um gradual aumento da mutação entre as passagens. A técnica SGA, em comparação a PCR em tempo real, pode evitar eventos de recombinação induzidos pela polimerase e detectar melhor as mudanças de nucleotídeos, detectando melhor as mutações.

A caracterização do AIEV também é utilizada para a análise de mutações, inserções e deleções no genoma, que podem ou não comprometer a integridade do vírus e sua capacidade de replicação ou garantir vantagens patogênicas àquela cepa/quasispécie (Cook, 2019). Acredita-se que as mutações do AIEV em resposta à pressão seletiva do sistema imune sejam parcialmente responsáveis pelas mudanças no tropismo do AIEV, onde estas mutações resultam na capacidade do vírus de infectar outras células *in vivo* além de monócitos e macrófagos, uma característica já bem descrita em outros lentivírus, como o SIV e o HIV (Bueno, 2020). Esta pressão seletiva atua principalmente sob as proteínas codificadas nas regiões do gene *Env* do vírus, onde estas são capazes de suportar substituições de aminoácidos sem alterar suas

funções metabólicas de forma significativa, permitindo assim a replicação do vírus (Cappelli, 2017).

A caracterização de regiões hipervariáveis fornece importantes informações sobre os mecanismos de escape do sistema imune do vírus, podendo ser limitador na amplificação de sequências por métodos baseados em *primers*, no desenvolvimento de vacinas e classificação em clados, tendo proteínas com estas regiões como alvo. As modificações antigênicas no gene *Env* responsáveis por codificar a glicoproteína Gp90 nestas regiões de superfície são altamente variáveis, sendo sua maioria alvos dos anticorpos neutralizantes (Cervantes, 2016), também já apresentando ser associados a quadros febris em equídeos (Cappelli, 2017). No entanto, as análises dos domínios hipervariantes no trabalho de Cook (2019) sugerem que é necessário estender os limites de algumas destas regiões. A identidade destas regiões em cepas norte-americanas neste trabalho foi de 70,5%, um valor considerado baixo para a utilização da Gp90 como potencial alvo vacinal (Craig, 2014; Cook, 2019).

Baseados em estudos da integração do AIEV e do HIV-1 no genoma, células dérmicas de equinos (FED) foram utilizadas para mapear os sítios de integração do genoma da cepa durante infecções *in vitro*, mostrando que o vírus tende a se integrar em genes e regiões ricas em adenina e timina e evita a integração no início de transcrições, como já esperado para o vírus (Liu, 2015). Entretanto, também foi mostrado que o AIEV favorece os elementos intercalados longos (LINEs) e os transposons no genoma do cavalo, diferentemente do HIV-1, e podendo inclusive ter relação com o estado de latência do vírus no animal e/ou contribuindo para a característica assintomática na maioria dos animais portadores da doença a longo prazo (Liu, 2015). Estudos para examinar o genoma do AIEV em isolados do Texas utilizaram dois clones, um deles obtido é permissível para células de rim fetal equino (FEK), com sequências de *Env* e LTRs distintas entre si (Cervantes, 2016). Células fibroblásticas dérmicas equinas (ED) também podem ser usadas para amplificar sequências virais. Contudo, um alto número de passagens pode adaptar o vírus à célula, aumentando o viés para análises filogenéticas, estudos de variabilidade genética e mutações do vírus (Deshiere, 2019).

O estudo de clones virais em culturas celulares após sucessivas replicações também dificulta a análise total das sequências, como no trabalho de Cervantes (2016) cujo as sequências das amostras utilizadas divergiram em pelo menos um aminoácido dos estoques originalmente clonados.

No trabalho de Bueno e colaboradores (2020), foi feito o desenvolvimento de um ensaio de imunohistoquímica para a detecção de antígenos do AIEV para compreender o tropismo tecidual do vírus nos processos de infecção. Para tanto, foi realizada a extração do DNA proviral, que foi submetido a PCR e posterior uma *Nested* PCR, com primers para o gene *Env* do AIEV, e então sequenciados pela técnica de sequenciamento de Sanger. Neste trabalho, foi identificada a presença de proteínas virais não apenas nas células da polpa vermelha do baço e sinusóides hepáticos, mas também ser identificadas em células epiteliais dos pulmões e nos túbulos proximais e distais dos rins. A detecção do RNA viral nestes órgãos indicou replicação ativa do vírus nestes tecidos, o que poderia indicar que o vírus não só é capaz de infectar outras linhagens celulares, como possuir também possuir outras rotas de transmissão, através de secreções oronasais ou pela urina. Esta característica já foi observada em outros lentivírus, como o vírus Maedi Visna (MV) e o vírus da artrite encefalite caprina (CAE), lentivírus que acometem pequenos ruminantes (Bueno, 2020). Apesar da detecção feita com soro anti-AIEV para as análises imunohistoquímicas, geralmente são relatados na literatura a utilização de soros hiperimunes de coelhos ou hibridomas, que costumam apresentar marcação mais forte que o apresentado. Apenas foi possível as análises das amostras armazenadas pelo reagente RNAlater, enquanto as amostras armazenadas em formalina a 10% não apresentaram amplificação, posto que o formaldeído (principal componente da formalina) promove a fragmentação dos ácidos nucleicos (Bueno, 2020).

5.2. Diagnóstico de AIEV

5.2.1. Técnicas de diagnóstico adotadas no Brasil e no mundo

No Brasil, a Instrução Normativa nº 45 de 2004, que definiam as normas para o controle da anemia infecciosa equina até 2014, onde o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) era a principal medida adotada para o diagnóstico da doença no país. Foi apenas em 2014 com a portaria nº 378 emitida pela Secretaria de Defesa Agropecuária indica a utilização do teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) além do teste de IDGA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina, onde amostras positivas para teste de ELISA serão submetidas ao teste de IDGA. A OIE (2018) é a responsável por determinar as diretrizes para o diagnóstico e controle da AIEV, onde é

recomendado o teste IDGA como método de diagnóstico. A inclusão do teste de imunoabsorção enzimática também é recomendado pela organização, onde a sensibilidade do teste de ELISA combinado a especificidade do teste IDGA na combinação das duas técnicas é o método mais frequente de diagnóstico utilizado (revisado em Espasandin, 2021).

A identificação pelo teste de imunodifusão em ágar (IDGA), também chamado de teste de Coggins, foi desenvolvido em 1970 por Coggins e Norcross e constitui o padrão ouro para o diagnóstico do AIEV, sendo um teste barato, de fácil execução e altamente específico (Coggins, 1970). Apesar disso, sua sensibilidade ainda é menor que de outros testes comerciais, tornando assim necessária a utilização conjunta do teste de ELISA, permitindo uma maior sensibilidade na detecção. A utilização somente do ELISA está sujeita a falsos resultados positivos, reforçando a importância da utilização conjunta dos dois testes para o diagnóstico do AIEV (Alvarez, 2015). A inclusão de um ensaio de western blot posterior ao ELISA E IDGA tem sido proposta também como confirmatória, caso ocorra divergências entre os primeiros testes (Fontes, 2018; Espasadin, 2021).

O desempenho de dois testes comerciais de ELISA para a detecção de anticorpos contra AIEV foram avaliados no trabalho de Alvarez (2015), onde foi demonstrada uma maior sensibilidade pelos testes de ELISA quando comparados ao IDGA. A comparação entre os testes comerciais mostrou que o ELISA que identificava anticorpos para gp90, gp45 e p26 resultou em um número maior de amostras positivas que o teste que identifica apenas a proteína p26. A comparação entre testes de ELISA comerciais também foi feita por Nardini (2017), identificando que todos os seis kits utilizados eram considerados adequados para o diagnóstico de AIEV devido à sua alta sensibilidade.

