

LUCIANA CAVALCANTI DE ARRUDA COUTINHO

**PADRONIZAÇÃO DE UM iELISA COM EMPREGO DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE *p26* DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA
PRODUZIDA EM *Pichia pastoris***

RECIFE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

LUCIANA CAVALCANTI DE ARRUDA COUTINHO

**PADRONIZAÇÃO DE UM IELISA COM EMPREGO DA PROTEÍNA
RECOMBINANTE *p26* DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA
PRODUZIDA EM *Pichia pastoris***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana Cláudia Campos

RECIFE

2014

Ficha catalográfica

C871p Coutinho, Luciana Cavalcanti de Arruda
Padronização de um iELISA com emprego da proteína recombinante *p26* do vírus da anemia infecciosa equina produzida em *Pichia pastoris* / Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho. – Recife, 2014.
112 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2014.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Imunodiagnóstico 2. AIE 3. ELISA 4. IDGA
5. Proteína capsial I. Castro, Roberto Soares de, orientador II. Título

CDD 636.089

DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos (Heitor e Artur), marido (Tadeu), enteados (João Victor e Rodrigo) e
afilhado (Henrique).*

Ao meu pai (Ivanildo) “in memoriam” e a minha mãe (Maria Lúcia).

A minha avó materna (Lindauro Cavalcanti de Arruda).

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a força que precisei para seguir nesta caminhada.

Ao meu pai, “in memorian”, exemplo de honestidade, integridade e amor incondicional.

Ao meu marido Antonio Tadeu Maia Fontenele pelo companheirismo, amor, paciência.

Aos meus filhos Heitor, Artur, João Victor e Rodrigo, fontes de inspiração na busca do desenvolvimento e evolução espiritual.

A minha mãe Maria Lúcia, e minha irmã Andréa, por acreditarem e pela torcida para esta conquista.

A minha avó materna Lindaura Cavalcanti, farmacêutica, mas que tentando realizar seus sonhos, aos 93 anos está se formando em Direito. Para mim, um símbolo de força e perseverança na busca pelo conhecimento. Tenho orgulho de ser sua neta. Obrigada pelo exemplo!

Ao Professor Roberto Soares de Castro, pelas oportunidades e orientações.

Ao Professor Antonio Carlos de Freitas, por ter me recebido bem em sua equipe. Por ter confiado e acreditado.

Aos colegas Sérgio e Karin que participaram do trabalho em diferentes momentos, todos com suas devidas importâncias.

A Ana Lisa, pelas dicas importantes.

A Ana Cláudia Campos, pela atenção e paciência.

A Inês, pela prestatividade.

Ao amigo André com quem trabalhei grande parte do tempo neste doutorado.

A Jack e ao Cosme que me deram um reforço especial nesta etapa final, a ajuda de vocês foi indispensável...

A Neurisvan (Bodocó) colega de turma que, de repente, surgiu para me dar uma força quando precisei.

A minha querida amiga Eliane Coimbra pelo ombro amigo, sempre pronto para os momentos difíceis.... e pelas gargalhadas....Esta amizade levarei comigo....

A amiga Angélica que esteve sempre disposta a me receber em sua casa quando precisei...obrigada pelo acolhimento.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, em especial a Lana e Tom “in memorian”, sentimos sua falta...

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença de difícil controle, caracterizada por uma ampla variedade de sinais clínicos que surgem em ciclos recorrentes e dinâmicos. De acordo com a legislação brasileira, animais positivos no exame sorológico Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) devem ser sacrificados, existindo, portanto, uma relação de dependência entre o diagnóstico e o controle da doença. Por questões relacionadas às características da infecção e resposta imunológica peculiar à AIE, este teste pode não ser capaz de detectar animais recém-infectados. Tendo em vista que o IDGA tem papel decisivo no destino do animal testado, estuda-se a possibilidade de complementação do diagnóstico com ELISA. Diante deste cenário, em um estudo anterior, foi desenvolvida a proteína *p26* recombinante (*rp26*) do VAIE, produzida na levedura *Pichia pastoris*, vislumbrando seu uso como antígeno em imunoenaios. A finalidade do atual estudo foi testar o antígeno produzido no IDGA, ELISA e *Western blot* bem como padronizar um ELISA indireto (iELISA) utilizando a proteína *rp26* do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) como antígeno, e ainda compará-lo com o teste padrão IDGA. Em todos os imunoenaios referidos foi possível identificar a funcionalidade da *rp26* como antígeno. Após a análise de 101 soros de animais IDGA-positivos e 704 IDGA-negativos no novo iELISA, foi observada uma excelente concordância ($kappa=0,9$) entre os testes. O ponto de corte (15%) foi selecionado pela observação da distribuição dos valores relativos das densidades ópticas das amostras IDGA-positivas e IDGA-negativas. A sensibilidade e especificidade relativas foram de 97% e 97,9%, respectivamente. Os ótimos resultados encontrados com o uso da *rp26* como antígeno no iELISA possibilita a consideração de uma nova alternativa de diagnóstico para AIE.

Palavras-chave: Imunodiagnóstico, AIE, ELISA, IDGA, proteína capsidial.

ABSTRACT

Equine infectious anemia (EIA) is a difficult control disease, characterized by a wide variety of clinical signs that appear in recurring and dynamic cycles. According with Brazilian law, positive animals in the agar gel immunodiffusion (AGID) must be sacrificed, therefore, there is a dependency relationship between diagnosis and disease control. For reasons related with peculiar characteristics of the infection and immune response EIA, this test may not be able to detect newly infected animals. Considering that the IDGA has a decisive role in the fate of the animal tested, we study the possibility of complementing the diagnostic with the ELISA. In this context, in a previous study, we developed the recombinant protein p26 (*rp26*) from VAIE, produced in yeast *Pichia pastoris*, aiming their use as antigens in immunoassays . The purpose of the current study was to test this antigen in AGID, ELISA and Western blot, standardize an indirect ELISA (iELISA) using the *rp26* protein from equine infectious anemia virus (EIAV) as antigen, and also compare it with the pattern test. In all these immunoassays was identified the functionality of the *RP26* antigen. After analyzing 101 AGID - positive sera from animals and 704 AGID - negative at the new iELISA, was observed excellent concordance ($kappa=0,9$) between tests. The cutoff point (15%) was selected by observing the distribution of the relative values of the optical densities of the samples IDGA -positive and negative. The relative sensitivity and specificity were 97 % and 97,9 %, respectively. The excellent results using the *rp26* as antigen in iELISA enables the consideration of a new alternative diagnostic for EIA.

Key words: Immunoassay, EIA , ELISA, AGID, capsid protein.

LISTA DE FIGURAS

Página

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** Modelo de partícula viral (VAIE) e suas estruturas antigênicas. 17
- Figura 2** Organização genômica do VAIE 18
- Figura 3** IDGA com antígeno viral *rp26* 23
- Figura 4** Esquema de espectro de reações sorológicas no IDGA 23
- Figura 5** Esquema de ELISA indireto (iELISA) 25
- Figura 6** Cinética da resposta imune de infecção experimental por VAIE em equino 26

ARTIGO CIENTÍFICO 1

- Figura 1** RT-PCR de *P. pastoris* recombinante 43
- Figura 2** Triagem por *Dot blot* de *P. pastoris* recombinante 43
- Figura 3** WB e SDS-PAGE de sobrenadante de cultivo *P. pastoris* recombinante 43
- Figura 4** IDGA com *rp26* e soros controle (CP, CN e OIE) 44

ARTIGO CIENTÍFICO 3

- Figura 1** Distribuição dos valores relativos de DO de 101 soros equinos IDGA-positivos e 704 soros IDGA-negativos. 100

Apêndices A e B

- Figura A** Eutanásia de animais IDGA-positivos para AIE 111
- Figura B** Placa do iELISA 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAHSA	<i>American Association for Horsemanship Safety</i>
AIE	Anemia Infecciosa Equina
ALV	Vírus da leucose aviária
<i>AOX1</i> e <i>AOX2</i>	Genes codificantes da enzima álcool oxidase isoformas 1 e 2
BLV	Vírus da leucose bovina
CAIEPAN	Programa de Controle e Prevenção da Anemia Infecciosa Equina do Pantanal
CD8+	Linhagem de células de defesa do sistema complemento (linfócitos T citotóxicos)
C3	Linhagem de células de defesa do sistema complemento
cDNA	DNA complementar
CECAIE	Comissão Estadual de Controle da AIE
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CN	Controle negativo
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal da cadeia peptídica
CV	Coefficiente de variação
D ₂ O	Água deuterada também chamada de óxido de deutério (átomos de hidrogênio mais pesados)
d.p.i	Dias pós infecção
DH5 α	Linhagem de células de <i>Escherichia coli</i> livre de plasmídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DSe	Sensibilidade diagnóstica
DSp	Especificidade diagnóstica
ELISA	<i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELR1	Receptores lentivirais celulares equinos 1
<i>env</i>	Gene codificante para proteínas de VAIE
F	Primer forward
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
G e C	Nucleotídeos guanina e citosina
<i>gag</i>	Região do genoma do VAIE
GS115	Linhagem de levedura <i>Pichia pastoris</i>
GTA	Guia de Trânsito Animal
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV – 1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HSA	Soro albumina humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina do tipo G
iELISA	ELISA indireto que utiliza antígeno <i>p26</i> produzido em <i>Pichia pastoris</i> e proteína G conjugada a peroxidase.
IL-6	Interleucina 6
IDGA	Imunodifusão em gel de Agar
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons
KM71H	Linhagem de células da levedura <i>Pichia pastoris</i>
<i>LTR</i>	Região do genoma de VAIE (<i>Long Terminal Repeats</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mM	Milimolar
MDIC	Ministério do desenvolvimento indústria e comércio
Mut	Fenótipo quanto à utilização de metanol (<i>Methanol utilization</i>)
Mut ⁺	Fenótipo quanto à utilização de metanol (<i>Methanol utilization</i>) plus
N	Normalidade (1N- normal)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-GLYCANS	Glicanos (oligo ou polissacarídeos) ligados à porção amino terminal da cadeia peptídica
nm	Nanômetros
<i>NotI</i>	Enzima de restrição que corta a sequência nucleotídica no sítio <i>NotI</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PGE2	Prostaglandinas (mediadores químicos lipídicos) do tipo 2
PIB	Produto interno bruto
P/N	Relação entre positivos e negativos
PNSE	Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
<i>pol</i>	Gene codificante para proteínas de VAIE
pPICZA	Vetor de expressão em levedura <i>Pichia pastoris</i>
pPICZαAp26	Construção de cassete de expressão
<i>pr</i>	Poliproteína precursora capaz de originar outras proteínas de VAIE
<i>PUI</i>	Elemento rico em purina 1 envolvido na regulação de promotores lentivirais
R	Primer reverse
RE	Retículo Endoplasmático
<i>rev</i>	Fase aberta de leitura codificante para proteínas de regulação do VAIE
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RP26	Proteína recombinante <i>p26</i>
RT-PCR	PCR com enzima transcriptase reversa (<i>Reverse transcriptional – Polymerase Chain Reaction</i>)
S2	Fase aberta de leitura codificante para proteínas de regulação do VAIE
<i>SacI</i>	Enzima de restrição que corta a sequência nucleotídica no sítio <i>SacI</i>
SDS-PAGE	Gel de eletroforese poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
<i>Sh ble</i>	Gene que codifica resistência à droga zeocina TM relaciona a bleomicina
SIV	Vírus da imunodeficiência dos símios
<i>tat</i>	Fase aberta de leitura codificante para proteínas de regulação do VAIE
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa
TGFb	Fator transformador de crescimento b
TMB	Tetrametilbenzidine (substrato cromógeno)
U3	3' <i>end</i> , único (região do genoma de VAIE contido na <i>LTR</i>)
U5	5' <i>end</i> , único (região do genoma de VAIE contido na <i>LTR</i>)
UF	Unidade da Federação
USDA:APHIS	Agência regulatória americana (<i>United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service</i>)
VAIE	Vírus da Anemia Infecciosa Equina

WB	<i>Western blotting</i>
X-33	Linhagem selvagem de células da levedura <i>Pichia pastoris</i>
<i>XhoI</i>	Enzima de restrição que corta a sequência nucleotídica no sítio <i>XhoI</i>

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 14
1.1	Objetivo geral 16
1.2	Objetivos específicos 16
2	REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1	Caracterização e mecanismos virais 17
2.2	Variabilidade genética do VAIE 19
2.3	Patologia e resposta imunológica 21
2.4	IDGA 22
2.5	ELISA 24
2.6	Utilização de <i>Pichia pastoris</i> para produção de <i>p26</i> do VAIE 26
2.7	Avaliação de métodos diagnósticos 29
2.7.1	Determinação da viabilidade do método para um uso específico 30
2.7.2	Desenvolvimento do ensaio e normalização 30
2.7.3	Determinação de características do desempenhado ensaio 31
2.7.4	Acompanhamento contínuo do desempenho do ensaio e manutenção 31
2.7.5	Melhoria dos critérios de validação durante o uso rotineiro do ensaio 32
3	REFERÊNCIAS 33
4	ARTIGO CIENTÍFICO 1: Production of Equine Infectious Anemia Virus (VAIE) antigen in <i>Pichia pastoris</i>. 42
5	ARTIGO CIENTÍFICO 2: Anemia Infecciosa Equina: perspectivas de avanços no diagnóstico e controle 47
6	ARTIGO CIENTÍFICO 3: Indirect ELISA for Equine Infectious Anemia diagnostic using recombinant antigen (<i>rp26</i>) produced in <i>Pichia pastoris</i>. 80
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS 101
8	APÊNDICE A 103
9	APÊNDICE B 111

1. INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um lentivírus da família *Retroviridae*, que provoca considerável desordem no sistema hematopoiético de equídeos e está mundialmente distribuída. Seu agente etiológico, o vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE), caracteriza-se por provocar ampla variedade de sinais clínicos, podendo apresentar diferentes estágios de infecção em ciclos recorrentes e dinâmicos. Esta virose é transmitida por insetos hematófagos e considerada endêmica no Brasil. O diagnóstico oficial preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) realiza-se através do teste de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Animais positivos devem ser eutanasiados de acordo com a legislação vigente, fato que justifica a grande preocupação e vigilância da doença.

O IDGA possui elevada especificidade e é econômico, no entanto, níveis de anticorpos séricos não são detectáveis neste teste até os primeiros quarenta e cinco dias do início da infecção. Esta janela imunológica pode produzir resultados falso-negativos, o que pode contribuir significativamente para a manutenção da enfermidade nos rebanhos, uma vez que os animais infectados são permanentes fontes de infecção.

As consequências são grandes prejuízos aos proprietários e restrições de acesso ao mercado internacional. O rebanho equídeo, que abrange equinos, asininos e muares é estimado em 8 milhões de cabeças no Brasil (IBGE, 2010). Os animais são utilizados em atividades agropecuárias, militares, esportivas, recreativas, no transporte de pessoas e produtos, e até no tratamento de doenças humanas, através da equoterapia. A AIE é hoje um grande obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, por se tratar de uma doença incurável e sem previsão de vacina disponível até o momento.

Os primeiros anticorpos que aparecem no sangue do animal infectado são contra as glicoproteínas de superfície do VAIE (*gp45*, *gp90*), sendo detectados nos primeiros dias de infecção. Entretanto, estas proteínas sofrem modificações na sua conformação, o que promove um temporário escape do agente viral frente às células de defesa do animal. O segundo grupo de anticorpos detectáveis se dá contra a proteína *p26* do VAIE. Esta proteína é bastante imunogênica e bem conservada entre as diversas cepas virais de localizações geográficas diferentes. No exame sorológico IDGA, a resposta imunológica está eminentemente voltada

contra a proteína *p26* do VAIE. No ELISA, dois dos três kits comercializados para diagnóstico de AIE nos EUA utilizam apenas a *p26* como antígeno.