5.2.2. Desenvolvimento, avaliação e caracterização de testes de diagnóstico para AIEV

O *Italian National Reference Center for Equine Infectious Anemia* (CRAIE, Itália) desenvolveu um ensaio ELISA por competição com a proteína p26 recombinante, onde foram avaliados seus valores de sensibilidade analítica e especificidade analítica absoluta, validando esta técnica para a detecção de anticorpos para o diagnóstico do vírus. Comparado ao teste de IDGA, o ELISA por competição usa quantidades

menores de reagentes, tem fácil padronização, em um menor tempo de resposta (Nardini, 2016). No trabalho de Costa e colaboradores, (2016) foi desenvolvido um ensaio de fluxo lateral (LFA - do inglês *lateral flow assay*) duplex para a detecção de anticorpos contra AIEV e AHSV (do inglês *African Horse Sickness*), onde foi utilizada a proteína p26 recombinante expressa em *Escherichia coli* para o diagnóstico de AIEV. O teste LFA duplex consiste em duas membranas sobrepostas, onde o teste baseado na detecção da amostra de interesse, que se move capilarmente pela tira, migrando para a zona de detecção da amostra, onde este resulta em uma linha de teste positivo quando positivo, além de uma linha de controle indicando a qualidade do teste feito. O teste é feito em um dispositivo rápido, conferindo o resultado em minutos (Koczula, 2016). É considerado significativamente rápido, de baixo custo (quando comparado a técnicas sorológicas e moleculares mais complexas), contudo, a sensibilidade do teste ainda se mostrou menor que os testes de ELISA e IDGA. Algumas amostras positivas por IDGA não foram detectadas por LFA duplex, sugerindo que é necessário ajustes na concentração da proteína p26 e o teste em um maior número de amostras.

A comparação dos protocolos comerciais para IDGA japonês e o descrito pela OIE foram feitos por Nemoto e colaboradores (2018), concluindo que não houve diferença significativa entre os dois protocolos. Entretanto, o resultado do trabalho sugeriu que o protocolo da OIE é mais fácil de ser executado, por apresentar menor frequência de reações específicas (onde diferem entre si na concentração de ágar e a composição dos tampões). Algumas das amostras deram resultados inconclusivos em ambos dos protocolos, reforçando a necessidade da utilização do IDGA junto a outros testes. Espasandin e colaboradores (2021) fizeram a comparação do teste de ELISA por competição e o teste de polarização fluorescente (FPA) com o teste padrão IDGA para o diagnóstico sorológico de AIEV para cavalos da Argentina. O teste de ELISA por competição tem um valor de leitura inversamente proporcional, e por isso é utilizado principalmente quando o alvo é pequeno ou possui poucos epítomos. A FPA é uma técnica de diagnóstico considerada rápida e possui alta sensibilidade e especificidade. Os resultados do trabalho mostraram que a técnica de FPA tiveram melhores resultados de sensibilidade e especificidade que a técnica cELISA, quando comparadas ao teste de IDGA, sendo proposta como um teste que poderá ser validado para o diagnóstico da infecção. Até o presente momento, não foram encontrados outros trabalhos que objetivem a validação desta técnica posterior a este trabalho como alternativa ao atual diagnóstico.

Estudos que objetivam a expressão e a identificação dos epítomos presentes nos antígenos do vírus para fins diagnósticos também se apresentam como uma boa fonte de análises para elucidar a capacidade reativa dos antígenos contra os soros equinos. Na tese de Naves (Naves, 2015), foi realizada a busca por epítomos localizados no gene *Env* nas regiões que codificam as proteínas Gp90 e Gp45, onde foi identificadas regiões antigênicas após o mapeamento de regiões conservadas da proteína. O uso apenas da proteína p26 nos testes de ELISA e IDGA diminuem a sensibilidade do diagnóstico, e por isso, estudos para a utilização de mais de uma proteína como antígeno devem ser feitos. Em Fontes e colaboradores (2018), a expressão do gene p26 do AIEV otimizado e fundido a proteína de ligação à maltose (MBP - do inglês *maltose-binding protein*) foi expresso em *E. coli* para ser utilizado como um antígeno para os testes de IDGA e ELISA. A MPB aumenta a solubilidade da proteína, melhorando sua estabilidade e rendimento (Fontes, 2018). Os resultados de expressão do trabalho foram positivos, com a expressão de um antígeno recombinante de alta estabilidade quando armazenado a 4° C.

O trabalho de Hu e colaboradores (2016) foi o primeiro trabalho que identificou um anticorpo monoclonal de amplo espectro contra a proteína p26 do AIEV, fornecendo uma base para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico para anemia infecciosa equina, a partir do desenvolvimento de um teste de ELISA de captura de antígeno (ELISA-AC) para a proteína p26 do vírus. Anticorpos de amplo espectro possuem a capacidade de reconhecer diferentes cepas de um mesmo vírus, sendo excelentes alvos para testes de diagnóstico (Khanh, 2019). Foi realizado o mapeamento dos epítomos lineares, identificadas as reações cruzadas, confeccionadas as proteínas recombinantes e expressas em células procariontes e eucariontes, e posteriormente analisadas por *western blotting* e ELISA-AC para determinar a reatividade dos anticorpos monoclonais contra os antígenos. Dois epítomos de células B foram localizados onde um deles poderia indicar ser um epítomo comum de anticorpos contra AIEV e sendo relativamente conservado entre diferentes cepas, onde algumas substituições não mostraram inibir a ligação antígeno-anticorpo. A caracterização destes anticorpos é feita geralmente pelo mapeamento dos epítomos antigênicos na proteína de interesse, por técnicas como a síntese manual dos peptídeos, ou com a utilização de fagos (Hu, 2016).

Nos trabalhos de Scicluna e colaboradores (2018, 2019), objetivou-se a validação de um teste de ELISA indireto com uma proteína quimérica recombinante dos

genes *Gag* e *Env* e um teste de imunoblot para as proteínas p26, gp45 e gp90 para confirmação de AIEV, com o objetivo de diagnosticar os casos de AIEV pelos métodos de ELISA com triagem, IDGA como confirmatório e o teste de imunoblot como confirmatório em resultados discordantes. O teste de ELISA desenvolvido foi capaz de detectar as infecções, identificando com mais precisão a infecção do que com a utilização apenas do teste IDGA (Scicluna, 2018). O uso de testes de imunoblot ainda não é um teste confirmatório na Itália, mas a utilização dele auxilia na detecção precoce de casos. Este foi o primeiro trabalho publicado objetivando a validação do teste de imunoblot para diagnóstico de AIEV, detectando três antígenos do vírus (Scicluna, 2019). Em consequência disso, são necessários novos trabalhos que validem a qualidade da utilização dessa técnica como teste confirmatório.

5.3. Vacinação para AIEV

A vacinação é o método mais eficaz para controlar a disseminação de doenças infecciosas, onde para tanto, é necessário elucidar os métodos de infecção, os mecanismos de ação e os genes envolvidos na imunogenicidade e escape do sistema imune do vírus. Vacinas atenuadas são uma ferramenta muito útil de estudo para o controle de doenças lentivirais, uma vez que estas exibem características fundamentais para o reconhecimento do sistema imune, entretanto a integração do genoma do organismo e as altas mutações associadas a essa subfamília viral ainda limitam o desenvolvimento de vacinas eficazes (Craig, 2015; Wang, 2016).