O ELISA é um teste mais sensível que o IDGA, fácil de ser executado, passível de automação e possibilita o exame de grande número de amostras utilizando mínimas quantidades de reagentes. Variações nos ensaios de ELISA como a utilização da proteína G podem minimizar reações de *background* e resultados falso-positivos que ocorrem devido à baixa especificidade do teste. Um ELISA utilizando *gp90* recombinante foi desenvolvido por REIS (1997) e demonstrou ser mais eficiente do que o ELISA com antígeno *p26* (SILVA et al., 2003), pois detectou anticorpos mais precocemente. O teste apresentou boa correlação com os resultados do IDGA e foi recomendado como teste de triagem em levantamentos sorológicos (MARTINS, 2004). Outros pesquisadores também vêm desenvolvendo diferentes antígenos recombinantes para serem utilizados em ELISAs (PIZA et al., 2007; REIS et al., 2012; COUTINHO et al., 2013).

Em consonância com os preceitos da bioética e da biossegurança, a produção de um antígeno recombinante pode eliminar o uso de células animais e reduzir a quantidade de soro controle positivo que é colhido de equino naturalmente infectado pelo VAIE. Isto implica uso de menor número de animais, o que está de acordo com as normas de bem-estar animal; e na manipulação menos frequente de células e indivíduos infectados pelo vírus. A AIE apesar de não ser considerada zoonose, deve ser objeto de atenção, uma vez que seu agente causador é um vírus altamente mutável. Adicionalmente, sistemas recombinantes podem produzir proteínas com boa atividade biológica de maneira mais rápida e menos laboriosa que a produção de antígenos por cultivo celular.

O sistema de expressão em que se utilizam células da levedura *Pichia pastoris* como hospedeiras do DNA exógeno e replicadoras do DNA recombinante é considerado eficiente e com uma excelente relação custo/benefício. Além disso, estas leveduras são consideradas não patogênicas para mamíferos, o que constitui uma característica bastante desejável para imunodiagnósticos.

No intuito de contribuir com o controle da enfermidade, pioneiramente, realizou-se um estudo anterior onde foi produzida a proteína *p26* recombinante (*rp26*) do VAIE produzida na levedura *P.pastoris* vislumbrando seu uso como antígeno em ensaios imunológicos. No atual estudo descrevem-se os objetivos a seguir.

1.1 Objetivo geral

Estudar o potencial da proteína *rp26* produzida em *P. pastoris* como antígeno em imunoenaios no diagnóstico da AIE, bem como desenvolver e avaliar um ELISA indireto (iELISA) utilizando o antígeno produzido.

1.2 Objetivos específicos

1.2.1. Testar o antígeno *rp26* no IDGA, ELISA e *immunoblots*.

1.2.2. Padronizar o iELISA.

1.2.3. Avaliar o iELISA comparando-o com o teste padrão IDGA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Antes de iniciar esta seção são necessários alguns esclarecimentos quanto à organização da mesma. No trabalho de Mestrado (COUTINHO, 2011) foi descrita revisão bibliográfica detalhada sobre os diversos temas envolvidos nestes projetos. Portanto, somente temas complementares envolvidos no projeto de doutorado serão abordados. Parte dos textos elaborados na dissertação foi utilizada para compor a revisão bibliográfica sobre AIE, presente nesta tese. Além desta revisão, a outra publicação prevista é a padronização e avaliação do iELISA.

Para melhor situar o leitor, descreve-se os principais resultados obtidos no Mestrado, a saber: síntese do gene *p26* do VAIE otimizado para expressão na levedura *P. pastoris*; clonagem no vetor de expressão pPICZ α A; seleção dos clones quanto à presença do cassete de expressão pPICZ α Ap26 integrado ao genoma da levedura por PCR de colônia; mini-indução e imunodeteção da proteína heteróloga a partir do sobrenadante, através de *Dot Blot*, contra anticorpo anti-HIS; seleção de clones que apresentaram reação mais intensa para seus cultivos em maiores volumes. A partir destes resultados iniciou-se o trabalho de Doutorado.

2.1. Caracterização e mecanismos virais

A análise de VAIE por microscopia eletrônica revela partículas virais ovais ou circulares com cerca de 115 nm de diâmetro. O núcleo lentiviral é tipicamente cônico e envolto por uma matriz proteica delimitada por membrana lipídica, contendo numerosas projeções de 6-8 nm (MATHEKA et al., 1976; WEILAND et al., 1977; COOK et al., 2013) (fig.1). O RNA do VAIE é pequeno e geneticamente simples, composto por três genes codificantes para proteínas estruturais e não estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e por três fases abertas de leitura que codificam proteínas de regulação do VAIE (*tat*, *rev* e *S2*) e por sequências terminais repetidas longas (*LTRs*) que são ponto de partida para o início da transcrição. A montagem das proteínas *gag* é essencial no ciclo de replicação do vírus, pois está relacionada à fase de brotamento das novas partículas virais na célula hospedeira.

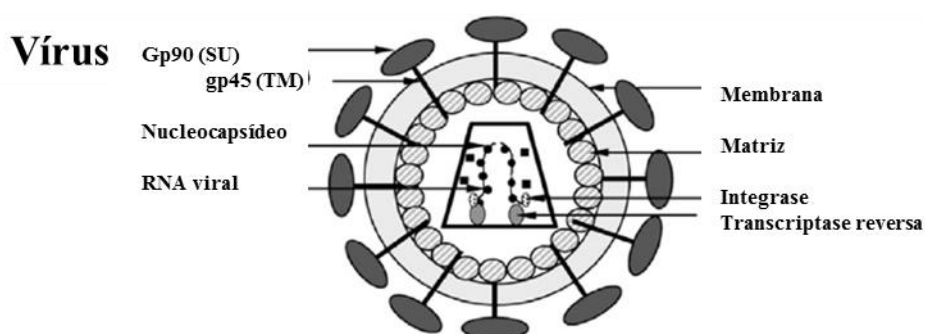


Figura 1. Modelo de partícula viral apresentando prováveis localizações das mais importantes estruturas antigênicas do VAIE.

Fonte: Traduzido a partir de Cook et al. (2013).

A poliproteína precursora *Pr55gag* de 55 Kilodaltons (KDa) é clivada pela protease viral do vírion maduro em quatro principais proteínas estruturais internas não glicosiladas: *p15* (transmembrana), *p26* (capsídeo), *p11* e *p9* (nucleocapsídeo) (fig.2). A *Pr 55* codifica unidades de montagem e brotamento do vírus, e as pequenas regiões de transcrição tardia codificam proteínas que mediam a capacidade daquelas estruturas proteicas se ligarem à membrana celular e induzirem a etapa final de segregação e fixação da partícula viral nascente. O brotamento do vírus na célula hospedeira exige cisão da membrana (STEPHENS et al., 1986; HUSSAIN et al., 1988). A clivagem do precursor *Pr180 gag/pol* produz o gene *pol*, que codifica proteínas com diversas atividades enzimáticas, incluindo a transcriptase

reversa (*p66*), uma protease viral (*p12*) para o processamento das proteínas, uma dUTPase (*p15*) essencial para replicação do VAIE em macrófagos, e ainda uma integrase (LEROUX et al., 2004).

A organização geral do gene *env* é semelhante à descrita para outros retrovírus onde são codificadas glicoproteínas de superfície (*gp90*) e transmembrana (*gp45*), que também montam a estrutura antigênica do VAIE. A *gp90* pode interagir com receptores de membrana ainda desconhecidos e ser altamente glicosilada. Esta glicoproteína é submetida a uma rápida “evolução” durante o curso da doença, fato que pode estar relacionado à natureza periódica da doença, onde a produção sequencial e liberação de novas cepas antigênicas do vírus promovem o escape temporário do agente viral frente à atuação do sistema imunológico (MONTELARO et al., 1982; LEROUX et al., 2004).

Transcrição

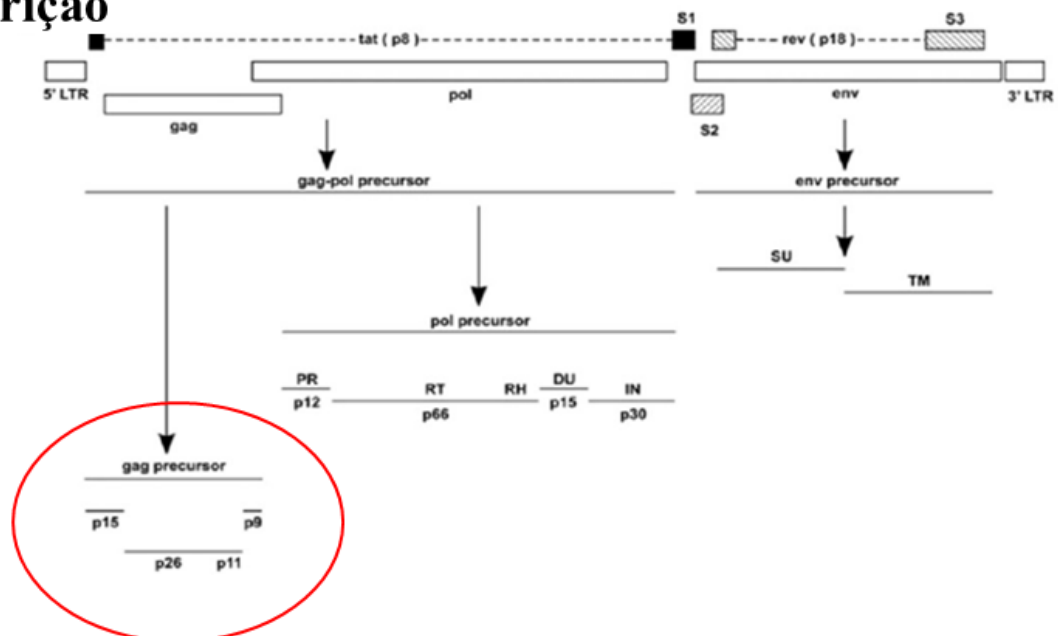


Figura 2. Organização genômica proviral (VAIE).
Fonte: Cook et al. (2013). Adaptado.

As *LTRs* contêm três segmentos: *U3* (3' end, único), *R* (repetido) e *U5* (5' end, único). O *U3* contém vários segmentos importantes para transcrição viral. Os promotores lentivirais são regulados pelo DNA celular que interage com motivos específicos sobre as *LTRs*. A atividade transcricional das *LTRs* é basal e sua ativação está sob controle de *tat*, que é um transativador de transcrição de proteínas (CARVALHO e DERSE, 1993).

A replicação viral ocorre em duas fases, a primeira inicia-se pela interação da glicoproteína de superfície do vírus com receptores específicos nas células alvo, que neste caso são os macrófagos ou monócitos. Interações com receptores lentivirais celulares equinos 1 (*ELR1*) têm demonstrado serem as responsáveis pela interiorização do vírus. O evento de ligação desencadeia a fusão da membrana viral com a membrana plasmática e a partir daí a internalização do vírus em um endossomo. Nos vírus endocitados, eventos endossomais subsequentes levam à fusão da membrana viral com a vesícula, liberando partícula do núcleo para o citoplasma. As células utilizam vários mecanismos de endocitose para pegar os nutrientes de seu ambiente e o vírus usurpa estes mecanismos de internalização (ZHANG et al., 2005).

A segunda fase envolve a síntese e processamento de mRNAs e proteínas virais. Nas duas fases o vírus se utiliza da maquinaria celular de transcrição e processamento de mRNAs. Dentro da célula o vírus é parcialmente desnudo e o RNA viral é copiado pela transcriptase reversa gerando uma fita dupla do DNA do genoma do VAIE. O DNA proviral é então integrado ao genoma celular pelas porções terminais dos *LTRs*, mediado pela integrase viral (FLORES, 2007).

Os promotores lentivirais são então regulados pelo DNA de ligação celular que interage com motivos específicos sobre as *LTRs*. O promotor do VAIE é regulado positivamente por um elemento rico em purina 1 (*PUI*) (CARVALHO e DERSE., 1993). A expressão de *PUI* é normalmente restrita ao sistema hematopoiético, sendo absolutamente necessário para a geração de linfócitos B e macrófagos, destino natural da infecção pelo VAIE (LLOBERAS et al., 1999). Durante os episódios febris o VAIE se replica predominantemente nos macrófagos maduros no baço, fígado, linfonodo, pulmões, rins e na glândula adrenal (SELLON et al., 1994; SELLON et al., 1996).

2.2. Variabilidade genética do VAIE

Desde que foi proposta a hipótese de que os episódios recorrentes de febre ocorridos nos animais infectados com VAIE estavam associados a sua variação antigênica (KONO et al., 1973) alguns estudos foram realizados (LEROUX et al., 1997; HOWE et al., 2002; SPONSELLER et al., 2007) com intuito de elucidar mecanismos complexos de escape do sistema imune realizado por este lentivírus. Os primeiros anticorpos produzidos são direcionados contra as glicoproteínas de superfície, especificamente a *gp90*, cujos títulos chegam a ser 10^2 - 10^3 mais altos que os anticorpos produzidos contra a *p26* (MONTELARO et al., 1984; ISSEL et al., 1988; O' ROURKE et al., 1988). No entanto, por uma questão de pressão imunológica, estas glicoproteínas sofrem frequentes mudanças no processo de glicosilação o que resulta em mecanismos de escape viral (CHENG-MAYER et al., 1999; WEI et al., 2003). Associado a isso, o processo de glicosilação pode simplesmente mascarar epítomos de neutralização imune, especificamente quando se trata de *asparagine-linked glycans (N-glycans)* (KWONG et al., 2002; SPONSELLER et al., 2012). Tais fatos devem ser considerados quando se define qual proteína deverá ser utilizada em ensaios diagnósticos. Por outro lado estudos utilizando peptídeos sintéticos demonstraram que na região carboxi-terminal (C-terminal) da proteína *gp90* do VAIE existem regiões altamente conservadas e epítomos imunodominantes que reagem com anticorpos não neutralizantes (PALKER et al., 1988). Já a região amino-terminal, apesar de também apresentar poucas áreas de imunodominância, o padrão de reatividade tanto experimental quanto por infecção natural, sugere intensa variação antigênica e estrutural entre as cepas (PAYNE et al., 1989, COOK et al., 2013).

O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína *p26*, sendo observado do décimo ao décimo quarto dia após a infecção, quando atinge rapidamente um pico de concentração, mas, com valores inferiores aos observados para *gp90* (MONTELARO et al., 1993). Do ponto de vista quantitativo a principal proteína viral é a *p26*, que representa cerca de 40% do total das proteínas virais. Esta proteína é conservada entre as diferentes amostras virais avaliadas, diferentemente das glicoproteínas, que são passíveis de altas taxas de mutação (CHEN e MONTELARO, 2003; LEROUX et al., 2004). Como são proteínas que não sofrem pressão de seleção imune tão intensa quanto às proteínas da região *env*, elas terminam sendo menos propensas a variações nas suas sequências genéticas (COOK et al., 2013). A proteína *p26* foi considerada bem conservada entre diversas cepas virais de localizações geográficas diferentes, com um máximo de 12% de variabilidade entre as linhagens (ZHANG et al., 1999). Entretanto, alguns estudos mais recentes identificaram

diferenças significativas nas sequências nucleotídicas ao longo do gene *gag* em diferentes isolados do VAIE, correspondentes às distintas regiões geográficas (QUINLIVAN et al., 2007; BOLDBAATAR et al., 2013). Atualmente, considera-se que, embora haja variações significativas, esta região gênica do VAIE demonstra extensa conservação de importantes motivos estruturais e/ou funcionais (CAPELLI et al., 2011; CAPOMACCIO et al., 2012).

2.3 Patologia e resposta imunológica

Os sinais clínicos da AIE variam de acordo com a dose infectante, virulência da amostra viral e susceptibilidade individual do hospedeiro (SELLON, 1993). A maior parte dos animais infectados nunca demonstra os sinais clínicos, apesar da infecção persistente (ISSEL e COGGINS, 1979).

O VAIE é o único no grupo dos lentivírus que provoca febre aguda inicial entre 40 e 41° C, com viremia associada, seguida por ciclos recorrentes da doença e período assintomático prolongado (COOK et al., 1996). Inicialmente os sinais clínicos são brandos e podem passar despercebidos (SELLON, 1994). A doença se manifesta clinicamente de diferentes formas, sendo possível a reversão de uma forma a outra a qualquer instante. É uma infecção persistente caracterizada por episódios periódicos de febre, hemorragias (McCLURE et al., 1982), trombocitopenia (CRAWFORD et al., 1996), leucopenia, supressão transitória da resposta imunológica (NEWMAN et al., 1991) e aumentos significativos nos níveis de cobre e de enzimas hepáticas (CLABOUGH, 1990). Distúrbios hematológicos são facilmente identificados através de sinais como palidez de mucosas, hemorragias petequiais, icterícia e edema nas regiões inferiores do corpo (COOK et al., 1996). Distúrbios neurológicos e lesões do sistema nervoso central têm sido associados à doença, podendo ser observados através de sinais clínicos como perda de peso, depressão, desorientação e andar em círculos (McILWRAITH e KITCHEN, 1978; McCLURE et al., 1982).

Os sinais clínicos associados com a fase aguda da doença são mediados por citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*), interleucina 6 (*IL-6*) e fator transformador de crescimento b (*TGF β*), que são liberados quando as cargas virais teciduais alcançam níveis limítrofes (COSTA et al., 1997; TORNQUIST e CRAWFORD, 1997; TORNQUIST et al., 1997; SELLON et al., 1999). Uma vez liberada a *IL-6* e *TNF*, ativa-se a cascata do ácido araquidônico com consequente liberação de prostaglandinas E2

(*PGE2*), iniciando então o quadro febril. Em equinos a trombocitopenia está associada à ação supressora de *TNF α /TGF β* em macrófagos (TORNQUIST e CRAWFORD, 1997). Já a anemia está relacionada à regulação negativa da eritropoiese por ação do *TNF α* (MOLDAWER et al., 1989; ZAMAI et al., 2000; DUFOUR et al., 2003; FELLI et al., 2005). Além disso, eritrócitos revestidos por C3 podem ser submetidos à fagocitose, evento que não só contribui para a anemia, mas também resulta na presença de grânulos de hemossiderina em macrófagos do fígado, baço e gânglios linfáticos (PERRYMAN et al., 1971; SENTSU e KONO, 1987). Cavalos infectados com o VAIE têm suas plaquetas destinadas à destruição por ação imunomediada. Esses processos resultam em esplenomegalia e hepatomegalia (BANKS et al., 1972; CLABOUGH et al., 1991).

Durante a fase crônica o título do VAIE não é estável, porém, é alto durante os picos febris. Cada episódio de viremia recorrente tem duração média de três a cinco dias, e o intervalo dos ciclos da doença é irregular podendo variar de semanas a meses. A frequência e a gravidade dos episódios geralmente declinam com o tempo e terminam no primeiro ano, quando os animais tornam-se geralmente assintomáticos, característica específica do VAIE, diferente das demais lentiviroses. Cavalos que estiveram assintomáticos por alguns meses ou anos podem apresentar episódios de febre após o tratamento com drogas imunossupressivas (KONO et al., 1976). Animais cronicamente infectados apresentam lesões glomerulares associadas à deposição de complexos antígeno-anticorpo (HENSON e McGUIRE, 1971; CHEEVERS e McGUIRE, 1985).

Atualmente, não se sabe se muarees são intrinsecamente resistentes à indução da doença ou se é uma questão de adaptação viral aos equinos, o que impediria sua plena replicação nestes híbridos (COOK et al., 2001; COOK et al., 2013). No entanto, achados clínico-patológicos e laboratoriais em muarees, mostram que tais indivíduos produzem sinais clínicos semelhantes ou mais brandos que os observados em equinos (SPYROU et al., 2003). Os asininos, apesar de serem susceptíveis ao VAIE, podem apresentar baixos níveis de viremia, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem os sinais clínicos da doença frequentemente (COOK et al., 2001).

2.4 IDGA

O IDGA é um método sorológico amplamente aceito e padronizado internacionalmente, que se baseia na detecção de anticorpos contra a *p26* (OIE, 2012). Soros de animais positivos formam uma linha de precipitação visível a olho nu em ágar-gel (fig.3a) decorrente da formação do complexo antígeno anticorpo (COGGINS et al., 1972). O método detecta anticorpos precipitantes entre 14 e 45 dias pós-infecção (ISSEL e COGGINS, 1979). Apesar da facilidade de execução e baixo custo, não é um teste rápido, pois a leitura é feita em 48 horas e requer experiência (SCICLUNA et al., 2013). Uma reação positiva muito fraca (*score*1) é considerada de difícil leitura e pode ser identificada como negativa na rotina de testes (fig. 3b e 4). Amostras sorológicas com este perfil podem ser confirmadas em *immunoblots*.

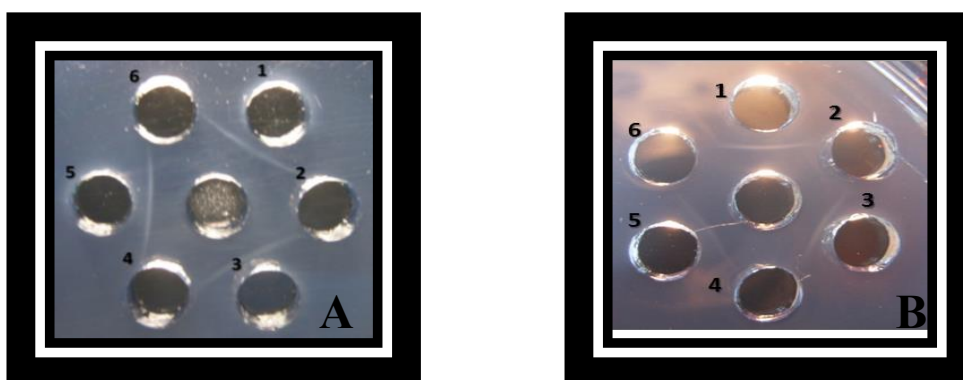


Figura 3. IDGA com antígeno viral *rp26*. Linhas de precipitação resultado de reação antígeno/anticorpo em placa de Petri com gel de agarose. (A) Poço central: antígeno *rp26*; poços 1, 3 e 5 : soro positivo do Kit Bruch; poços 2, 4 e 6: sem amostras. (B) Poço central: antígeno *rp26*; poços 1, 3 e 5: soro positivo (Biovetech) para AIE, não diluído, diluído 1: 1,5 e 1:2, respectivamente; poços 2, 4 e 6: soro positivo OIE 2x concentrado, não diluído e 2x diluído, respectivamente. Leitura realizada com 48 horas de reação. Observação de mínima quantidade detectável (sensibilidade analítica) no poço 6 da figura B.

Fonte: elaborada pelo autor.

Reações positivas



Fig. 4. Esquema de espectro de reações sorológicas no IDGA. A graduação de 1 a 5 devem ser consideradas como positivas no IDGA. O *score* 1 é considerado reação positiva muito fraca. Reações negativas são expressas como 0.

Fonte: Scicluna et al. (2013). Adaptado.

2.5 ELISA

Para que os primeiros ensaios de ELISA utilizados no diagnóstico da AIE ocorressem, avanços importantes em diversas áreas foram realizados. No começo dos anos 1950 um método de mensuração proteica foi desenvolvido (LOWRY et al., 1951). Mais de dez anos depois se iniciaram estudos e ensaios imunológicos para AIE (KONO e KOBAYASHI, 1966; HENSON et al., 1969). No início da década de 1970 o ELISA foi descrito como método quantitativo de anticorpos específicos realizado com antígenos adsorvidos em tubos (ENGEVALL et al., 1971; ENGEVALL e PERLMANN 1972). Neste mesmo período foram realizadas preparações de antígenos para diagnóstico de AIE (UEDA et al., 1973), bem como avanços nos métodos de conjugação anticorpos/enzimas (NAKANE e KAWAOI, 1974). Finalmente, em 1982, Voller e colaboradores descreveram o ELISA como técnica indicada para ensaios virológicos; no mesmo ano relatou-se um ELISA para diagnóstico da AIE (SUZUKI et al., 1982). Desde então muitos investigadores trabalharam diversas versões do ELISA com diferentes tipos de antígenos, recombinantes ou não, para o mesmo fim (SHANE et al., 1984; ARCHAMAULT et al., 1989; PIZA et al., 2007).

O ELISA tem como princípio a detecção de anticorpos através de reação com anticorpo secundário marcado com enzimas (peroxidase ou fosfatase alcalina). Trata-se de uma técnica largamente utilizada, que pode sofrer variações determinadas pela mudança de reagentes utilizados, constituindo diferentes tipos de ELISA, a saber: direto, indireto, sanduíche (com variações), competitivo e multiplex (KONEMAN, 2008).

Uma das variações do ELISA que pode ser usada para minimizar resultados falso-positivos, relacionada à grande sensibilidade do teste, é o uso da proteína G (ZANONI et al., 1989; LAMBERT et al., 1998) (Fig. 5). Esta proteína é um receptor bifuncional encontrado na superfície de bactérias como *Streptococcus* sp. Nativamente tais proteínas possuem grande afinidade com imunoglobulinas G (IgG) e com soro albumina (KRONVALL et al., 1973; ELIASSON et al., 1988). A proteína G foi engenheirada para perder seu sítio de ligação com a albumina, que é considerada um importante contaminante para fins diagnósticos. A forma recombinante da proteína G é comercializada para processos de imunoprecipitação, imunodeteção e purificação de proteínas recombinantes ou não, com fins diagnósticos (NILSSON et al., 1997). No ELISA indireto a proteína G conjugada a enzimas como peroxidase pode ser utilizada como substituta do anticorpo secundário, se ligando especificamente às IgG presentes no soro dos animais positivos testados. Outro benefício do

uso desta proteína como conjugado no ELISA é a minimização das reações de *background* (FICAPAL et al., 1995)

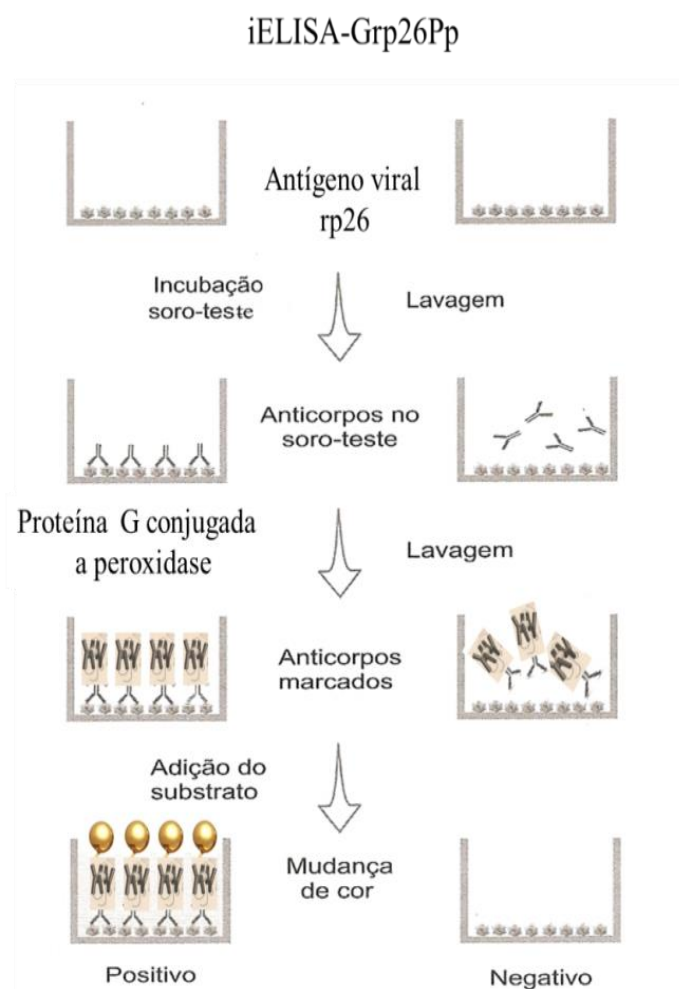


Figura 5. Esquema de ELISA indireto (iELISA-Grp26Pp).

Fonte: Flores, 2007. Adaptado.

Respostas imunológicas específicas contra *p26* (anti-*p26*) só se iniciam cerca de 15 dias pós-infecção (d.p.i.), mas ainda não são detectáveis no ELISA. Somente aos 40 d.p.i. é possível detectar imunoglobulinas anti-*p26* em equinos imunocompetentes infectados experimentalmente. Tais títulos chegam ao pico máximo com 3 meses pós-infecção e assim podem permanecer por longos períodos (Fig. 6).

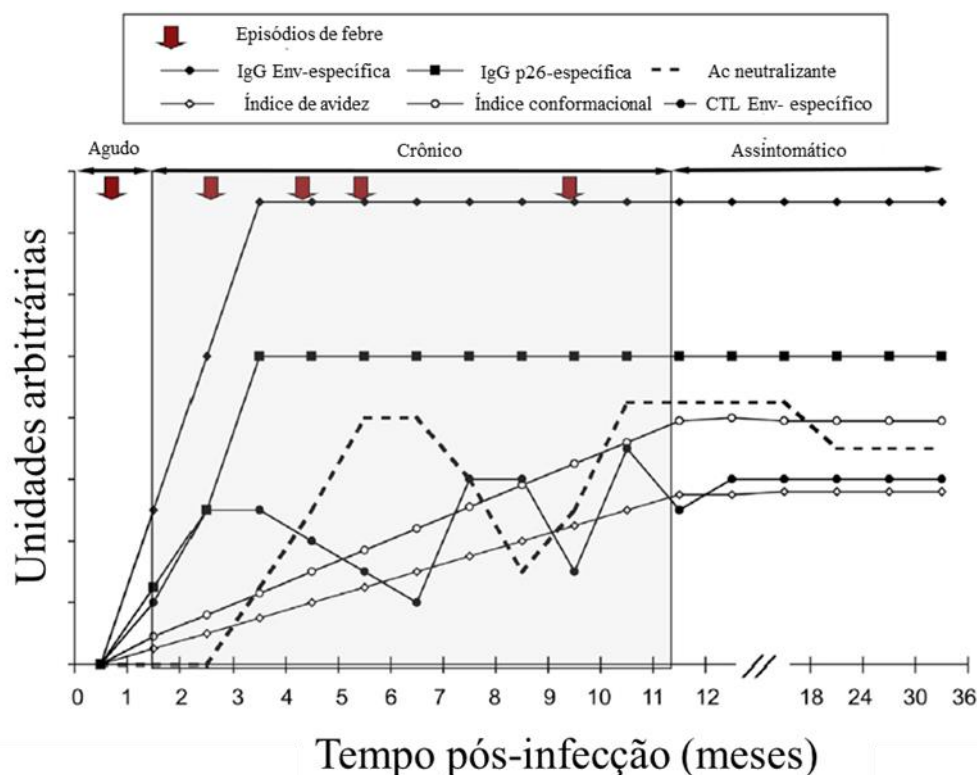


Figura 6. Cinética da resposta imune adaptativa em infecção experimental de VAIE em equino. Respostas imune humoral relacionado a anticorpos (Ac) neutralizantes: níveis de IgG Env-específicos e p26-específicos. Níveis de avides de imunoglobulina, atividade de linfócitos T citotóxicos (CTL) Env-específica e mensuração de dependência conformacional, também são mostrados.

Fonte: Hammond et al., 1997 adaptado por Cook et al., 2013. Traduzido pela autora.

2.6. Utilização de *Pichia pastoris* para produção de p26 do VAIE

A produção de proteínas virais obtidas a partir de cultivo celular, além de ter custo mais elevado, requer um número de etapas de produção que pode chegar a ser dez vezes maior que a produção de antígenos recombinantes. Adicionalmente, a presença de proteínas do soro bovino ou advindas de células do hospedeiro utilizadas para o cultivo, contribui para a obtenção de resultados conflitantes em imunoenaios (KIM et al., 1992; LANGEMEIER et al., 1996).