Apesar das dificuldades no desenvolvimento de uma vacina efetiva globalmente para a anemia infecciosa equina, o AIEV foi o primeiro lentivírus para o qual foi desenvolvida uma vacina considerada efetiva contra a infecção e transmissão da doença (Wang, 2016). Foi utilizada uma cepa altamente letal desenvolvida após diversas passagens de um isolado de AIEV, posteriormente feitas passagens em asnos, e então foi aclimatada para o cultivo celular em macrófagos derivados de monócitos de asnos primários onde as passagens resultaram na atenuação da cepa viral, e por fim a cepa foi adaptada para células FDD (do inglês *fetal donkey dermal*) para diminuir custos de produção. Esta cepa atenuada foi utilizada para vacinar dezenas de milhões de cavalos e mulas entre 1975 e 1990 na China, sendo a primeira vacinação do AIEV para o controle da doença. Essa vacinação serviu como base de

estudos para elucidar importantes características virais que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina universal para AIEV (Wang, 2016).

Nos estudos de Wang e colaboradores (2016) foram feitas análises para identificar as características genômicas envolvidas nos processos evolutivos do vírus, a partir das cepas originadas das diferentes etapas de atenuação do clone viral. Para analisar as variantes no genoma do vírus e seus envoltórios na evolução e atenuação da vacina, foram utilizadas 65 sequências completas de cepas para identificar estes processos. As análises identificaram que a maior parte das mutações ocorreram nas regiões das LTRs e no gene *Env*, com uma taxa média de mutação entre os genomas de 2%. Das proteínas codificadas, a que apresentou maior variação foi a proteína S2, seguida pela glicoproteína de superfície Gp90 e depois pelo gene *Rev*. As análises filogenéticas da evolução das cepas mostraram que a evolução do vírus foi bastante gradual quando cultivados em um mesmo ambiente, onde a mudança no organismo hospedeiro foi essencial para a evolução da variabilidade entre as cepas, indicando que é necessário não só o acúmulo das mutações seletivas entre as passagens, mas principalmente a mudança no ambiente do crescimento viral para estimular a atenuação do vírus durante seu comportamento evolutivo. Nas análises filogenéticas foram observados padrões evolutivos, como um agrupamento das sequências do gene *Env*, evoluindo de forma semelhante ao resto do genoma viral e uma separação na distribuição das sequências do gene *Pol*, agrupados entre cepas atenuadas e virulentas. Diferentemente de *Env* e *Pol*, as sequências de *Gag* e das LTRs foram divididas em diferentes ramos filogenéticos, principalmente devido aos diferentes ambientes de crescimento das cepas (em cavalos, asnos e células FDD). Para as proteínas acessórias *Tat* e *Rev*, não foram identificados padrões de distribuição das sequências em diferentes ambientes de crescimento. Estas informações sugerem que o gene *Env* pode desempenhar importantes papéis na atenuação da patogenicidade do vírus (Wang, 2016).

As mutações dos genes também foram identificadas de Wang (2016), onde as sequências das LTRs possuíam um maior número de inserções, deleções e substituições, principalmente nas regiões do elemento de regulação negativa (NRE) e na região potenciadora (EHR). A sequência E box, uma sequência palindrômica encontrada nas LTRs de alguns lentivírus, é responsável por regular funções no processo de transcrição do RNA, porém eles só foram identificados nas cepas adaptadas a cultura celular do AIEV, sendo ausentes nas cepas *in vivo*, diminuindo

assim a transcrição do provírus. As cepas também exibiram uma diminuição nos sítios de glicosilação da Gp90 com o aumento das passagens, onde todas as cepas adaptadas à cultura tinham perdido pelo menos um sítio de glicosilação, levando a um maior reconhecimento do sistema imune devido a possível exposição de um maior número de epítomos (Terme, 2009; Wang, 2016). As análises de mutações nos sítios de N-glicosilação da proteína Gp90 das cepas da vacina chinesa também foram avaliadas, onde foi feita a comparação com o gene *Env* virulento com as cepas atenuadas da vacina, onde as substituições e deleções de aminoácidos resultaram na perda de três potenciais sítios de glicosilação, aumentando assim a resistência da glicoproteína aos anticorpos neutralizantes (Han, 2016). Ainda são necessários mais estudos sobre o papel das substituições e deleções dos aminoácidos na sensibilidade da neutralização, para fornecer mais informações sobre os mecanismos de escape do sistema imune do vírus.

A alta variabilidade genética do gene *Env* da vacina chinesa e sua relação com a capacidade de proteção da vacina foi avaliado recentemente no trabalho de Lin e colaboradores (2020), sugerindo que a diversidade genética do gene pode ter relação direta com a proteção da vacina, devido às manifestações clínicas, identificação de anticorpos anti-*Env* e taxas de proteção diretamente relacionadas a diversidade da vacina em diferentes grupos de cavalos infectados. As análises estatísticas também revelaram uma correlação direta entre a extensão da diversidade genética do gene com a proteção contra o desafio do vírus virulento, onde o aumento da diversidade aumenta a resposta imune humoral do hospedeiro. Estes resultados demonstram que vacinas baseadas na variabilidade do gene *Env* são uma alternativa para os estudos e desenvolvimento de vacinas contra o vírus, sendo uma alternativa à utilização de regiões do gene *Gag* para o desenvolvimento de vacinas. O trabalho de Lin reforça a necessidade da caracterização do gene *Env* de diferentes isolados, que devem ser feitos para determinar com clareza as variações genéticas e epítomos presentes em cepas e quasispécies geograficamente distintas no desenvolvimento de vacinas baseadas no gene *Env*.

Anteriormente, Craigo e colaboradores (2015) avaliaram a eficácia dos imunógenos do gene *Env* em um modelo de vacina atenuada para AIEV, a partir da comparação das sequências ancestrais do gene *Env* com uma sequência consenso previamente desenvolvida e avaliada. O estudo mostrou pela primeira vez que o gene *Env* consenso, inserido em um esqueleto viral atenuado, foi competente para

replicação e foi capaz de induzir uma resposta protetora contra o desafio ao vírus. Contudo, a resposta imune não foi tão alta quando comparada com cepas ancestrais ou vacinas polivalentes. A identificação de imunógenos centralizados para o desenvolvimento de vacinas é uma importante estratégia para o desenvolvimento de vacinas polivalentes, uma vez que a maioria dos estudos de vacinas lentivirais, incluindo o AIEV, utilizam de desafios com cepas únicas nos testes, o que pode aumentar o viés da capacidade de proteção da vacina.

Para elucidar as características biológicas dos efeitos causados pela vacina modelo, estudos sobre os efeitos histopatológicos da cepa vacinal chinesa foram feitos por Liu (2016) para identificar se a replicação da cepa vacinal pode ocasionar o desenvolvimento de lesões nos órgãos-alvo. Os resultados do estudo mostraram que as cepas vacinais não causaram alterações histopatológicas detectáveis, além de estimular citocinas pró inflamatórias e quimiocinas no baço. Várias citocinas foram associadas à capacidade de proliferação da cepa patogênica e do desenvolvimento de lesões causadas pelas respostas imunológicas ao vírus, como a interleucina 6 (IL-6) e a IFN- α . O aumento da expressão de IFN- α pela cepa vacinal também pode sugerir que ele esteja relacionado com a diminuição das lesões associadas à inflamação causada pela vacina, em comparação com a cepa virulenta. A diferença na patogenicidade do vírus e capacidade de causar lesões teciduais foi significativamente determinada pela capacidade de replicação do vírus, onde o vírus atenuado não foi capaz de exibir lesões patológicas significativas, em contraste dos cavalos infectados com a cepa patogênica parental, que apresentaram hemorragias, necroses e hiperemia em múltiplos órgãos (Liu, 2016).

O estudo dos processos de integração viral das cepas vacinais de AIEV ao genoma hospedeiro também foi estudado por Liu (2017), foram analisadas as características e preferências envolvidas na integração das cepas vacinais em células MDM *in vitro*. O sequenciamento do genoma das células hospedeiras mostrou que os genes virais possuem preferências na integração ao genoma, como regiões ricas em íntrons, conteúdo AT, transposons e a presença de LINEs, onde a preferência dos sítios de integração não mudou entre as cepas com tropismo por macrófagos ou por fibroblastos, o que foi concordante com trabalhos anteriormente publicados (Liu, 2015). Neste estudo foi mostrado que a topologia da cromatina e sua estrutura também influenciam diretamente a integração do genoma viral.

Não existem vacinas disponíveis contra AIEV no mercado, uma vez que o vírus apresenta uma alta variabilidade genética e a resposta imune do hospedeiro ao vírus ainda não é totalmente elucidada. Contudo, ensaios de vacinação já foram feitos para o controle da disseminação viral em regiões endêmicas para diminuir a prevalência da doença. O aperfeiçoamento das técnicas de controle e diagnóstico, como o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade e métodos de tratamento são a principal ferramenta de pesquisa para diminuir a disseminação da AIEV na maioria dos países com prevalência da doença, onde o conhecimento e aplicação de técnicas biotecnológicas se apresenta como principal ferramenta no desenvolvimento de novos produtos e processos. A diversidade mundial de técnicas e métodos utilizados e sendo desenvolvidos também se apresenta como um fator limitante no entendimento e escolha das abordagens mais efetivas para o controle da doença. Além disso, novas compreensões sobre a variabilidade genética do vírus, as respostas imunológicas e a caracterização de isolados de cepas fornecem informações para elucidar importantes mecanismos de virulência e patogenicidade e que podem auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens para o controle da doença (Bueno, 2020).

5.4. Modelos de estudo para AIEV

Sistemas de propagação *in vitro* que sejam capazes de conferir resultados confiáveis ainda se apresentam como um desafio para elucidar os processos de patogenicidade, virulência e persistência do AIEV em diferentes linhagens celulares (Cook, 2019). Já é descrito na literatura que algumas cepas de AIEV são capazes de se replicar *in vitro* em outras linhagens celulares, como fibroblastos equinos, o que pode ser uma ferramenta para o estudo da patogênese do vírus (Klevejer-anderson, 1979). As LTRs têm importantes papéis funcionais na replicação do AIEV em fibroblastos ou macrófagos em culturas celulares (Payne, 2004; Hizi, 2015). O desenvolvimento da doença de forma aguda em equídeos foi associado a LTRs com sequências específicas, onde em fibroblastos estas LTRs não possuem um bom funcionamento. Entretanto, ainda são necessários mais estudos sobre quais regiões são importantes fatores que determinam o tropismo do vírus (Payne, 2004; Bueno, 2020).

A utilização de células fibroblásticas permitiram identificar em experimentos uma extensa conservação, embora com algumas exceções, de vários motivos estruturais e funcionais no gene *Gag*, a proteína p15, responsável por direcionar a poliproteína *Gag* para a membrana celular durante o processo de montagem da partícula viral (Cook, 2019). Os processos de desenvolvimento de vacinas atenuadas também necessitam do cultivo do vírus em modelos celulares, como apresentado no trabalho de Wang e colaboradores (2016), onde mutações nas sequências gênicas do vírus podem acarretar na perda de funções de regiões ou locais, como a diminuição dos sítios de N-glicosilação da proteína Gp90 durante as passagens *in vitro*.

Métodos estatísticos e matemáticos também podem ser ferramentas para elucidar os mecanismos de transmissão viral, em alternativa a utilização de culturas celulares. A capacidade e proporção de transmissão do vírus por transferência célula a célula ainda não é totalmente elucidada, portanto Allen e Schwartz (2015) investigaram a dinâmica celular e avaliar o papel da transmissão do vírus durante a infecção usando um sistema matemático chamado sistema de equações diferenciais ordinárias (ODE) e o modelo de Markov. O estudo indicou que a evolução para um estado assintomático aparenta depender de forma significativa da transmissão célula-célula, podendo ser um fator crucial na pressão seletiva de cepas no organismo hospedeiro. Por isso, a eliminação da infecção também depende dessa interação célula-célula, podendo ser utilizados mecanismos de escape do sistema imune pelo vírus a partir do bloqueio da transmissão, como acontece no HIV-1.

5.5. Tratamento para AIEV

O controle da anemia infecciosa equina é feito principalmente pelo diagnóstico e monitoramento das infecções (Bueno, 2020). Estudos que objetivem desenvolver métodos para tratamento da doença a fim de manter a saúde e qualidade de vida do animal são escassos, uma vez que é necessário o isolamento e eutanásia do animal infectado como medida de controle para a doença (Cook, 2019). A utilização de medicamentos imunossupressores para o tratamento da doença foi visto no trabalho de Kono e colaboradores (1976). Contudo, não existem estudos recentes ou métodos eficazes para o tratamento da AIE, devido ao animal tratado permanecer como um portador inaparente, contribuindo para a disseminação do vírus e por isso, dificulta a utilização de métodos de tratamento (Kono, 1975; Cook, 2013; Bueno, 2020).

6. Perspectivas sobre o uso da biotecnologia aplicada ao AIEV

6.1. Perspectivas para a caracterização do vírus

A utilização de técnicas de sequenciamento e amplificação de genomas fornecem importantes informações que podem elucidar os mecanismos de virulência e patogenicidade de organismos. O método de Sanger ainda é considerado padrão ouro para o sequenciamento de genomas e é o principal método recomendado para AIEV, devido ao menor custo, automação e aperfeiçoamento da técnica, como a adição de fluoróforos, permitindo a diferenciação na incorporação de nucleotídeos em um único processo. Além disso, este método ainda é capaz de identificar as sequências de nucleotídeos com uma precisão considerada alta, e por isso, é o principal método atualmente utilizado para sequenciar o genoma do AIEV. Contudo, a tecnologia de sequenciamento por Sanger depende da amplificação dos isolados por técnicas como PCR, e por isso depende da utilização de *primers* conhecidos da sequência, o que dificulta esse método para isolados de genomas desconhecidos (Sharav, 2017; Slatko, 2019; Bueno, 2020).