Em relação aos sistemas de produção de antígenos recombinantes, os que utilizam células de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) são os mais utilizados, pois são considerados econômicos. No entanto, oferece certas dificuldades, como não processar completamente a cadeia peptídica sintetizada, o que limita os tipos de proteínas que podem ser expressas nesse

sistema (MAJERLE et al., 1999). Os dobramentos proteicos incorretos estão relacionados à degradação da proteína no citoplasma. Células de procariotos não possuem grandes quantidades de chaperonas, cuja função é auxiliar o enovelamento proteico encaminhando a proteína de configuração inadequada à degradação (COLE, 1996). Assim, muitas proteínas produzidas neste sistema não conseguem desempenhar suas funções por erro de enovelamento. Adicionalmente, altos níveis de expressão citoplasmática, comuns em sistemas que utilizam células de procariotos, promovem a formação de agregados proteicos insolúveis chamados corpúsculos de inclusão (DALY e HEARN, 2005). Além disso, procariotos não são capazes de realizar algumas modificações pós-traducionais importantes como glicosilação, fato que pode alterar a função de certas proteínas (MELDGAARD e SVENDSEN, 1994). Por outro lado, algumas estruturas proteicas primárias são capazes de induzir resposta imunológica, formando complexo antígeno-anticorpo. Assim, torna-se possível obter resultados satisfatórios em ensaios imunológicos que utilizam proteínas glicosiladas como antígenos, mesmo sendo produzidas em sistemas de expressão com procariotos (JENKINS et al., 1996).

A proteína recombinante *p26* do capsídeo do VAIE proveniente de síntese com sistema em *E.colie* purificada foi observada com duas diferentes formas cristalográfica. Estas estruturas foram determinadas e examinadas em detalhe quanto às associações oligoméricas e posições de domínio. Uma se caracteriza por cristais cúbicos formando tetrâmeros a partir de dois pares de dímeros com quatro pontes dissulfeto. E a outra é formada por estruturas similares a cristais hexagonais de tetrâmeros com dois domínios C-terminais vizinhos, com seis pontes dissulfeto. As duas formas cristalográficas da proteína têm em comum uma interface antiparalela de quatro hélices referente a dois pares de dímeros com domínios N-terminais. Dois pares de dímeros fracamente associados formam tetrâmeros em uma das duas formas cristalográficas os tetrâmeros são ligados através de dimerização dos domínios C-terminal (JIN et al., 1999).

O ambiente intracelular tem um caráter redutor onde dificilmente ocorre a oxidação das proteínas, fato que prejudica a formação de pontes dissulfetos, uma vez que estas se tornam instáveis em ambientes redutores (KADOKURA, 2003). As pontes dissulfetos são muito importantes na manutenção da estrutura proteica no ambiente extracelular, devendo ser preservadas para que o enovelamento proteico se mantenha o mais próximo possível da estrutura nativa, fato que contribui para atividade biológica da proteína (SIDDIQUI et al., 2005). A produção de proteínas, que dependem das pontes dissulfeto para a sua estabilidade,

tem sido considerada difícil em *E. coli*. O pequeno citoplasma procariótico prejudica a formação da ligação dissulfeto no compartimento subcelular. Em células eucarióticas tais ligações são formadas no ambiente oxidante do retículo endoplasmático durante o processo de exportação. Bactérias não possuem um compartimento subcelular especializado semelhante, mas possuem um sistema de exportação e atividades enzimáticas capaz de formar e controlar a qualidade das pontes dissulfeto no periplasma oxidante (KADOKURA, 2003). Marco (2009) relatou o desenvolvimento de estratégias que visavam explorar os mecanismos fisiológicos de bactérias, a fim de produzir proteínas ligadas por pontes dissulfeto adequadamente enoveladas.

Mesmo não possuindo citoplasma tão grande e desenvolvido quanto às células de eucariotos superiores, a levedura *Pichia pastoris* possui um padrão de beneficiamento proteico muito próximo das células de mamíferos, sendo capaz de processar sequência sinais, formar pontes dissulfeto, promover dobramentos e adicionar certos tipos de lipídeos e glicídeos à nova cadeia peptídica em formação (WHITE et al., 1994). Estas leveduras podem ser manipuladas por métodos genéticos clássicos com capacidade de produzir altos níveis de proteínas heterólogas intra e extracelularmente, além de atingir altas densidades em meios de baixo custo (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). No sistema com *P. pastoris* a expressão extracelular é bastante utilizada porque a levedura secreta baixo nível de proteínas nativas e, por isto, a purificação da proteína heteróloga se faz de maneira simples. A purificação das proteínas de secreção extracelular é considerada mais simples do que aquelas de expressão voltada para o interior da célula (REES et al., 1999).

A importância da utilização de *P. pastoris* na biotecnologia foi detalhadamente caracterizada em Coutinho (2011). Aqui, descrevem-se alguns aspectos importantes ainda não abordados no estudo anterior. Na natureza, *P. pastoris* além de competir com outros microrganismos que poderiam ser patogênicos para a planta, pode ainda produzir metabólitos que inibem a herbivoria e que são antagônicos aos seus competidores, tendo, portanto, uma relação mutualística com vegetais (PHAFF, 2001). Quanto à relação com animais, estas leveduras não são consideradas patogênicas, pelo contrário, atualmente são estudadas como probióticos para aves (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012), imunomoduladores e indutores de crescimento em suínos (PENG et al., 2014), e ainda como antimicrobiano (FRANÇA et al., 2009).

Diante do exposto, considera-se que o uso de células de *Pichia pastoris* como sistema de produção de proteínas recombinantes é bastante viável para as aplicações deste estudo. Os

resultados apresentados em Coutinho et al. (2013) demonstraram que a *rp26* produzida pelo sistema *P. pastoris* foi secretada e recuperada por um simples processo de diálise. Relatam ainda que, mesmo após 12 meses de estocagem, a proteína *rp26* manteve sua atividade biológica, sugerindo que o ambiente extracelular no qual a *rp26* ficou albergada e que os mecanismos de estabilização proteica utilizados foram suficientes na manutenção desta bioatividade, para o uso descrito.

2.7 Avaliação de métodos diagnósticos

O objetivo desta seção é o esclarecimento mais detalhado dos conceitos e critérios de avaliação utilizados neste estudo, de acordo com Princípios de validação de ensaios diagnósticos para doenças infecciosas da OIE (OIE, 2004).

Para classificar indivíduos de uma população, referente à presença ou ausência de uma determinada enfermidade, faz-se necessário a utilização de uma prova indireta. No entanto, é preciso que esta prova seja validada. Esta validação tem por objetivo avaliar se a prova utilizada é realmente capaz de atingir o objetivo a que se propõe. Um teste validado pode ser utilizado para traçar um perfil da situação de uma determinada doença em um país ou região, evitando sua propagação. Pode também ter a finalidade de erradicação de uma infecção, confirmação de diagnóstico de casos clínicos, estimativa de prevalência, estado imunológico ou pós-vacinal do rebanho, adoção de medidas de controle e classificação. Os dois parâmetros relativos utilizados para isso são a sensibilidade e especificidade, que indicam os indivíduos verdadeiramente positivos e os verdadeiramente negativos, respectivamente. A validade de uma prova diagnóstica deve refletir sua capacidade de proporcionar resultados mais próximos da realidade daquilo que se está avaliando. Para isso, através de uma análise populacional, são requeridas as seguintes informações: resultados dos testes durante um determinado período de tempo, resultados de inspeções macroscópicas de necropsias, exames histopatológicos e provas de isolamento e cultivo laboratoriais. A correlação de todos estes dados, juntamente com a análise do comportamento da doença na população estudada, dará subsídio para a classificação.

Algumas situações são capazes de interferir nos resultados das classificações determinando uma margem de erro. As reações inespecíficas são as principais causas para a ocorrência de falsos positivos. Quanto à classificação de indivíduos falsos negativos, fatores

como período pré-patente, animais em adiantado estado de caquexia ou infecções intercorrentes são decisivos. Uma prova é considerada ideal quando possui alta especificidade e alta sensibilidade. Cálculos matemáticos relacionando todas as classificações possíveis em uma população são capazes de identificar percentuais de sensibilidade e especificidade de uma prova. As etapas de um ensaio de validação são cinco:

- 2.7.1 Determinação da viabilidade do método para um uso específico;
- 2.7.2 Desenvolvimento do ensaio e normalização;
- 2.7.3 Determinação de características do ensaio de desempenho;
- 2.7.4 Acompanhamento contínuo do desempenho do ensaio e manutenção;
- 2.7.5 Melhoria dos critérios de validação durante o uso rotineiro do ensaio.

2.7.1. Determinação da viabilidade do método para um uso específico

Os estudos de viabilidade são a primeira etapa de validação de um novo ensaio, tendo a finalidade de determinar quais reagentes e protocolos ótimos serão utilizados, a fim de garantir uma mínima capacidade de aplicação. Estes estudos fornecem também estimativas de repetibilidade, sensibilidade analítica e especificidade. A repetibilidade relaciona-se ao grau de concordância dos resultados obtidos nas repetições dentro do ensaio e entre suas execuções. A sensibilidade analítica do ensaio é a menor quantidade detectável do analito em questão, e indica, por exemplo, a diluição do soro em que um anticorpo não é mais detectável. Já a especificidade analítica é o grau em que o ensaio não reage de forma cruzada com outros analitos, sendo determinada através do uso de um painel de soros provenientes de animais que sofreram infecções relacionadas e que podem estimular anticorpos reativos.

2.7.2. Desenvolvimento do ensaio e normalização

Compõe-se de três etapas importantes: otimização, escolha, e normalização dos reagentes, técnicas e métodos. Primeiramente deve-se fazer a seleção de concentração ótima dos reagentes e parâmetros de protocolo, como determinação do tempo, variáveis químicas e físicas e equipamentos. Em seguida realizam-se estimativas de repetibilidade (preliminar) através da determinação de coeficientes de variação (CV), desvio-padrão e média de repetições.

2.7.3. Determinação de características do desempenho do ensaio

Indica se o ensaio tem potencial para aplicação em campo. Alguns dos quesitos desta etapa são as estimativas de precisão, repetibilidade e reprodutibilidade. A reprodutibilidade é a quantidade de concordância entre os resultados das mesmas amostras testadas em laboratórios diferentes. A precisão é o grau de concordância entre um valor experimental e o valor esperado para um analito, em uma amostra padrão de atividade conhecida (por exemplo, título ou concentração).

Outras características observadas são:

a) Seleção do ponto de corte

Para atingir as estimativas de sensibilidade e especificidade de um ensaio, os resultados da prova devem ser reduzidos à categoria de positivo e negativo, estabelecendo um ponto de corte ou limite de decisão na escala contínua dos resultados do teste. Para sua definição pode-se utilizar três abordagens: distribuição de frequência dos resultados dos testes-referência (animais infectados e não infectados) ou apenas em animais de referência não infectados; e um terceiro método que proporciona um ponto de corte intrínseco com base nos resultados do teste de soros sorteados a partir da população-alvo, sem conhecimento prévio da infecção dos animais. Este ponto de corte pode ser obtido por inspeção visual, pelo receptor-operador, ou pela seleção, que favorece tanto a especificidade quanto a sensibilidade, dependendo do uso pretendido para cada ensaio.

b) Especificidade diagnóstica de (D_{Sp})

Proporção dos que obtiveram resposta negativa no teste entre aqueles que não possuem a doença. Devem classificar sem erros, infectados/não infectados e obter precisão, repetibilidade, reprodutibilidade e acurácia.

c) Sensibilidade diagnóstica (D_{Se})

Proporção dos que obtiveram resposta positiva no teste entre aqueles que possuem a doença; estabelecimento do limiar positivo/negativo.

2.7.4 Acompanhamento contínuo do desempenho do ensaio e manutenção

A interpretação dos resultados do ensaio é um dos fatores que afetam a validade do teste, e só é útil se suas conclusões forem precisas. Valor preditivo é a probabilidade de um

indivíduo ser realmente positivo ou negativo, conforme o resultado obtido. Está relacionado ao tamanho da população em questão e à prevalência da doença. Um teste tem sua capacidade preditiva positiva diminuída se a população tiver um nível muito baixo de infecção.

2.7.5 Melhoria dos critérios de validação durante o uso rotineiro do ensaio

Um ensaio validado precisa ser monitorado constantemente a fim de se avaliar repetibilidade e precisão. Deve-se ainda realizar análise de reprodutibilidade do teste em diferentes laboratórios ao menos duas vezes por ano. Um controle externo pode ser realizado por um laboratório de referência, que faz nova análise e confronta com os resultados obtidos inicialmente.

Se os resultados de um ensaio se mantiverem dentro dos limites aceitáveis e mostrarem evidências de precisão e reprodutibilidade, as agências governamentais ou laboratórios de referência poderão definir o laboratório onde foi realizado o ensaio como oficial para este teste. Quando o objetivo do ensaio é a utilização em uma região geográfica completamente diferente, é essencial a revalidação do teste, submetendo-o à nova população de animais a ser testada. O mesmo deve ser feito para o estabelecimento de DSe e DSp para subpopulações, por exemplo, grupos de idade e vacinados/não-vacinados.

3 REFERÊNCIAS

- ARCHAMBAULT D., WANG Z., LACAL J.C., GAZIT A., YANIV A., DAHLBERG J.E., TRONICK S.R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p. 1167–1173, 1989.
- BANKS, K.L., HENSON, J.B., MCGUIRE, T.C. Immunologically mediated glomerulitis of horses. Pathogenesis in persistent infection by equine infectious anemia virus. **Laboratory Investigation**, v. 26, p. 701–707, 1972.
- BOLDBAATAR, B., BAZARTSEREN, T., KOBAYASHI, R., MURAKAMI, H., OGUMA, K., MURAKAMI, K., SENTSU, H. Amplification of complete gag gene sequences from geographically distinct equine infectious anemia virus isolates. **Journal of Virological Methods**. v. 189, p. 41-46, 2013.
- CAPPELLI, K., CAPOMACCIO, S., COOK, F.R., FELICETTI, M., MARENZONI, M.L., COPPOLA, G., VERINI-SUPLIZI, A., COLETTI, M., PASSAMONTI, F., Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, p. 27–33, 2011.
- CAPOMACCIO, S., WILLAND, Z.A., COOK, S.J., ISSEL, C.J., SANTOS, E.M., REIS, J.K., COOK, R.F. Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. **Veterinary Microbiology**, v.157, p. 320–332, 2012.
- CARVALHO M., DERSE D., Physical and functional characterization of transcriptional control elements in the equine infectious anemia virus promoter, **Journal of Virology**, v. 67, p. 2064–2074, 1993.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M. et al. A Labelled Avidin-Biotin ELISA to Detect Antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis Virus in Goats Sera. **Vet. Res. Commun.**, v. 23, p. 512-522, 1999.
- CHEEVERS, W.P., MCGUIRE, T.C. Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. **Reviews of Infectious Diseases** v.7, p. 83–88. 1985.
- CHENG-MAYER C, BROWN A, HAROUSE J, LUCIW PA, MAYER AJ: Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVsf33a variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify n-linked glycosylation. **Journal of Virology**, p.73, v. 5294–5300, 1999.
- CLABOUGH, D.L. The immunopathogenesis and control of equine infectious anemia. *Veterinary Medicine*, n. 85, p. 1020–1028, 1990.
- CLABOUGH, D.L., GEBHARD, D., FLAHERTY, M.T., WHETTER, L.E., PERRY, S.T., COGGINS, L., FULLER, F.J. Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v. 65, p. 6242–6251, 1991.

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

COLE K.S., ROWLES J.L., JAGERSKI B.A., MURPHEY-CORB M., UNANGST T., CLEMENTS J.E., ROBINSON J., WYAND M.S., DESROSIERS R.C., MONTELARO R.C., Evolution of envelop specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity, **Journal of Virology**, v. 71, p. 5069–5079, 1997.

COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia. In: Studdert, M.J. (Ed.), *Virus Infections of Equines*. **Elsevier**, Amsterdam, p. 297–323, 1996.

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

COOK, R.F., LEROUX, C., ISSEL, C.J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. **Veterinary Microbiology**. 2013.

COSTA, L.R., SANTOS, I.K., ISSEL, C.J., MONTELARO, R.C., Tumor necrosis factor- α production and disease severity after immunization with enriched major core protein (*p26*) and/or infection with equine infectious anemia virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.57, p. 33–47, 1997.

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

COUTINHO, L. C. de A. Produção da proteína *p26* do vírus da Anemia Infecciosa Equina em levedura *Pichia pastoris*. 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011.

CRAWFORD, T.B.; WARDROP, K.J.; TORNQUIST, S.J.; REILICH, E.; MEYERS, K.M.; MCGUIRE, T.C. A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. **Journal of Virology**, v.70, n.11, p.7842-7850, 1996.