As técnicas de sequenciamento por NGS surgiram então como uma alternativa ao método de Sanger para caracterizar o genoma de isolados de AIEV. A tecnologia de pirosequenciamento 454, também conhecida como Roche 454, foi o primeiro método NGS de segunda geração a ser usado comercialmente. Esta técnica possui menos erros de substituição que o sequenciamento por Sanger, visto que cada etapa de incorporação dos nucleotídeos é mais específica e depende da liberação do pirofosfato e da detecção de luz para identificar o nucleotídeo incorporado, e é uma técnica recomendada para o sequenciamento de genomas virais e análises metagenômicas. Entretanto, o Roche 454 ainda pode apresentar problemas em interpretar sequências homopoliméricas (sequências de nucleotídeos repetidos), ocasionando erros como inserções e deleções de bases (Mardis, 2008; Shendure, 2008; Slatko, 2019). O sequenciamento por Illumina é um método de segunda geração que surgiu posteriormente ao pirosequenciamento, sendo uma técnica de alto rendimento e precisão, podendo usar uma quantidade pequena de amostra e reduzindo significativamente o tempo de execução da técnica quando comparada ao sequenciamento por Sanger. Outra vantagem da técnica é sua capacidade de identificar sequências em regiões homopoliméricas, com um desempenho melhor que a

Roche 474 nestas regiões. Apesar das vantagens da técnica, erros de substituição causados pelos ruídos durante os ciclos podem acontecer mais frequentemente, além de possíveis interações com proteínas que podem diminuir a eficácia das reações (Ari, 2016; Slatko, 2019). Mesmo com essas desvantagens, o sequenciamento por Illumina é o método mais promissor para a caracterização do genoma do AIEV, onde a plataforma MiSeq apresenta-se como a melhor alternativa para o vírus, devido seu comprimento de leitura ser aplicável a genomas curtos (Seifi, 2017).

Outras técnicas de sequenciamento por NGS podem fornecer novas informações e/ou servir como ferramentas para limitações do sequenciamento de segunda geração. Sistemas de sequenciamento de molécula única (SMS - do inglês *single-molecule sequencing*), como HeliScope (Helicos Biosciences) ou Nanopore (Oxford Nanopore Technologies), apresentam uma principal vantagem para o sequenciamento de isolados de AIEV, devido à ausência da etapa de amplificação da amostra biológica. A utilização de sequenciadores SMS portáteis também permite a análises de amostras em regiões de difícil acesso e em tempo real, como na vigilância dos surtos de Zika vírus utilizando Nanopore, o que pode ser uma alternativa para o sequenciamento do AIEV (Faria, 2016; Ari, 2016; Leggett, 2017; Seifi, 2017). Até o presente momento, nenhum trabalho publicado utilizou métodos de sequenciamento de quarta geração para caracterizar isolados de AIEV.

6.2. Perspectivas para o diagnóstico, vacinação e controle do AIEV

A maioria das medidas de controle da disseminação do vírus é através do diagnóstico e isolamento ou eutanásia de animais contaminados (Bueno, 2020). A principal metodologia adotada é através da triagem por ELISA e posterior confirmação pelo teste de IDGA, segundo as recomendações da OIE. A necessidade da utilização de ambos os testes é devido a maior sensibilidade quando utilizado em conjunto, evitando reações cruzadas que possam resultar em falsos resultados. A inclusão de um ensaio de *western blotting* como teste confirmatório também é recomendado para casos de divergência de resultados entre IDGA e ELISA, sendo um teste de alta especificidade e sensibilidade (Espasandin, 2021). A principal proteína utilizada nos testes é a p26, contudo as análises de regiões conservadas a partir dos estudos de caracterização de isolados são essenciais para desvendar possíveis regiões gênicas que possam ser usadas para o desenvolvimento de novos e mais eficazes métodos de

diagnóstico. Regiões conservadas e antigênicas identificadas nas proteínas Gp90 e Gp45 também podem ser uma ferramenta para aumentar a sensibilidade dos testes (Naves, 2015). O sequenciamento para a caracterização e estudo do vírus é uma excelente alternativa, todavia ainda é uma técnica laboriosa e cara para ser utilizada como diagnóstico.

Apesar do sucesso da vacinação de equinos no surto chinês, a utilização dessa vacina ou desenvolvimento de uma vacina global para o AIEV ainda é limitado devido às variações genéticas do vírus, que não são completamente elucidadas. Com o avanço da caracterização de isolados e quasispécies, torna-se possível um melhor entendimento das regiões envolvidas na resposta imune do hospedeiro, sendo uma etapa crucial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Por isso, para que seja possível a vacinação contra esse vírus, ainda são necessárias maiores análises da filogenia do vírus, suas regiões conservadas e antigênicas e o papel das mutações na permanência da infecção (Wang, 2016). A identificação destas regiões permite analisar epítomos presentes em diferentes variações de cepas do vírus, o que possibilita elucidar os principais alvos da resposta imune do hospedeiro. Com base em análises filogenéticas mais aprofundadas do vírus, é possível o desenvolvimento de uma vacina atenuada de uma cepa em comum com uma maior gama de grupos monofiléticos, e portanto, adquirir proteção em uma maior distribuição geográfica.

7. Conclusão

A anemia infecciosa equina ainda é uma doença com grande impacto econômico na equinocultura, na comercialização e na exportação de cavalos. As medidas de controle atualmente adotadas mundialmente, apesar de eficazes no controle da disseminação da doença em larga escala, ainda apresentam surtos ocasionais devido suas limitações. A principal delas é devido a caracterização do vírus, que na maioria das técnicas de sequenciamento utilizadas depende da amplificação do genoma viral baseado em *primers* previamente conhecidos. Nos últimos anos, análises filogenéticas de isolados de diferentes regiões geográficas não só descreveram diferentes grupos monofiléticos, como uma gama de variações entre eles, o que pode dificultar o sequenciamento baseado em amplificação. Todavia, estes dados fornecem importantes informações sobre a evolução do vírus e sua distribuição geográfica, podendo servir de base para estudos sobre a disseminação do vírus em escala mundial. Além disso, o sequenciamento e caracterização do vírus são essenciais para analisar as regiões hipervariáveis e regiões conservadas, os mecanismos de escape do sistema imunológico do hospedeiro e a relação entre o quadro clínico e o genoma do vírus. Estas análises compreendem um importante papel para o desenvolvimento de novos e/ou melhorados testes de diagnóstico, que podem não só apresentar maior sensibilidade e especificidade, mas também uma aplicabilidade maior para isolados de diferentes regiões. A biotecnologia possibilita então utilizar de estratégias e ferramentas para desvendar importantes informações sobre o AIEV, como a utilização de métodos de sequenciamento por NGS e o aprimoramento das técnicas de diagnóstico molecular atualmente utilizadas. Elucidar a estrutura e o genoma do vírus também pode servir de base como estudo para outros lentivírus similares, como HIV ou FIV. Portanto, ainda são necessários novos estudos que possibilitem um maior entendimento do AIEV, para possibilitar melhores medidas de controle e erradicação do vírus.