CURVELO, M. R. G. R. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL NO ESTADO DA BAHIA. 2014. Dissertação (Mestrado profissional em Defesa Agropecuária do Centro de ciências agrárias, ambientais e biológicas)- Universidade Federal do Recôncavo, Bahia, 2014.

DALY R.; HEARN, M. T.W. Expression of Heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal Molecular Recognition** 18: 119-138, 2005.

DUFOUR, C., CORCIONE, A., SVAHN, J., HAUPT, R., POGGI, V., BEKA'SSY, A.N., SCIME, R., PISTORIO, A., PISTOIA, V. TNF- α and IFN- γ are overexpressed

in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF α suppresses erythropoiesis in vitro. **Blood**, v. 102, p. 2053–2059, 2003.

ELIASSON, M., OLSSON, A., PALMCRANTZ, E., WIBERG, K., et al., Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. **J. Biological Chemistry**, v.263, p. 4323-4327, 1988.

ENGEVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **The Journal of Immunology**, v. 109, p. 129-35, 1972.

ENGVALL, E., JONSSON, K., PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. 2. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin g, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, v. 252 , p. 427-434, 1971.

FELLI, N., PEDINI, F., ZEUNER, A., PETRUCCI, E., TESTA, U., CONTICELLO, C., BIFFONI, M., DI CATALDO, A., WINKLES, J.A., PESCHLE, C., DE MARIA, R. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. **Journal of Immunology**. v.175,p. 1464–1472, 2005.

FICAPAL, A., ALONSO-URMENETA, B., VELASCO, J., MORIYÓN, I., BLASCO, J. M. Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. **Veterinary Record**. v. 137, p. 145-147, 1995.

FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007.

FRANÇA, R. C., CORRÊA, M. S., MENDONÇA, M., SILVA, V. S., CASTELLI, R. M., HAUBERT, L., CONCEIÇÃO, F., R., MOREIRA, A. N., SILVA, W. P. Inibição do crescimento in vitro de *Salmonella Typhimurium* por *Pichia pastoris*. CIC XI ENPOS, I MOSTRA CIENTÍFICA. 2009.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y., RODRÍGUEZ, Z., BRANDÃO, L. R., ROSA, C.A., NICOLI, J. R., IGLESIAS, A.E., PÉREZ-SANCHEZ, T., BOUCOURT, R. S., HALAIHEI, N. Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 798-802, 2012.

HAMMOND, S.A., COOK, S.J., LICHTENSTEIN, D.L., ISSEL, C.J., MONTELARO, R.C. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3840–3852, 1997.

HENSON, J.B., MCGUIRE, T.C. Immunopathology of equine infectious anemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 306–313, 1971.

HENSON, J.B. GORHAM, J.R., KOBAYASHI, K., MCGUIRE, T.C. Immunity in equine infectious anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p. 336-343, 1969.

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

HUSSAIN, K. A.; ISSEL C. J.; RWAMBO P. M.; ARNIZAUT A. B.; BALL J. M.; SCHNORR K. L.; MONTELARO R. C. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, *p26*, **Journal of General Virology**. v. 69, p. 1719–1724, 1988.

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

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

JENKINS N, PAREKH RB, JAMES DC. Getting the glycosylation right—implications for the biotechnology industry. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 975–981, 1996.

JIN, Z.; JIN, L.; PETERSON D. L., LAWSON, C. L. J. Model for Lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV *p26*. **Molecular Biology**. 286: 83 – 93, 1999.

KADOKURA H, KATZEN F, BECKWITH J: Protein disulfide bond formation in prokaryotes. **Annual Review Biochemistry**, v.72, p. 111-135, 2003.

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

KONEMAN, E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KONO, Y., KOBAYASHI, K. Complement fixation test of equine infectious anemia. Specificity of the test. **Natl. Inst. Anim. Health**.v. 6, 194–203, 1966.

KONO, Y., KOBAYASHI, K., FUKUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. **Archive of Virology**, v. 41, p. 1-10, 1973.

KRONVALL, G. A surface component in group A, C and G Streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. **The Journal of Immunology**. v.111, p. 1401-1406, 1973.

KWONG, P. D., DOYLE, M.L., CASPER, D. J.C. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking or receptor-binding sites. **Nature**, v. 420, p. 678-682, 2002.

- LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P. et al. Detection of false-positive serum in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 70, p. 326-330, 1998.
- LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1481-1487, 1996.
- LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. **Journal Virology**, v.71, p.9627-9639, 1997.
- 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.
- LLOBERAS J., SOLER C., CELADA A., The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages, **Immunology Today**, v. 20, p. 184–189, 1999.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p. 265–275, 1951
- MACAULEY-PATRICK S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.
- MAJERLE A, KIDRIC J, JERALA R. Expression and refolding of functional fragments of the human lipopolysaccharide receptor CD14 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Express and Purification**, v. 17 p. 96–104, 1999.
- MARCO, A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 8p., 26, 1-18, 2009.
- MATHEKA, H.D., COGGINS, L., SHIVELY, J.N., NORCROSS, N.L. Purification and characterization of equine infectious anemia virus. **Archives of Virology**, v.51, p. 107–114, 1976.
- MCCLURE J.J., LINDSAY W.A., TAYLOR W., OCHOA R., ISSEL C.J., COULTER S.J. Ataxia in four horses with equine infectious anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association Chicago**, v.180, p.279-83, 1982.
- MCILWRAITH, C. W., KITCHEN, D. N. Neurologic signs and neuropathology associated with a case of equine infectious anemia. **Cornell Veterinary**, v. 68, p. 238-49, 1978.
- MELDGAARD M; SVENDSEN I. Different effects of n-glycosylation on the thermostability of highly homologous bacterial (1,3-1,4)-beta-glucanases secreted from yeast. **Microbiology**, v.140, p. 159–166, 1994.

- MOLDAWER, L.L., MARANO, M.A., WEI, H., FONG, Y., SILEN, M.L., KUO, G., MANOGUE, K.R., VLASSARA, H., COHEN, H., CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. **FASEB Journal**, v. 3, p. 1637–1643, 1989.
- MONTELARO, R. C.; LOHREY, N.; PAREKH, B.; BLANKENEY, E.W. E ISSEL, C. J.. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia. **Journal of Virology**, v. 42, p. 1029-1038, 1982.
- MONTELARO R.C., PAREKH B., ORREGO A. & ISSEL C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. **Journal of Biological Chemistry**, v.16, p.10539–10544, 1984.
- NAKANE P.K., KAWAOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.22, p.1084-91, 1974.
- NEWMAN, M.J.; ISSEL, C.J.; TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; HOROHOV, D.W.; MONTELARO, R.C. Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV). **Virology**, New York, v.184, p.55-66, 1991.
- NILSSON, J., STAHL, S., LUNDEBERG, J., UHLÉN, M. NYGREN, P., Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification and Immobilization of Recombinant Proteins.v. 11, p. 1-16, 1997.
- O’ROURKE, K., PERRYMAN, L.E., MCGUIRE, T.C., Antiviral, antiglycoprotein, and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anemia virus. **Journal General Virology**, v.69, p. 667–674, 1988.
- OIE, 2012. Equine Infectious Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th edition, pp. 866–870 (Chapter 2.5.6).
- OIE, 2012. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th edition, pp. 1–8 (Chapter 1.1.5).
- PALKER, T.J., CLARK, M.E., LANGLOIS, A.J., MATTHEWS, T.J., WEINHOLD, K.J., RANDALL, R.R., BOLOGNESI, D.P., HAYNES, B.F. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 85, p. 1932–1936, 1988.
- PAYNE, S.L., RUSHLOW, K., DHRUVA, B.R., ISSEL, C.J., MONTELARO, R.C. Localization of conserved and variable antigenic domains of equine infectious anemia virus envelope glycoproteins using recombinant env-encoded protein fragments produced in *Escherichia coli*. **Virology**, v. 172, p. 609–615, 1989.
- PENG, Z., WANG, A., FENG, O., WANG, Z., IVANOVA. I. V., HE, X., ZHANG, B., SONG, W. High-level expression, purification and characterization of porcine β -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potential as a cost-efficient growth promoter in porcine feed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.

PERRYMAN, L.E., MCGUIRE, T.C., BANKS, K.L., HENSON, J.B., Decreased C3 levels in a chronic virus infection: equine infectious anemia. **Journal of Immunology**, v. 106, p. 1074–1078, 1971.

PHAFF, H. J. Yeasts. University of California, USA. Encyclopedia of life sciences. **Nature Publishing Group** / www.els.net. 2011.

PIZA, A.S.T.; PERIRA, A.R.; TERRERAN, M.T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant *p26* viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. **Preventive Veterinary Medicine**, v.78, p.239-45, 2007.

QUINLIVAN, M., COOK, R.F., CULLINANE, A. Real-time quantitative RTPCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. **Vet. Rec.** v.160, p. 611–618, 2007.

REES, G.S. ,GEE, C.K., WARD, H.L., BALL, C., TARRANT, G.M., POOLE, S., BRISTOW, A. F. Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. **Europe Cytokine Netwok**, v. 10, p. 383–392, 1999.

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

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

SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSEL, K. E. Equine Infeccious Anemia Virus replication is upregulated during differenciantion of blood monocytes from acutely infected horses. **Journal of Virology**, v. 70, p.590-594, 1996.

SELLON, D.C., RUSSELL, K.E., MONROE, V.L., WALKER, K.M. Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. **Research in Veterinary Science**, v.66, p. 77–80, 1999.

SELLON, D. C. Equine Infeccious Anemia. **Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, v. 9, p.321-336, 1993.

SENTSUI, H., KONO, Y. Phagocytosis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus by cultivated horse leukocytes. **Archives of Virology**, v. 95, p. 67–77, 1987.

SHANE, B.S., ISSEL, C.J., MONTELARO, R.C., Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus *p26* antigen and antibody. **Journal Clinical Microbiology**, v. 19, p. 351–355, 1984.

- SIDDIQUI, K.S., POLJAK, A., GUILHAUS, M., FELLER, G. D'AMICO, S., GERDAY, C., CAVICCHIOLI, R. Role of Disulfide Bridges in the Activity and Stability of a Cold-Active α -Amylase. **Journal of bacteriology**, v. 187p. 6206–6212, 2005.
- SPONSELLER, B.A., SPARKS, W.O., WANNEMUEHLER, Y., LI, Y., ANTONS, A.K., OAKS, J.L., CARPENTER, S. Immune selection of equine infectious anemia virus env variants during the long-term inapparent stage of disease. **Virology**, v. 363, p. 156–165, 2007.
- SPONSELLER, B. A., CLARK, S.K., FRIEDRICH, A.R. Mechanisms of Equine Infectious Anemia Virus escape from neutralizing antibody responses from defined epitope specificity. **Viral Immunology**, v. 25, p. 324–328, 2012.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 49–59, 2003.
- STEPHENS R.M., Casey J.W., Rice N.R., Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus, **Science**, v. 231, p., 589–594, 1986.
- SUZUKI, T., UEDA, S., SAMEJIMA, T. Enzyme–linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. **Veterinary Microbiology**, v.7, p. 307–316, 1982.
- TORNQUIST, S.J., CRAWFORD, T.B., Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. **Blood**, v. 90, p. 2357–2363, 1997.
- TORNQUIST, S.J., OAKS, J.L., CRAWFORD, T.B.,. Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anaemia. **Journal of General Virology** v.78 p. 2541–2548, 1997
- UEDA S, SAMEJIMA T, KURODA S, NAKAMURA J. Preparation of equine infectious anemia antigens for diagnosis. **Japanese Journal of Microbiology**, v. 17, p. 393–9, 1973.
- VOLLER, A., D. E. BIDWELL, AND A. BARTLETT. **ELISA techniques in virology**. In: New developments in practical virology. C. R. Howard (ed.), Alan R. Liss, Inc., New York, p. 59–81, 1982.
- WEI, X., DECKER, J.M., WANG, S., *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, v.422, p. 307–312, 2003.
- WEILAND, F., MATHEKA, H.D., COGGINS, L., HARTNER, D., Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). **Archives of virology**, v. 55, p. 335–340, 1977.
- WHITE CE, KEMPI NM, KOMIVES E. A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. **Structure**, v.2, p.1003–1005, 1994.

ZAMAI, L., SECCHIERO, P., PIERPAOLI, S., BASSINI, A., PAPA, S., ALNEMRI, E.S., GUIDOTTI, L., VITALE, M., ZAULI, G. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. **Blood**, v.95, p. 3716–3724, 2000.

ZANONI, R., KRIEG, A., PETERHANS, E., 1989. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 27,p. 580-582.

ZHANG, P.; NOURI, M.; BRANDSMA, J.L.; IFTNER, T.; STEINBERG, B.M.. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. **Virology**, v. 263, p. 388-394, 1999.

ZHANG, B., S. JIN, J. JIN, F. LI, e R. C. MONTEJARO. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**v. 102, p. 9918–9923, 2005.

4 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Journal of Virological Methods 191 (2013) 95–100



E.L.S.F.V.I.E.R

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jvirometProduction of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*

Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho^a, André Luiz Santos de Jesus^b,
Karin Florêncio Lins de Paiva Fontes^a, Eliane Campos Coimbra^b, Filipe Colaço Mariz^b,
Antonio Carlos de Freitas^b, Rita de Cássia Carvalho Maia^a, Roberto Soares de Castro^{a,*}

^a Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil
^b Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

A B S T R A C T

Equine Infectious Anemia (EIA) is a persistent lentivirus infection of horses which causes a chronic clinical condition with worldwide importance in veterinary medicine. The p26 protein is usually prepared for use as an antigen in serological tests for EIA diagnosis since it is a well-conserved gene sequence and very immunogenic. In view of the ability of yeast to make post-translational modifications of proteins, this study was carried out to allow *Pichia pastoris* to be used for the expression of a synthetic codon-optimized EIAV p26 gene. The gene was cloned into pPICZαA vector after appropriate enzymatic digestion. *P. pastoris* clones transformed with the pPICZαAp26 construction were induced to produce the recombinant p26 protein (rp26) under the regulation of alcohol oxidase 1 promoter by adding methanol to the culture medium. The p26 gene expression was detected by RT-PCR and the production of rp26 was confirmed by dot blotting, Western blotting, ELISA and AGID. The *P. pastoris* expression system was capable of producing a functional EIAV p26 protein that can be used directly in the functionality tests without requiring laborious purification or recovery steps. This is the first reported study of EIAV p26 protein production in yeast cells.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article history:

Received 22 August 2012
Received in revised form 21 March 2013
Accepted 4 April 2013
Available online 17 April 2013

Keywords:

Methylotrophic yeasts
Western blotting
AGID
Capsid protein
ELISA
EIA

1. Introduction

Equine Infectious Anemia (EIA) is a viral disease of equids caused by a macrophage-tropic lentivirus belonging to the Retroviridae family, and characterized by chronic infection (Craig et al., 2009). The EIA virus (EIAV) genome consists of two complementary RNA positive strands with 8.2 kb, comprising three genes (gag, pol and env coding structural and nonstructural proteins) and three open reading frames that encode regulatory proteins (tat, rev and 52). The 55 kDa Gag-precursor (Pr55gag) polyprotein codified by the gag region is essential in the virus replication cycle because it is related to virus budding from the host cells. This Pr55gag precursor is cleaved by the viral protease into four main mature virion internal structural proteins: p15 (transmembrane), p26 (capsid), p11 and p9 (nucleocapsid) (Hussain et al., 1988; Stephens et al., 1986). The p26 protein represents about 40% of the total number of

EIAV proteins and is well conserved among different viral strains (Zhang et al., 1999). It is also the most immunogenic protein (Leroux et al., 2004; Montelaro et al., 1982) and thus the target antigen used in serological tests using EIA.

The disease is most widespread in hot and humid climates, and its principal form of transmission is through hematophagous insects of the Tabanidae family (Issel and Foil, 1984). Infected animals are a constant source of the disease virus, and most of them (95%) are asymptomatic carriers (Reis and Leite, 1994). Another obstacle to disease control is the lack of treatment or vaccine against EIAV. Thus, laboratory diagnosis plays a decisive role in the control and prevention of the disease. The detection of EIAV antibodies through serological tests such as agar gel immunodiffusion assay (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are recommended by the World Organization for Animal Health (OIE) as official tests for international equine transit (OIE, 2008). Most studies that involve the diagnosis of EIA, have reported the production of viral antigens from cell cultures infected with EIAV (Bouillant et al., 1986; Malmquist et al., 1973). However, bovine serum proteins that are used routinely in cell cultures, can cause nonspecific reactions, and lead to conflicting results (Alvarez et al., 2007a).

Other heterologous systems can be regarded as more reliable and efficient, while also being capable of producing antigens on a large scale, with a greater degree of homogeneity in the

* Corresponding author. Tel.: +55 81 33206428.

E-mail addresses: lcacoutinho@gmail.com (L.C. de Arruda Coutinho), andreluzjesus@gmail.com (A.L.S. de Jesus), karinfontes@gmail.com (K.F.L. de Paiva Fontes), elianecoimbra@gmail.com (E.C. Coimbra), filipe.mariz@yahoo.com.br (F.C. Mariz), acLufpe@yahoo.com.br (A.C. de Freitas), rcmaia@dmv.ufpe.br (R. de Cássia Carvalho Maia), rstcastro@dmv.ufpe.br (R.S. de Castro).

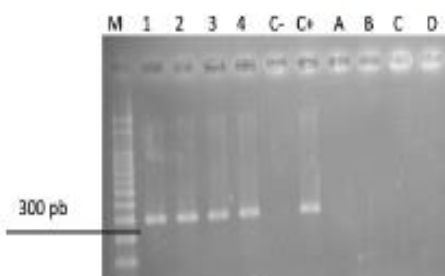


Fig. 1. RT-PCR of *P. pastoris* X-33/pPICZαAp26 after 72 h of methanol induction using p26F and p26R primers. M: 100 pb ladder; lanes 1–4: amplicon of 300 pb, relative to the central region of the nucleotide sequence that encodes the EIAV p26 protein; C-: water, negative control; C+: pFBSkp26 plasmid; lanes A–D: samples without reverse transcriptase enzyme.

2.7. Preparation of the antigen for AGID, ELISA and immunoblotting assays

The supernatant of *P. pastoris* transformed with pPICZαAp26 construction and the supernatant of *P. pastoris* transformed with only pPICZαA, was centrifuged (10,000 × g for 5 min) and 40-fold concentrated by dialysis against PEG 6000 40% (w/v) (Vetec Química Fina, SP, Brazil) in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.6. The precipitation process was performed slowly in the magnetic agitator at 4 °C, accompanied by dialysis using a membrane – 3787-D50 (Thomas Scientific, USA/Canada). After this, 10 mM PMSF (Sigma–Aldrich), was added with 2 M sorbitol and 15 ppm of the Proclin™ (Rohm and Haas, PA, USA), which defines the composition of the rp26 antigen. This product was used in different concentrations to meet the requirements of the AGID and ELISA immunoassays that were performed. In Western blotting, the rp26 antigen did not undergo any dilution however, since the ELISA and AGID 3.75 × and 2 × were diluted in PBS, respectively.

2.8. Immunoblotting

The proteins were quantified by the Bradford method, separated by 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis and stained by silver nitrate in accordance with Morrissey (1981). After the transfer of proteins to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, MA, USA), the blocking step was performed with 5% non-fat dry milk for 1 h and the membrane was incubated overnight at 4 °C against OIE standard positive anti EIAV serum (1:1000) (Batch: 7SAIE, Laboratory for equine disease in Maisons-Alfort, France). Following this, the membrane was washed with PBS-Tween and incubated with protein G horseradish peroxidase conjugated (1:45,000) (Sigma–Aldrich). The reaction was revealed with the ECL chemiluminescent kit (GE Healthcare, SP, Brazil).

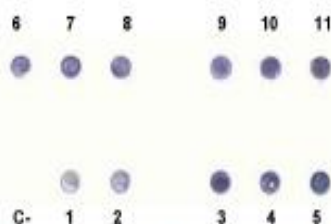


Fig. 2. Screening of *P. pastoris* recombinants. Representative dot blotting assay from recombinant *P. pastoris* supernatants. Wells 1–11: screening of *P. pastoris* recombinants after 72 h of methanol induction; C-: supernatant from *P. pastoris* transformed with only the expression vector used as negative control.

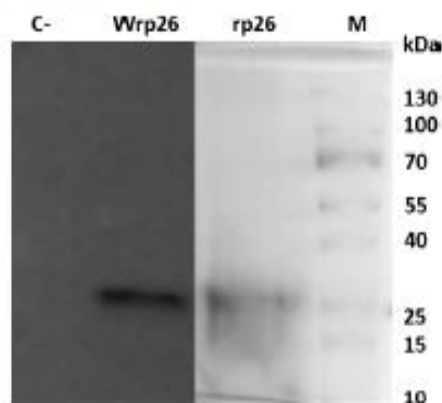


Fig. 3. Western blotting and SDS-PAGE stained by silver nitrate. Lane C-: supernatant from *P. pastoris* transformed with only the expression vector used as negative control; lane Wrp26: rp26 protein revealed with the OIE standard positive serum anti EIAV on Western blotting; lane rp26: rp26 protein from EIAV stained with silver; lane M: PageBuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, MD, USA).

2.9. ELISA and AGID

A 96-wells ELISA microplate (MICROLON™ 600-655081, Greiner-Bio One, SP, Brazil) was coated with 100 μL of the EIAV rp26 antigen. The optimum antigen concentration (3.75 × diluted) determined by titration against OIE standard serum was used in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated for 2 h in a humid chamber at 37 °C. The blocking step was performed with 200 μL of 4% non-fat dry milk solution and incubated for 1 h. Three washings stages were carried out with 200 μL of 0.1% PBS-Tween 20 (PBS-T). The sera were diluted in a solution containing 0.1% PBS-T, 2% non-fat dry milk and 10 mM EDTA, added in the wells, incubated at 37 °C for 1 h and washed. After this, 100 μL of conjugate (protein G horseradish peroxidase conjugated) was added and diluted 1:90,000 in a solution containing 0.1% PBS-T and 2% non-fat dry milk. After being incubated again for 1 h at 37 °C, the plates were washed 5 times. Next, 100 μL of chromogenic substrate 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5.0) was used. Finally, the plates were incubated at room temperature for 15 min and 100 μL of 2 N sulfuric acid was added. The plates were read using an ELISA reader (Multiskan Plus Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 450 nm. The results were expressed as a ratio of O.D. serum positive/O.D. negative serum (P/N). 35 samples were used as positive sera for EIAV-positive carriers in the AGID test and 35 samples as negative sera from equestrian entity certified as being free of EIA.

The AGID was performed according to the instructions of the OIE manual (2008) using 1% agarose (Invitrogen) in borate buffer. The positive OIE standard anti-EIAV serum was tested 2 × concentrated, undiluted and 2 × diluted. In addition to this standard serum, the EIAV positive serum from the commercial Bruch kit (SP, Brazil), was also used and the anti-EIAV positive serum from Biovetech (PE, Brazil). The tests were performed with 20 μL of both reagents (antigen and serum). The optimal rp26 antigen concentration was determined as 2 × diluted.

3. Results

3.1. Construction of pPICZαAp26 and *P. pastoris* transformation

The optimization of the p26 gene for expression in *P. pastoris* resulted in a difference of 21% from the wild-type gene sequence. The EIAV p26 gene was cloned into the pPICZα expression vector and the pPICZαAp26 expression cassette was confirmed by enzymatic digestion and sequencing. This construction was used to

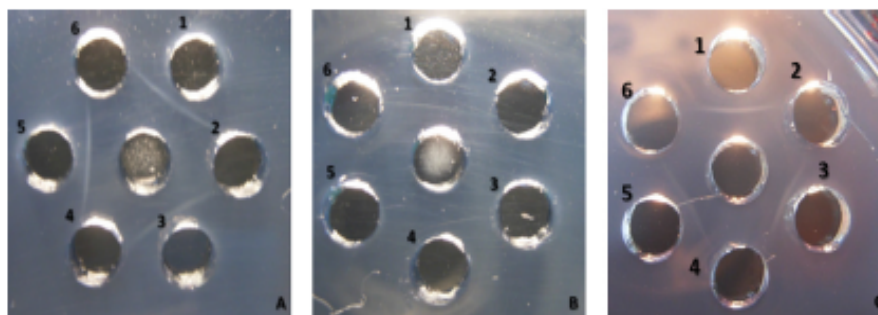


Fig. 4. Agar gel immunodiffusion with rp26. Unique precipitation lines resulted from the antigen/antibody reaction in agarose plate. (A) Central well: rp26 antigen; wells 1, 3 and 5: EIAV positive serum from Bruch kit; wells 2, 4 and 6: no sample. (B) Central well: negative control (supernatant of *P. pastoris* transformed with expression vector only); no precipitation lines were observed; wells 1, 3 and 5: EIAV positive serum from Bruch kit; wells 2, 4 and 6: no sample. (C) Central well: rp26 antigen; wells 2, 4 and 6: OIE standard positive serum 2x concentrated, undiluted and 2x diluted, respectively; well 1: EIAV positive serum undiluted from Biovetech; well 3: EIAV positive serum 1:1.5 diluted from Biovetech; well 5: EIAV positive serum 1:2 diluted from Biovetech. Readings were taken with 48 h of the reaction.

transform *P. pastoris* and the recombinants were submitted to *P. pastoris* colony PCR using the AQX1F and R primers to confirm the integration of the expression cassette into the genome of the yeast. The results observed in the PCR reaction indicated the presence of DNA fragments that are compatible with the construction (data not shown).

3.2. Production of rp26 protein

During induction, the growth rate of the clones ranged from 2.5×10^8 to 2.7×10^9 cells/mL while the pH of the media varied between 5.5 and 6.3 after 72 h of induction. The recombinant *P. pastoris* was also analyzed for p26 gene expression by RT-PCR. A 300 bp fragment from EIAV p26 gene was detected, which confirmed the presence of viral mRNA in *P. pastoris* after methanol induction. As a genomic DNA contamination control, a reverse transcription reaction without a reverse transcriptase enzyme, was performed for the samples analyzed (Fig. 1).

The immunodetection of the rp26 protein from supernatant was performed by dot blotting using anti-6xHis monoclonal antibody in the screening process (Fig. 2). According to the protein quantification system employed, about 230 μ g/mL of total extracellular protein extract were obtained from the supernatant after PEG concentration. Around 10 μ g of this sample was applied to SDS-PAGE and a protein with 26 kDa was observed (Fig. 3). The Western blotting assay using a polyclonal antibody (OIE standard positive serum) revealed a band of approximately 26 kDa, which represents the EIAV p26 protein molecular mass expected (Fig. 3).

3.3. Immunoreactivity of rp26

The ELISA with EIAV rp26 antigen from supernatant of *P. pastoris* revealed a 4.8 P/N ratio with minimum background activity (data not shown). When the AGID serological test was conducted with the same rp26 antigen used in ELISA, it revealed the formation of a single line identical to the EIAV positive sera: Bruch (Fig. 4A) and Biovetech (Fig. 4C). A minimum activity with an OIE standard serum was observed (Fig. 4C). The negative control (supernatant from *P. pastoris* strain transformed with expression vectors without the insert) did not detect any immunological reaction (Fig. 4B).

4. Discussion

Heterologous gene expression was detected by RT-PCR, dot blotting and Western blotting, which confirmed the gene transcription and the recombinant protein production in *P. pastoris* clones after

methanol induction. The immunoreactivity and specificity of rp26 protein was assessed by ELISA and AGID assays that only showed clearly positive reactions with positive sera.

The EIAV p26 protein has been produced in *E. coli* (Alvarez et al., 2007a; Jin et al., 1999; Piza et al., 2007), since it offers easy genetic manipulation and low cost media. However, in this system, nearly 70% of the recombinant proteins are overexpressed as insoluble inclusion bodies, and thus the process of purification and recovery of intracellular products from *E. coli* becomes laborious (Yang et al., 2011). The *P. pastoris* expression system was chosen so that the recombinant p26 could be used for EIA diagnosis by AGID and ELISA, because this is widely used and recognized as efficient (Lin-Cereghino et al., 2006; Sorensen, 2010). The recovery and purification of the recombinant protein was assisted by using the α -factor peptide from the pPICZ α A vector, which is a signal sequence to secrete the rp26.

Moreover, the problem of premature interruption of transcriptions, caused by the presence of AT-rich regions in the gene (which may produce truncated mRNA), was reduced by synthesizing the EIAV p26 gene (Romanos, 1995). The increased levels of protein expression were carried out by using preferred codons for expression in *P. pastoris* with A-T content adjusted to 55%, which represents the percentage considered necessary to potentiate the expression level in *P. pastoris* (Sreerishna et al., 1997).

During the screening process by dot blotting, it was observed that the intensity of the reactions revealed in mAb anti-6xHis, varied between the clones, which suggests that there was a difference in the amount of the expressed protein, possibly due to the variable copy-number of cassette expression integrated into each clone (Cregg et al., 1993).

The presence of the rp26 from *P. pastoris* supernatants, shown by SDS-PAGE and Western blotting confirms that the protein was secreted, and this enabled the supernatant to be used directly for diagnostic assays after careful titration (Cereghino and Cregg, 2000; Rees et al., 1999). In Western blotting, where ELISA and AGID were used, the rp26 antigen was obtained in a simple process involving supernatant clarification, concentration and dilution. In ELISA a high P/N ratio was observed, which meant that the positive and negative samples could be clearly distinguished. A unique precipitation line was viewed between the rp26 antigen and three different anti-EIAV sera (OIE reference serum, Bruch commercial kit and Biovetech) in AGID. From a careful analysis of the assay, a minimum reaction was observed that accompanied the formation of a discrete identity line between the serum and standard recombinant antigen. This shows the ability of the antigen to detect weak positive reactions. These results reaffirm the expression of rp26

in the supernatant and show that the recombinant protein has a similar immunoreactivity to native protein.

In SDS-PAGE analysis, it was possible to visualize a weak band with a molecular weight corresponding to what can be expected for the target protein. The confirmation of the rp26 protein was performed by Western blotting. However, the diagnostic tests conducted in this study suggest that these levels of proteins are more than sufficient, since both AGID and ELISA required antigen dilutions to establish optimum concentrations. The results showed clearly that rp26 was also found in immunoreactive form in supernatants and kept a minimum range of stability variation throughout the year, as was also observed in the ELISA and AGID preliminary monitoring tests (OIE, 2008).

A common problem observed in serological tests that involve an EIA diagnosis, is the nonspecific reactions (Alvarez et al., 2007a) that can cause difficulties in interpreting positive results, in particular, with ELISA. Thus, the OIE recommendation is that the positive sera in ELISA should be retested in AGID which is a highly specific test. In this study, no reaction between the equine sera and nonspecific components of the supernatant was observed in the Western blotting, AGID and ELISA assays, which confirms the qualitative aspect of the assays. As *P. pastoris* is not infectious to mammals, the problem of nonspecific reactions is avoided by using this yeast for the expression of rp26.

5. Conclusions

The *P. pastoris* expression system was shown to be capable of producing a functional EIAV p26 protein that can be used directly in the functionality tests without requiring laborious purification or recovery steps. The yield of the p26 protein production is scalable, and therefore, sufficient in view of the need for antigen dilutions in ELISA and AGID. Further studies on achieving standardization in the production of the recombinant protein will be conducted using a bioreactor, which offers better control on variables in the production such as temperature, pH and optical density, when compared with the production of flasks. Finally, the validation process for rp26 ELISA and AGID in EIA diagnosis tests, will be carried out in accordance with the principles and methods employed for validating diagnostic assays for infectious diseases recommended by OIE.

Acknowledgments

This work was sponsored by the Foundation for the Support of Science and Technology Pernambuco State (FACEPE), Research and Projects Financing (FINEP) (PAPPE – 2008; Proc APS 0338-5.05/08), and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPQ) and Biotech. The authors would like to thank Dr Hans Aymeric from the Laboratory for Equine Disease (Maisons-Alfort, France) for supplying the OIE reference anti-EIAV serum and the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock for granting an import license. Some of the experiments were conducted in the Laboratory of Molecular and Experimental Therapy Studies (LEMTE) at the Federal University of Pernambuco (UFPE).