Referências

- ALLEN, L. J. S. & SCHWARTZ, E. J. Free-virus cell-to-cell transmission in models of equine infectious anemia virus infection. **Mathematical Biosciences**, n. 270, p. 237-248, 2015.
- ALVAREZ, I.; CIPOLINI, F.; WIGDOROVITZ, A.; TRONO, K.; BARRANDEGUY, M. E. The efficacy of ELISA commercial kits for the screening of equine infectious anemia virus infectious. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 1, p. 25-28, 2015.
- AUTORINO, G. L.; ELENI, C.; MANNA, G.; FRONTOSO, R.; NARDINI, R.; COCUMELLI, C.; ROSONE, F.; CAPRIOLI, A.; ALFIERI, L. SCICLUNA, M. T. Evolution of equine infectious anaemia in naturally infected mules with diferente serological reactivity patterns prior and after imune suppression. **Veterinary Microbiology**, v. 189, p. 15-23, 2016.
- ARI, S. & ARIKAN, M. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. **Plant Omics: Trends and Applications**, p. 109-135, 2016.
- BOGERD, H. P.; TALLMADGE, R. L.; OAKS, L.; CARPENTER, C.; CULLEN, B. R. Equine infectious anemia virus resists the antiretroviral activity of equine APOBEC3 proteins through a packaging-independent mechanism. **Journal of Virology**. Estados Unidos, v. 82, p. 11889-11901, 2008.
- BOLFA, P.; BARBUCEANU, F.; LEAU, S.-E.; LEROUX, C. Equine infectious anaemia in Europe: Time to re-examine the efficacy of monitoring and control protocols? **Equine Veterinary Journal**, v. 48, p. 140-142, 2016.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normas para a prevenção e controle da anemia infecciosa equina. Instrução Normativa SDA/MMA 45/2004, Portaria nº 35, 15 de julho de 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo - Normas para o credenciamento e monitoramento de diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina. Portaria nº 378, 17 de dezembro de 2014.
- BUENO, B. L.; CÂMARA, R. J. F.; MOREIRA, M. V. L.; GALINARI, G. C. F.; SOUTO, F. M.; VICTOR, R. M.; BICALHO, J. M.; ECCO, R.; REIS, J. K. P. Molecular detection, histopathological analysis, and immunohistochemical characterization of equine infectious anemia virus in naturally infected equids. **Archives of Virology**, v. 165, p. 1333-1342, 2020.
- CAIJ, A. B., & TIGNON, M. Epidemiology and genetic characterization of equine infectious anaemia virus strains isolated in Belgium in 2010. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 5, p. 464–468, 2014.
- CAPPELLI, K.; COOK, R., F.; STEFANETTI, V.; PASSAMONTI, F.; AUTORINO, G. L.; SCICLUNA, M. T.; COLETTI, M.; VERINI SUPPLIZI, A.; CAPOMACCIO, S. Deep

sequencing and variant analysis of an Italian pathogenic field strain of equine infectious anemia virus. **Transboundary and Emerging Diseases**. Perugia, p. 1-9, 2017.

CARRIJO JUNIOR, O. A. & MURAD, J. C. B. Animais de grande porte II. **NT Editora**, Brasília, p. 192, 2016.

CERVANTES, D. T.; BALL, J. M.; EDWARDS, J.; PAYNE, S. Horses naturally infected with EIAV harbor 2 distinct SU populations but are monophyletic with respect to IN. **Virus Genes**, v. 51, p. 71-80, 2016.

CHECKLEY, M. A.; LUTTGE, B. G.; FREED, E. O. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking and incorporation. **Journal of Molecular Biology**, v. 410, p. 582-608, 2011.

CHEN, C. LI, F. & MONTELARO, R. C. Functional Roles of Equine Infectious Anemia Virus Gag p9 in Viral Budding and Infection. **Journal of Virology**, v. 75, n. 20, p. 9762-9770, 2001.

CHONG, Y.; BALL, J. M.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C.; RUSHLOW, K. E.. Analysis of Equine Humoral Immune Responses to the Transmembrane Envelope Glycoprotein (gp45) of Equine Infectious Anemia Virus. **Journal of Virology**, p. 1013-1018, 1991.

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

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

COOK, R. F.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 181-204, 2013.

COOK, S. J.; LI, G.; ZHENG, Y.; WILLAND, Z. A.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F. Molecular characterization of the major open reading frames (ORFs) and enhancer elements from four geographically distinct North American equine infectious anemia virus (EIAV) isolates. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2019.

COSTA, A. M. P. S. Análise temporal da ocorrência da Anemia Infeciosa Equina no Brasil no período de 2005 a 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p. 40, 2018.

COSTA, S.; SASTRE, P.; PÉREZ, T.; TAPIA, I.; BARRANDEGUY, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M.; SÁNCHEZ-MATAMOROS, A.; WIGDOROVITZ, A.; S.; SANZ, A.; RUEDA, P. Development and evaluation of a new lateral flow assay for simultaneous detection of antibodies against African Horse Sickness and Equine Infectious Anemia viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 237, p. 127-131, 2016.

CRAIGO, J. K.; EZZELARAB, C.; COOK, S. K.; LIU, C.; HOROHOV, D.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Protective Efficacy of Centralized and Polyvalent Envelope Immunogens in an Attenuated Equine Lentivirus Vaccine. **PLOS Pathogens**, v. 11, i. 1, p. 1-14, 2015.

CROSS, P. Global Horses Statistics. Global Horse Statistics Validation for HPAB associates, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/331234705_Global_Horse_statistics_internal_02_2019. Acesso em: 11 de março de 2021.

CRUZ, F.; FORES, P.; IRELAND, J.; MORENO, M. A.; NEWTON, R. Freedom from equine infectious anemia virus infection in Spanish Purebred horses. **Veterinary Record Open**, p. 1-5, 2015.

CURSINO, A. E.; VILELA, A. P. P.; FRANCO-LUIZ, A. P. M.; OLIVEIRA, J. G.; NOGUEIRA, M. F.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; AGUIAR, D. M.; KROON, E. G. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. **Archives of Virology**, v. 163, p. 2385-2394, 2018.

DAO, T. D.; BUI, V. N.; OMATSU, T.; KATAYAMA, Y.; MIZUTANI, T.; OGAWA, H.; IMAI, K. Application of the SureSelect target enrichment system for next-generation sequencing to obtain the complete genome sequence of bovine leukemia virus. **Archives of Virology**, v. 163, p. 3155-3159, 2018.

DAUTER, Z.; PERSSON, R.; ROSENGREN, A. M.; NYMAN, P. O.; WUILSON, K. S.; CEDERGREN-ZEPPEZAUER, E. S. Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus: active site metal binding in a substrate analogue complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 655-673, 1999.

DELIBERATO, C.; MAGLIANO, A.; AUTORINO, G. L.; DIDOMENICO, M.; SALA, M.; BALDACCHINO, F. Seasonal succession of tabanid species in equine infectious anaemia endemic areas of Italy. **Medical and Veterinary Entomology**. Itália, p. 1-6, 2019.

DESHIERE, A.; BERTHET, N.; LECOUTURIER, F.; GAUDAIRE, D.; HANS, A. Molecular characterization of Equine Infectious Anemia Viruses using targeted sequence enrichment and next generation sequencing. **Virology**, v. 537, p. 121-129, 2019.

DONG, J.; ZHU, W.; COOK, F. R.; GOTO, Y.; HORII, Y.; HAGA, T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field isolated from feral horses in southern Japan. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 350-365, 2013.

DOREY-ROBINSON, D. L. W.; LOCKER, N.; STEINBACH, F.; CHOUDHURY, B. Molecular characterization of equine infectious anaemia virus strains detected in England in 2010 and 2012. **Transboundary and Emergency Diseases**, p. 1-7, 2019.

DUAN, L.; DU, J.; LIU, X. Insights into vaccine development for acquired immune deficiency syndrome from crystal structures of human immunodeficiency virus-1 gp41 and equine infectious anemia virus gp45. **Protein Science**, v. 24, p. 1549-1559, 2015.