References

Alvarez, I., Gutierrez, G., Ostund, E., Barrandeguy, M., Trono, K., 2007a. Western blot assay using recombinant p26 antigen for detection of equine infectious anemia virus-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1616–1648.

Alvarez, I., Gutierrez, G., Vissani, A., Rodriguez, S., Barrandeguy, M., Trono, K., 2007b. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet. Microbiol.* 121, 344–351.

Archambault, D., Wang, Z., Lecal, J.C., Gazit, A., Yaniv, A., Dahlberg, J.E., Tronick, S.R., 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anemia virus detection using recombinant Pr55gag. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1167–1173.

Birkett, A.J., Yéamos, B., Crespo, I.R., Gavilanes, F., Peterson, D.L., 1997. Cloning, expression, purification and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1339, 62–72.

Bouillant, A.M., Nielsen, K., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Hare, W.C., 1986. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods* 13, 309–321.

Börki, F., Rossmannith, W., Rossmannith, E., 1992. Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.* 33, 353–360.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45–66.

Coimbra, E.C., Gomes, F.B., Campos, J.F., D'arc, M., Carvalho, J.C., Mariz, F.C., Jesus, A.L.S., Stocco, R.C., Beçak, W., Freitas, A.C., 2011. Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 1209–1214.

Craigio, J.K., Barnes, S., Zhang, B., Cook, J.S., Howe, L., Isel, J.C., Montelaro, R.C., 2009. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirology* 6, 1–12.

Cregg, J.M., Vedrick, T.S., Raschke, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology* 11, 905–910.

Hussain, K.A., Isel, C.J., Rwambo, P.M., Armitant, A.B., Ball, J.M., Schnoor, K.L., Montelaro, R.C., 1988. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26. *J. Gen. Virol.* 69, 1719–1724.

Isel, C.J., Foli, L.D., 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 293–297.

Jin, Z., Jin, L., Peterson, D.L., Lawson, C.L.J., 1999. Model for Lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV p26. *Mol. Biol.* 286, 83–93.

Kong, X.K., Fang, H., Sugiyama, T., Sentsui, H., Onodera, T., Matsumoto, Y., Akashi, H., 1997. Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiol. Immunol.* 41, 975–980.

Leroux, C., Cadore, J.L., Montelaro, R.C., 2004. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): What has HIV's cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35, 485–512.

Lin-Cereghino, G.P., Godfrey, L., de la Cruz, B.J., Johnson, S., Khuongathien, S., Tolstoukova, I., Yan, M., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S., Cregg, J.M., 2006. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 883–897.

Macaulay-Patrick, S., Fazenda, M.J., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270.

Malmquist, W.A., Barnett, D., Becvar, C.S., 1973. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 42, 361–370.

Montelaro, R.C., Lohrey, N., Farekh, B., Blankensley, E.W., Isel, C.J., 1982. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia. *J. Virol.* 42, 1029–1038.

Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307–310.

World Organization for Animal Health (OIE), 2008. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*, vol. 1.34–45 (Chapter 1.1.4).

Piza, A.S.T., Pereira, A.R., Terreran, M.T., Mázzer, O., Tanuri, A., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Prev. Vet. Med.* 78, 239–245.

Pokoj, S., Lauer, I., Röhlich, K., Himly, M., Nari, A., Enrique, E., Miguel-Moncin, M.M.S., Lidholm, J., Vieths, S., Scheurer, S., 2010. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer protein. *Protein Expr. Purif.* 69, 68–75.

Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., Mattanovich, D., 2010. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2, 1–10.

Rees, G.S., Gee, C.K., Ward, H.L., Ball, C., Tarrant, G.M., Poole, S., Bristow, A.F., 1999. Rat tumour necrosis factor- α : expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. *Eur. Cytokine Netw.* 10, 383–392.

Reis, J.K.P., Leite, R.C., 1994. Otimização da produção e estabilização do antígeno do vírus da anemia infecciosa equina, para uso diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 46, 380–385.

Romanos, M., 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 527–533.

Rossmannith, W., Horvath, E., 1980. A western blot for the serological diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Med.* 36, 49–56.

Sahdev, S., Khattar, S.K., Saini, K.S., 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 307, 249–264.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sorensen, H.P., 2010. Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb. Cell Fact.* 9, 27.

- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L.A., 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190, 55–62.
- Stephens, R.M., Casey, J.W., Rice, N.R., 1986. Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus. *Science* 231, 589–594.
- Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., Wang, X., 2011. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS ONE* 6, 1–8.
- Zhang, W., Auyong, D.B., Oaks, J.L., McQuinn, C., 1999. Natural variation of equine infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virology* 261, 242–252.

ARTIGO CIENTÍFICO 2: Anemia Infeciosa Equina: perspectivas de avanços no diagnóstico e controle

Formatado para a revista *Arquivos do Instituto Biológico*

Luciana Cavalcanti Arruda Coutinho^a, Jackeline Gomes da Silva^a, Roberto Soares de Castro^{a,*}.

^aDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).
Endereço: Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Email dos autores:

Luciana C. A. Coutinho: lcacoutinho@gmail.com

Jackeline Gones da Silva: jackygs@gmail.com

Roberto S. Castro: rscastro@dmv.ufrpe.br*

***Autor para correspondência:**

Roberto Soares de Castro

Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

Fone: (55)(81) 33206428

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um RNA vírus, membro da família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus*. Além de ser reconhecida como a principal virose dos equídeos no Brasil, é também vista como um grande obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, por se tratar de uma doença transmissível e incurável. Considerando que mais de 95% dos animais infectados pelo vírus da AIE são portadores assintomáticos e que ainda não existe vacina eficaz disponível contra a doença, o diagnóstico assume papel decisivo no controle e prevenção. Animais positivos na prova sorológica oficial, Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), devem ser sacrificados, o que causa grandes prejuízos econômicos. Por outro lado, a análise da cadeia produtiva equina tem mostrado um grande potencial de expansão. O desenvolvimento de tecnologias e o uso de testes diagnósticos alternativos permitem maior controle da AIE e podem contribuir para o impulso da atividade equestre no país. A proposta desta revisão é discutir as atuais medidas de controle da AIE e seu impacto no agronegócio equino brasileiro.

Palavras chaves: Equinos, indústria do cavalo, agronegócio, diagnóstico, VAIE.

ABSTRACT

The Equine Infectious Anemia (EIA) is caused by RNA virus, a member of the genus *Lentivirus* from *Retroviridae* family. In addition to being recognized as the major viral disease of equines in Brazil, is also seen as a major obstacle for development of equideocultura, because it is a contagious and incurable disease. Whereas over 95 % of the animals infected with the EIA virus are asymptomatic and that do not have effective vaccine available against the disease, the diagnosis takes decisive role in the control and prevention. Positive animals in the official serological test, agar gel immunodiffusion (AGID), must be sacrificed, which causes major economic losses. On the other hand, the analysis of equine production chain has shown great potential for expansion. The development of technologies and use of alternative diagnostic tests allow greater EIA control and may contribute for momentum of equestrian activity in the country. The purpose of this review is to discuss the current control measures EIA and its impact on Brazilian agribusiness horse.

Key words: Equine, the horse industry, agribusiness, diagnosis, VAIE.

1. INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um lentivírus macrófago-trópico da família *Retroviridae* que causa infecção persistente, potencialmente fatal em equídeos. Por ser uma doença de caráter crônico e estar amplamente disseminada, torna-se a virose de maior importância em equinos no mundo (CRAIGO et al., 2009). O Vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE), semelhante aos agentes virais causadores da Artrite-encefalite Caprina (CAEV), Maedi-Visna, da Leucose Bovina e Aviária (BLV e ALV), da Leucemia e Imunodeficiência Felina (FeLV e FIV) e da Imunodeficiência Humana (HIV), provoca uma doença caracterizada por quadro degenerativo, com longo período de incubação, decorrente da própria resposta imunológica do hospedeiro, não existindo vacina ou tratamento eficientes (LERUOX et al., 2004; FLORES, 2007).

A AIE tem ocorrência mundial com maior prevalência em áreas de clima quente e úmido, o que está associado à sua forma mais comum de transmissão, realizada mecanicamente por insetos hematófagos (JONES, 2004). Considera-se que animais positivos no IDGA, assim permanecerão por toda vida, servindo como fonte de infecção. Este fato justifica a grande preocupação e vigilância em relação à doença (ISSEL; COGGINS, 1979).

A AIE é um grande obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura, por se tratar de uma doença incurável e de fácil transmissão. As consequências são grandes prejuízos aos proprietários e restrições de acesso ao mercado internacional (MOTTA, 2007). O rebanho equídeo, que abrange equinos, asininos e muares, é estimado em 8 milhões de cabeças no Brasil (IBGE, 2010). Os animais são utilizados em atividades agropecuárias, militares, esportivas, recreativas, no transporte de pessoas e produtos e até no tratamento de doenças humanas, através da equoterapia (ALMEIDA, 2001).

O complexo agronegócio cavalo inclui diversas atividades que geram empregos diretos e indiretos, movimentando o setor. O terceiro maior mercado de produtos veterinários no mundo é o brasileiro. Além disso, o Brasil ocupa lugar de destaque entre os países com maior população equídea e participa expressivamente como exportador de carne de cavalo (AAHSA, 2010). A Europa e o Japão são os principais destinos de nossos produtos neste segmento. As exigências do mercado internacional têm impulsionado o desenvolvimento de mudanças que levam à melhoria da qualidade dos produtos e maior competitividade. De acordo com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) a análise da cadeia produtiva equina tem mostrado um grande potencial de expansão, no entanto, para alavancar o crescimento da atividade equestre no país, é necessário mostrar habilidade e se adequar rapidamente à dinâmica do mercado (CEPEA, 2007).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu, em todo território nacional, medidas sanitárias obrigatórias para combater a AIE, que incluem: o diagnóstico oficial pela imunodifusão em gel de ágar (IDGA), sacrifício ou isolamento dos animais positivos e exigência do certificado negativo para trânsito interestadual e concentrações de equídeos (MAPA, 2008). O IDGA possui elevada especificidade, é rápido e econômico, no entanto, níveis de anticorpos séricos não são facilmente detectáveis neste teste antes dos primeiros quarenta e cinco dias do início da infecção (COGGINS et al., 1972). Esta janela imunológica pode produzir resultados falso-negativos, o que contribui significativamente para a manutenção da enfermidade nos rebanhos (ISSEL et al., 2013).

Com o objetivo de aumentar a acurácia diagnóstica, alguns países como os EUA vêm utilizando oficialmente o ELISA como prova alternativa para complementação no diagnóstico da AIE (OIE, 2008). Este teste é mais sensível que o IDGA, fácil de ser executado, passível de automação e possibilita o exame de grande número de amostras (REIS; LEITE, 1994).

Além deste, o *Western blot* vem sendo empregado para aqueles casos de discordância entre o ELISA e o IDGA, como um terceiro método diagnóstico (SCILCLUNA et al., 2013).

A proposta desta revisão é discutir as atuais medidas de controle da AIE e as perspectivas de avanços no diagnóstico desta doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico da AIE

AIE é reconhecida como a principal virose dos equídeos e vem sendo utilizada como modelo de estudo para HIV (CRAIGO; MONTELARO, 2013). A etiologia viral da AIE foi descrita por Valle e Carré em 1904, apesar da doença já ter sido descrita anteriormente na França (LIGNÉ, 1843). Na década de 1960 o VAIE foi cultivado, *in vitro*, pela primeira vez (CLEMENTES; ZINK, 1996). Nas Américas, a enfermidade foi diagnosticada primeiramente em 1881, em Manitoba, Canadá (BYRNE, 1960). Na América do Sul, na década de sessenta, a doença foi diagnosticada na Venezuela e Argentina (SAXER, 1960; MONTEVERDE, 1964). Em território brasileiro, esta virose foi descrita pela primeira vez por DUPONT et al. (1968) no extinto Estado da Guanabara. No mesmo período, a doença foi diagnosticada por SILVA et al. (1968) em animais do Clube Hípico Fluminense e em um animal da cavalaria da Polícia Militar na cidade do Rio de Janeiro, e por GUERREIRO et al. (1968) que descreveram o primeiro caso no Estado do Rio Grande do Sul. Em Minas Gerais, o primeiro caso foi diagnosticado neste mesmo ano em um cavalo da Vila Hípica de Belo Horizonte. Mas, somente três anos depois, a partir de exames clínicos, anátomo-histopatológicos, laboratoriais e infecção experimental em animal sadio, o resultado foi publicado, citando também a comprovação de mais 18 casos em equídeos do Jockey Clube de Minas Gerais (BATISTA JUNIOR; FONSCECA, 1971).

2.2. Estrutura e replicação viral

Análise de VAIE por microscopia eletrônica revela partículas virais ovais ou circulares, com cerca de 115 nm de diâmetro . O núcleo lentiviral é tipicamente cônico envolto por uma matriz proteica, que por sua vez é delimitada por uma membrana lipídica contendo numerosas projeções de 6-8 nm (MATHEKA et al., 1976; WEILAND et al., 1977; COOK et al., 2013). O RNA do VAIE é pequeno e geneticamente simples, formado por duas fitas de RNA não complementares de apenas 8.2 Kb. Seu genoma é composto por três genes (*gag*, *pol* e *env* que codificam proteínas estruturais e não estruturais) e por três fases abertas de leitura que codificam para proteínas regulatórias (*tat*, *rev*, e *S2*). A poliproteína de 55 KDa (*pr55gag*) originária da região *gag* é essencial para o ciclo replicativo do vírus porque está relacionada com o brotamento de novas partículas virais a partir da célula hospedeira. Este polipeptídeo precursor *pr55gag* é clivado por proteases virais em quatro principais estruturas proteicas: *p15* (transmembrana), *p26* (capsídeo), *p11* and *p9* (nucleocapsídeo) (STEPHENS et al., 1986; HUSSAIN et al., 1988).

A replicação viral ocorre em duas fases: a primeira inicia-se pela interação da glicoproteína de superfície do vírus com receptores específicos nas células alvo, que neste caso são os macrófagos ou monócitos (ZHANG et al., 2005); a segunda fase envolve a síntese e processamento de mRNAs e proteínas virais (CARVALHO e DERSE, 1993). Nas duas fases, o vírus utiliza a maquinaria celular de transcrição e processamento de mRNAs. A expressão de determinadas proteínas virais é normalmente restrita ao sistema hematopoiético, sendo absolutamente necessária para a geração de linfócitos B e macrófagos, que é destino natural da infecção pelo VAIE (LLOBERAS et al., 1999). Durante os episódios febris, o

VAIE se replica predominantemente nos macrófagos maduros presentes no baço, fígado, linfonodo, pulmões, rins e na glândula adrenal (SELLON et al., 1994; SELLON et al., 1996).

2.3. Resposta imunológica

Desde que foi proposta a hipótese que associa episódios recorrentes de febre nos animais infectados com VAIE com a variação antigênica viral (KONO et al., 1976), muitos estudos foram realizados com intuito de elucidar complexos mecanismos de escape do sistema imune realizado por este lentivírus (LEROUX et al., 1997; HOWE et al., 2002; SPONSELLER et al., 2007).

Os primeiros anticorpos produzidos são direcionados contra as glicoproteínas de superfície, especificamente a *gp 90*, cujos títulos chegam a ser $10^2 - 10^3$ mais altos que os anticorpos produzidos contra a *p26* (MONTELARO et al., 1984; ISSEL et al., 1988; O'ROURKE et al., 1988). No entanto, por uma questão de pressão imunológica, estas glicoproteínas sofrem frequentes mudanças no processo de glicosilação, o que resulta em mecanismos de escape viral (CHENG-MAYER et al., 1999; WEI et al., 2003).