DUAN, L.; DU, J.; WANG, X.; ZHOU, J.; WANG, X.; LIU, X. Structural and functional characterization of EIAV gp45 fusion peptide proximal region and asparagine-rich layer. **Virology**, v. 491, p. 64-72, 2016.

DU, C.; DUAN, Y.; WANG, X. F.; LIN, Y.; NA, L.; WANG, X.; CHEN, K.; WANG, X. Attenuation of Equine Lentivirus Alters Mitochondrial Protein Expression Profile from Inflammation to Apoptosis. **Journal of Virology**, v. 93, i. 21, p. 1-24, 2019.

ESPASANDIN, A. G.; CIPOLINI, M. F.; FORLETTI, A.; DÍAS, S.; SOTO, J. MARTÍNEZ, D. E.; STORANI, C. A.; MONZÓN, N. M.; BELTRAME, J. I. LUCCHESHI, E. SOTO, P. Comparison of serological techniques for the diagnosis of Equine Infectious Anaemia in an endemic area of Argentina. **Journal of Virological Methods**. Argentina, v. 291, n. 114101, p. 1-5, 2021.

FAO. Live Animals, 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>. Acesso em: 26 de abril de 2021.

FARIA, N. R.; SABINO, E. C.; NUNES, M. R.; ALCANTARA, L. C.; LOMAN, N. J.; PYBUS, O. G. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. **Genome Medicine**, v. 8, n. 97, 2016.

FLORES, E. F. Virologia Veterinária. **Editora da Universidade Federal de Santa Maria**, 888 p., 2007.

FONTES, K. F. L. P.; SILVA JÚNIOR, L. C.; NASCIMENTO, S. A.; CHAVES, D. P.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; FREITAS, A. C.; CASTRO, R. S.; JESUS, A. L. S. Enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion assay for diagnosis of equine infectious anemia employing p26 protein fused to the maltose-binding protein. **Archives of Virology**, v. 163, p. 2871-2875, 2018.

FRANCO, M. M. J. & PAES, A. C. Anemia infecciosa equina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 197-207, 2011.

GAUDAIRE, D.; LECOUTURIER, F.; PONÇON, N.; MORILLAND, E.; LAUGIER, C.; ZIENTARA, S.; HANS, A. Molecular characterization of equine infectious anaemia virus from a major outbreak in southeastern France. **Transboundary and Emerging Diseases**. França, p.1-7, 2017.

GNIRKE, A.; MELNIKOV, A.; MAGUIRE, J.; ROGOV, P.; LEPROUST, E. M.; BROCKMAN, W.; FENNELL, T.; GIANNOUKOS, G.; FISHER, S.; RUSS, C.; GABRIEL, S.; JAFFE, D. B.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 182-189, 2009.

GONTAREK, R. R. & DERSE D. Interactions among SR Proteins, and Exonic Splicing Enhancer, and a Lentivirus Rev Protein Regulate Alternative Splicing. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 5, p. 2325-2331, 1996.

HAN, X.; ZHANG, P.; YU, W.; XIANG, W.; LI, X. Amino acid mutations in the env gp90 protein that modify N-linked glycosylation of the Chinese EIAV vaccine strain enhance resistance to neutralizing antibodies. **Virus Genes**, v. 52, p. 814-822, 2016.

HIGGINS, S. N.; HOWDEN, K. J.; JAMES, C. R.; EPP, T.; LOHMANN, K. L. A retrospective study of owner-requested testing as surveillance for equine infectious anemia in Canada (2009-2012). **Canadian Veterinary Journal**, v. 58, p. 1294-1300, 2017.

HIZI A. & HERZIG E. dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. **Retrovirology**, v. 12, n. 70, 2015.

HU, Z.; CHANG, H.; CHU, X.; LI, S.; WANG, M.; WANG, X. Identification and characterization of a common B-cell epitope on EIAV capsid proteins. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 100, p. 10531-10542, 2016.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acesso em: 10 de junho de 2021.

ISSEL, C. J. & FOIL, L. D. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasts. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**. Paris. 34, n. 2, p. 513-523, 2015.

JIA, H.; GUO, Y.; ZHAO, W.; WANG, K. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation in the MiSeq sequencer. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5737, 2014.

KHANH, L. P. B.; PHUC-CHAU, D.; ROMMIE, A. E.; LY, L. Molecular Docking of Broad-Spectrum Antibodies on Hemagglutinins of Influenza A Virus. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 15, 2019.

KLEVEJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W. P.; CRAWFORD, T. B. Archives of virology characterization of the infection of equine fibroblasts by equine infectious anemia virus. **Archives of Virology**, v. 289, p. 279-289, 1979.

KOCZULA, K. M. & CALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 111-120, 2016.

KUHAR, U. & MALOVRH, T. High genetic diversity of equine infectious anaemia virus strains from Slovenia revealed upon phylogenetic analysis of the p15 gag gene region. **Equine Veterinary Journal**. Eslovênia, v. 48, i, 2, p. 205-210, 2015.

LEGGETT, R. M. & CLARK, M. D. A world of opportunities with nanopore sequencing. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, i. 20, p. 5419-5429.

LEROUX, C. CADORÉ, 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.

LIGNEE, M. Mémoire et observations sur une maladie de sarg, connue sous le nom d'anémie hydrohémie. Cachexie aqueuse du cheval. Recueil de Médecine Vétérinaire, v. 20, n. 30, 1843.

LIU, C.; WANG, X.; WANG, Y.; CHEN, J.; ZHONG, Z.; LIN, Y.; WANG, X. Characterization of EIAV env Quasispecies during Long-Term Passage In Vitro: Gradual Loss of Pathogenicity. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 1-12, 2019.

LIN, Y.; WANG, X.-F.; WANG, Y.; DU, C.; REN, H.; LIU, C.; ZHU, D.; CHEN, J.; NA, L.; LIU, D.; YANG, Z.; WANG, X. Env diversity-dependent protection of the attenuated equine infectious anaemia virus vaccine. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, p. 1309-1320, 2020.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

LIU, Q.; MA, J.; WANG, X.-F.; XIAO, F.; LI, L.-J.; ZHANG, J.-E.; LIN, Y.-Z.; DU, C. HE, X.J.; WANG, X.; ZHOU, J.-H. Infection with equine infectious anemia virus vaccine strain EIAVDLV121 causes no visible histopathological lesion in target organs in association with restricted viral replication and unique cytokine response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 170, p. 30-40, 2016.

LIU, Q.; WANG, X.-F.; DU, C.; LIN, Y.-Z.; MA, J.; WANG, Y.-H.; ZHOU, J.-H.; WANG, X. The integration of a macrophage-adapted live vaccine strain of equine infectious anaemia virus (EIAV) in the horse genome. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 2596-2606, 2017.

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

LOHMANN, K. L.; JAMES, C. R.; HIGGINS, S. N.; HOWDEN, K. J. EPP, T. Disease investigations for equine infectious anemia in Canada (2009-2012) - Retrospective evaluation and risk factor analysis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 60, p. 1199-1206, 2019.

MALLOSSI, C. D.; FIORATTI, E. G.; CARDOSO, J. F.; MADRO, A. J.; KROON, E. G.; AGUIAR, D. M.; BORGES, A. M. C. M.; NOGUEIRA, M. F.; ULLMANN, L. S.; ARAUJO JUNIOR, J. P. High Genomic Variability in Equine Infectious Anemia Virus Obtained from Naturally Infected Horses in Pantanal, Brazil: An Endemic Region Case. **Viruses**, v. 12, n. 207, p. 1-15, 2020.

- MANOLESCU, N.; BALINT, E.; CINCA, S.; CHIRILA, C. One Health and Advanced Biotechnology. **Modern Medicine**, v. 24, n. 2, p. 64-69, 2017.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 9, p. 387-402, 2008.
- MAURY, W. Regulation of Equine Infectious Anemia Virus Expression. **Journal of Biomedical Science**, v. 5, n. 1, p. 11-23, 1998.
- MERI, S.; BONSDORFF, C. H. Complement Fixation Test. **Encyclopedia of Immunology**, p. 617-619, 1998.
- MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; & ISSEL, C. J. Characterization of EIAV immunogenicity during persistent infections: humoral responses and antigen targets. **Developments in Biological Standardization**, v. 72, p. 19-30, 1990.
- MOREIRA, J. C. O.; RODRIGUES, D. M.; GILLIOLI, R.; COSTA, F. F.; ALBUQUERQUE, D. M. A semi-nested RT-PCR assay for detection of norovirus in rat fecal samples. *Experimental Animals*, v. 68, n. 2, p. 169-176, 2019.
- NARDINI, R.; AUTORINO, G. L.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; SCICLUNA, M. T. Evaluation of six serological ELISA kits available in Italy as screening test for equine infectious anaemia surveillance. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 105, p. 1-8, 2017.
- NARDINI, R.; AUTORINO, G. L.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; SIMULA, M.; SCICLUNA, M. T. Validation according to OIE criteria of a monoclonal, recombinant p26-based, serologic competitive enzyme-linked immunosorbent assay as screening method in surveillance programs for the detection of Equine infectious anemia virus antibodies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 2, p. 88-97, 2016.
- NAVES, J. H. F. F. Diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muarees utilizando peptídeo sintético ppg45. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, p. 48, 2015.
- NAKAI, R. Size Matters: Ultra-small and Filterable Microorganisms in the Environment. **Microbes and Environments**, v. 35 n. 2, 2020.
- NEMOTO, M.; YAMANAKA, T.; BANNAI, H.; TSUJIMURA, K.; UENO, T.; MEKATA, H.; YOSHIDA, A.; KOYAMA, A.; KOKADO, H. Comparison of two agar gel immunodiffusion protocols for diagnosing equine infectious anemia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 8, p. 1245-1247, 2018.
- OIE. WAHIS: Detailed country(ies) disease incidence of Equine infectious anaemia between January 2016 and October 2018. 2018.

OLIVEIRA, F. G.; COOK, R. F.; NAVES, J. H. F.; OLIVEIRA, C. H. S.; DINIZ, R. S.; FREITAS, F. J. C.; LIMA, J. M.; SAKAMOTO, S. M.; LEITE, R. C.; ISSEL, C. J.; REIS, J. K. P. Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 140, p. 30-37, 2017.

PARREIRA, D. R.; JANSEN, A. M.; ABREU, U. G. P.; MACEDO, G. C.; SILVA, A. R. S.; MAZUR, C.; ANDRADE, G. B.; HERRERA, H. M. Health and epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. **Acta Tropica**, v. 163, p. 98-102, 2016.

PAYNE, S. L.; PEI, X.; JIA, B.; FAGERNESS, A.; FULLER, F. J. Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2478-2485, 2004.

PURDY, J. G.; FLANAGAN, J. M.; ROPSON, I. J.; RENNOLL-BANKERT, K. E.; CRAVEN, R. C. Critical Role of Conserved Hydrophobic Residues within the Major Homology Region in Mature Retroviral Capsid Assembly. **Journal of Virology**, Pensilvânia, v. 82, n. 12, p. 5951-5961, 2008.

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. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 612-622, 2013.

RACANIELLO, V. Viral bioinformatics: Recombination. Virology blog: about viruses and viral disease, 2010. Disponível em: <https://www.virology.ws/2010/09/08/viral-bioinformatics-recombination/>. Acesso em: 28 de março de 2021.

RAVI, R. K.; WALTON, K. & KHOSROHEIDARI, M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. **Disease Gene Identification**, v. 1706, p. 223-232, 2018.

ROBERTS, H. Equine infectious anaemia in Europe: an ongoing threat to the UK. **Veterinary Record**, v. 181, p. 442-446, 2017.

ROSSDALE, P.; HUNT, M.; PEACE, C.; HOPES, R.; RICKETTS, S. A case of equine infectious anaemia in Newmarket. **Veterinary Record**, v. 97, p. 207-208, 1975.

SCICLUNA, M. T.; AUTORINO, G. L.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; NARDINI, R. Validation of an immunoblot assay employing an objective reading system and used as a confirmatory test in equine infectious anaemia surveillance programs. **Journal of Virological Methods**, v. 266, p. 77-88, 2019.

SCICLUNA, M. T.; AUTORINO, G. L.; NOGAROL, C.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; NARDINI, R. Validation of an indirect ELISA employing a chimeric

recombinant gag and env peptide for the serological diagnosis of equine infectious anemia. **Journal of Virological Methods**, v. 251, p. 111-117, 2018.

SEIFI, M.; GHASEMI, A.; RAEISI, S.; HEIDARZADEH, S. Application of Next-generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1-15, 2017.

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

SHARAV, T.; KINNAI, S.; OCHIRKHUU, N.; TS, E. O.; MEKATA, H.; SAKODA, Y.; UMEMURA, T.; MURATA, S.; CHULTEMDORJ, T.; OHASHI, K. Detection and molecular characterization of equine infectious anemia virus in Mongolian horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 11, p. 1884-1888, 2017.

SHARMA, A.; BRUNS, K.; RODER, R.; HENKLEIN, P.; VOTTELER, J.; WRAY, V.; SCHUBERT, U. Solution structure of the equine infectious anemia virus p9 protein: a rationalization of its different ALIX binding requirements compared to the analogous HIV-P9 protein. **BMC Structural Biology**, v. 95, n. 74, 2009.

SHENDURE, J. & JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 122, n. 1, 2019.

TERME, J. M.; CALVIGNAC, S.; DODON, M. C. GAZZOLO, L. JORDAN, A. E box motifs as mediators of proviral latency of human retroviruses. **Retrovirology**, v. 6., n. 81, 2009.

TIGRE, D. M.; BRANDÃO, C. F. L.; PAULA, F. L.; CHINALIA, F. A.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, p. 873-877, 2017.

VALLEE, H.; CARRE, H.; Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. **Comptes Rendu Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 139, p. 331-333, 1904.

WANG, H.-N.; RAO, D.; FU, X.-Q.; HU, M.-M.; DONG, J.-G. Equine infectious anemia virus in China. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, p. 1356-1364, 2018.

WANG, J.; WANG, Q.; HAO, S.; GUO, C.; AN, J.; ZHANG, Q.; LIANG, R.; WANG, Y. Thermostable properties of the equine infectious anemia virus nucleocapsid protein NCp11. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, p. 472-478, 2019.

WANG, X.; LIU, Y.; LI, Q.; LIU, Q.; ZHAO, W.; DU, C.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHOU, J. Genetic Evolution during the development of an attenuated EIAV vaccine. **Retrovirology**, v. 13, n. 9, p. 1-13, 2016.

WERTHEIM, J.O. & WOROBEY, M. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. **PLoS Computational Biology**, v. 5, 2009.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; WALTNER-TOEWS, D.; TANNER, M. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, i, 3-4, p. 148-156, 2011.