O segundo grupo de anticorpos detectáveis é específico para a proteína *p26*, e é observado do décimo ao décimo quarto dia após a infecção, atingindo rapidamente um pico de concentração, mas com valores inferiores aos observados para *gp90* (MONTELARO et al., 1993). A proteína *p26* representa cerca de 40% do total de proteínas produzidas pelo vírus (ZHANG et al., 1999) e é considerada a mais imunogênica, sendo utilizada nos testes sorológicos para AIE (MONTELARO et al. 1982; LEROUX et al., 2004). Como são proteínas que não sofrem pressão de seleção imune tão intensa quanto as proteínas da região *env*, elas terminam sendo menos propensas às variações nas suas sequências genéticas (COOK et al., 2013). A *p26* foi considerada bem conservada entre diversas cepas virais de localizações

geográficas diferentes, com um máximo de 12% de variabilidade entre as linhagens (ZHANG et al., 1999). Entretanto, estudos mais recentes identificaram diferenças significativas nas sequências nucleotídicas ao longo do gene *gag* em diferentes isolados do VAIE, correspondentes às distintas regiões geográficas (QUINLIVAN et al., 2007; BOLDBAATAR et al., 2013). Atualmente considera-se que, embora haja variações significativas, esta região gênica do VAIE demonstra extensa conservação de importantes motivos estruturais e/ou funcionais (CAPELLI et al., 2011; CAPOMACCIO et al., 2012).

2.4. Patologia e fases da doença

Os sinais clínicos da AIE variam de acordo com a dose infectante, virulência da amostra viral e suscetibilidade individual do hospedeiro (SELLON, 1993). A maior parte dos animais infectados nunca demonstra os sinais clínicos, apesar da infecção persistente (ISSEL; COGGINS, 1979).

O VAIE é o único no grupo dos lentivírus que provoca febre aguda inicial, entre 40 e 41°C, com viremia associada seguida por ciclos recorrentes da doença e período assintomático prolongado (COOK et al., 1996). Inicialmente, os sinais clínicos são brandos e podem passar despercebidos (SELLON, 1994). A doença se manifesta clinicamente de diferentes formas, sendo possível a reversão de uma forma à outra a qualquer instante. É uma infecção persistente caracterizada por episódios periódicos de febre, hemorragias (MCCLURE et al., 1982), trombocitopenia (CRAWFORD et al., 1996), leucopenia, supressão transitória da resposta imunológica (NEWMAN et al., 1991) e aumentos significativos nos níveis de cobre e de enzimas hepáticas (CLABOUGH, 1990). Distúrbios hematológicos são facilmente identificados através de sinais como palidez de mucosas, hemorragias tipo petequiais, icterícia e edema nas regiões inferiores do corpo (COOK et al., 1996). Distúrbios neurológicos e lesões do sistema nervoso central têm sido associados à doença, podendo ser

observados através de sinais clínicos como perda de peso, depressão, desorientação e andar em círculos (MCILWRAITH; KITCHEN, 1978; MCCLURE et al., 1982).

Durante a fase crônica, o título do VAIE não é estável, porém, é alto durante os picos febris. Cada episódio de viremia recorrente tem duração média de três a cinco dias, e o intervalo dos ciclos da doença é irregular podendo ser de semanas a meses. A frequência e a gravidade dos episódios geralmente declinam com o tempo e terminam no primeiro ano, quando os animais tornam-se geralmente assintomáticos, característica específica do VAIE, diferente das demais lentivirose. Cavalos que estiveram assintomáticos por alguns meses ou anos podem apresentar episódios de febre após o tratamento com drogas imunossupressivas (KONO et al., 1976). Animais cronicamente infectados apresentam lesões glomerulares associadas à deposição de complexos antígeno-anticorpo (HENSON; MCGUIRE, 1971; CHEEVERS; MCGUIRE, 1985).

Atualmente não se sabe se muare são intrinsecamente resistentes à indução da doença ou se é uma questão de adaptação viral aos equinos, o que impediria sua plena replicação nestes híbridos (COOK et al., 2001; COOK et al., 2013). No entanto, achados clínico-patológicos e laboratoriais em muare mostram que tais indivíduos produzem sinais clínicos semelhantes ou mais brandos que os observados em equinos (SPYROU et al., 2003). Os asininos, apesar de serem suscetíveis ao VAIE, podem apresentar baixos níveis de viremia, o que poderia explicar o fato de não demonstrarem os sinais clínicos da doença frequentemente (COOK et al., 2001).

2.5. Epidemiologia

A principal forma de transmissão ocorre naturalmente através da picada de insetos hematófagos como a mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*), a mosca dos cervos (*Chrysops* spp) e mutucas (*Tabanus* sp) (FOIL et al., 1983; ISSEL et al., 1985). Pode ocorrer

também de forma iatrogênica através de fômites como arreios, agulhas e materiais cirúrgicos com resíduos de sangue contaminado (WILLIAMS et al., 1981). Existem ainda outras formas de menor importância epidemiológica como a transmissão transplacentária e através do colostro ou do sêmen. O vírus é transmissível a todos os equídeos, sem que haja qualquer preferência por raça, sexo e idade. A infecção intrauterina pode resultar no abortamento ou nascimento de potros infectados, que frequentemente morrem dentro de dois meses (TASHJIAN, 1984).

A AIE é uma das onze doenças específicas de equídeos de notificação obrigatória presente na lista da OIE. Os dados mais completos sobre a distribuição desta virose em todo mundo, disponíveis na OIE, datam de 2013. Dentre os países da América do Sul, Brasil, Colômbia, Equador e Bolívia apresentam-se como endêmicas. Argentina e Paraguai, assim como os EUA e Itália, apresentam-se como áreas em que a doença tem ocorrência em uma ou mais zonas. Na Europa, apesar de diversos países não terem relatado casos da AIE até o período descrito, existem alguns focos importantes como a Alemanha, atualmente considerada como região de ocorrência da AIE. E ainda a Romênia e regiões circunvizinhas, vistas como regiões de foco da doença (OIE, 2013).

Mesmo sabendo-se da importância desta enfermidade, não existem muitos estudos atuais sobre a prevalência da AIE no Brasil. Além disso, os dados são, eminentemente, restritos a pequenas regiões. De acordo com o último censo, realizado em 1998, a prevalência da doença é de 3% em território nacional e de 24% na região Amazônica e no Pantanal (SILVA et al., 1999; BRASIL, 2004; AGUIAR et al., 2008; FRANCO; PAES, 2011; BORGES et al., 2013). Estudos realizados entre 1993 e 2003 demonstraram uma prevalência de 12,7% e 11,8 % nas regiões Centro-Oeste e Norte do país, respectivamente (RIET-CORREIA et al., 2003). Em 1994, Reis e Leite descreveram uma soropositividade de 50%

para animais do Brasil Central, particularmente Pantanal e Mato Grosso. Na cidade de Cuiabá há uma prevalência de 19,4% em equinos de tração (NOCITI et al., 2007). RICHTZENHAIN et al. (2002) descreveram 17,8% de animais soropositivos no município de Uruará no Pará. Minas Gerais, considerada área endêmica, possui as mais altas prevalências concentradas especialmente nas regiões Norte/Nordeste do Estado, seguida pela região do Vale do Mucuri/Jequitinhonha, com 14,9% e 12,5%, respectivamente (ALMEIDA et al., 2006). Ainda de acordo com esses autores, dados não oficiais têm mostrado maior prevalência da doença em outras regiões, indicando sua ampla distribuição no território brasileiro. Entretanto, dados mais recentes sobre prevalência da AIE em haras de Minas Gerais apontam 1,54% na primeira região referida, 3,03% na segunda e 0,65% em uma terceira região analisada (Campo das Vertentes/Zona da Mata) (FIORILLO, 2011). Esta baixa prevalência, comparada ao estudo anterior, pode estar relacionada ao fato de que a pesquisa foi direcionada apenas aos animais de haras. Geralmente estes animais possuem alto valor zootécnico e estão sempre em deslocamento, portanto, sob permanente fiscalização (FIORILLO, 2011). No Rio de Janeiro, o aumento no número de focos encontrados após levantamento entre 2002 e 2008, foi relacionado ao aumento da fiscalização, entretanto, levantou-se a possibilidade de se classificar a região como área endêmica (KARAM et al., 2010).

Na região nordeste, mesorregião do sul baiano, foi constatada prevalência de 5,9%, a maioria dos positivos tinha mais de três anos e eram animais de trabalho no campo (GUIMARÃES et al., 2011). SILVA et al. (2013) encontraram uma frequência de 2,69% de equinos reagentes ao IDGA entre 5615 pesquisados nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. Regiões em que ocorre alta prevalência indicam grande número de animais positivos assintomáticos mantidos pelos proprietários em seus rebanhos. A ausência de dados ou a subnotificação da doença no Brasil e no mundo tornam seu controle e erradicação ainda mais difíceis, uma vez que animais acometidos são permanentes fontes de infecção.

2.6 O complexo agronegócio cavalo

O rebanho equino mundial é estimado em 50 milhões de cabeças, sendo a maior parte pertencente aos EUA (10 milhões), China (7,9 milhões) e México (6,2 milhões) (FAO, 2009). O Brasil fica na quarta posição com aproximadamente 6 milhões de equinos. Composto o grupo dos equídeos há ainda os muares e os asininos, com 1,3 e 1 milhão de cabeças, respectivamente, totalizando 8 milhões de animais, conforme levantado pelo IBGE. Este rebanho equídeo tem grandes participações nas regiões Nordeste (24,8%), Sudeste (24,6) e Centro-Oeste (20,4%) (IBGE, 2010).

O complexo agronegócio do cavalo, que inclui atividades “antes, dentro e fora da porteira”, é responsável pela movimentação anual de R\$ 8,5 bilhões, representando 25% do produto interno bruto (PIB), e gera mais de 3 milhões de empregos diretos e indiretos (CNA, 2014). As atividades denominadas “antes da porteira” contemplam agentes que fornecem insumos, produtos e serviços para a criação e o uso de cavalos. “Atividades dentro da porteira” dizem respeito a agentes que, diretamente, utilizam o cavalo em suas atividades. Agentes que encerram o ciclo do cavalo são denominados “atividades fora da porteira”, e neste contexto as empresas leiloeiras e o mercado internacional merecem destaque (CNA, 2014).

Em relação à exportação de cavalos vivos, os números são reveladores: a expansão alcançou 524% entre 1997 e 2009, passando de US\$ 702,8 mil para US\$ 4,4 milhões (MAPA, 2010). No entanto, o Brasil não tem expressiva participação no mercado internacional, ocupando a 31ª posição (0,11%) no *ranking*. Os maiores exportadores são EUA, seguido de Reino Unido e Emirados Árabes que juntos somam mais da metade (53,68%) do mercado (FAO, 2005). Os principais países compradores de nossos animais são EUA, Angola e Uruguai. Os estados que mais exportam são SP, RJ, MG e RS (MDIC, 2006; CEPEA, 2007).

Mesmo com pouca notoriedade o mercado brasileiro de carne de cavalo é um dos principais no mundo. Segundo o MAPA, em 2012 o país exportou 2.375,9 toneladas de carne de equídeos, com um aumento de 13% em relação ao volume de 2011. Isso torna o Brasil o 12º maior exportador nesse mercado. No critério exportações líquidas (exportações menos importações) o país ocupa a 9ª posição global. A maior concentração da produção está no RS, seguida do PR e MG, tendo como principais destinos os países da União Europeia, com destaque para Bélgica e França, que tem hábitos culturais relacionados ao consumo desta carne. A cotação da carne equídea gira em torno de R\$ 5,00, (USP-ESALQ, 2013). Abatem-se cerca de 200 mil equídeos por ano, em 7 abatedouros distribuídos nos estados de PR, RS, MG e BA. O Paraná lidera o *ranking* dos maiores exportador dentre os estados brasileiros envolvidos nesta atividade. Em seguida vem Minas Gerais e Rio Grande do Sul (MAPA, 2009).

A maior parte da carne equídea vendida é proveniente de animais descartados do uso diário das fazendas (CNA, 2004). A criação destes animais somente para produzir carne não é uma medida bem aceita pela sociedade brasileira (ROESSLE, 2009). Isto pode estar associado a alguns motivos, um deles é a questão cultural. Fazendo uma comparação entre pequenos animais domésticos e animais de grande porte, os cavalos se equiparam aos cães, em termos de laços afetivos. Outro ponto é que as possibilidades de produção de carne bovina, suína e de aves são muito vastas no Brasil. Associada a isto, está à questão da baixa taxa de conversão dos equídeos, quando comparados aos bovinos. Esta taxa é determinada calculando-se o quanto o que é ingerido pelo animal é transformado em carne (USP-ESALQ, 2013).

Por outro lado o abate de equídeos para consumo é uma medida legalmente prevista. As vísceras e a carne destes animais podem ser consumidas sem problemas desde que eles sejam abatidos em frigoríficos legalizados e que os produtos sejam rotulados adequadamente (BRASIL, 1997). De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de

Carne (ABIEC), o bloco europeu tem se mostrado bastante exigente no que diz respeito à rastreabilidade, controle de doenças e dos medicamentos dados aos equinos até seis meses antes do abate. Além disso, impõe muitas tarifas, normas e ações protecionistas, criando dificuldades para importações de carne (USP-ESALQ, 2013). Apesar da aprovação europeia às mudanças já realizadas, rastrear as exportações de cavalos no Brasil ainda é tarefa muito difícil, pelo fato de não existir uma criação comercial (CNA, 2014).

O estímulo à promoção internacional do agronegócio cavalo, divulgação de linhas de crédito existentes para alavancar a atividade, qualificação profissional de mão-de-obra e fortalecimento da representatividade do setor são algumas das principais carências. A disponibilidade de recursos adicionais para programas de sanidade animal e investimentos em pesquisa e tecnologia pode facilitar a certificação dos rebanhos como negativos para diversas doenças, inclusive a AIE. Este fato permite uma maior obtenção de animais de qualidade, estado sanitário adequado e alto valor agregado, o que leva ao atendimento das exigências internacionais para o comércio. A comercialização, especialmente a internacional, de animais de interesse econômico geralmente requer a certificação de que esses animais são livres de infecções persistentes ou latentes, como a infecção pelo VAIE. Por esta razão as técnicas de diagnóstico devem estar em contínuo aperfeiçoamento, no intuito de atender às exigências do mercado (ORSOLINI; LIMA, 2005; CEPEA, 2007).

Apesar de existir uma grande preocupação dos criadores que possuem animais registrados em controlar a enfermidade, muitos outros que não possuem cavalos registrados ainda não fazem o controle da AIE, que pode atingir uma prevalência alta nas tropas. Um dos grandes problemas detectados e enfrentados pela maioria dos criadores é a dificuldade na realização do teste IDGA (SANTOS et al., 1995). A necessidade de ações sanitárias constantes gera custos altos. Em vaquejadas o custo de um IDGA para AIE gira em torno de R\$ 65,00 por exame (CEPEA, 2007).

O impacto negativo causado pela AIE é bastante expressivo, a exemplo do que ocorreu com o cavalo Pantaneiro. Esse animal foi introduzido no Pantanal pelos colonizadores. As condições ambientais encontradas eram propícias para sua multiplicação. Com o desenvolvimento da pecuária na região, o cavalo Pantaneiro constituiu-se num fator de importância econômica e social, tornando-se imprescindível em trabalhos de gado e no transporte regional. No final do século XIX a raça entrou em declínio principalmente devido à doença conhecida como Peste das Cadeiras e, posteriormente, outras ameaças como cruzamentos indiscriminados com outras raças e, mais recentemente a disseminação da AIE (SANTOS et al., 1995).

2.7. Diagnóstico

Até a década de 1960, o diagnóstico era realizado através da inoculação do sangue contaminado em equino sadio, que passava por monitoramento até o surgimento dos sinais clínicos característicos da AIE (MONTELARO et al., 1993). Em 1968, Kobayashi e Kono conseguiram multiplicar o VAIE em cultura de leucócitos e adaptá-los a linhagens celulares contínuas. Diversos testes sorológicos foram desenvolvidos, dentre eles o IDGA, uma adaptação do método de Ouchterlony, descrita por COGGINS; NORCROSS (1970). Este método sorológico foi amplamente aceito e padronizado internacionalmente. O IDGA baseia-se na detecção de anticorpos contra a principal proteína do core viral, a *p26* (BIRKETT et al., 1997; JIN et al., 2005) e é o único teste oficial para diagnóstico da AIE no Brasil. Somente laboratórios credenciados pelo MAPA podem realizar o teste (BRASIL, 2008).

Na leitura do teste, soros de animais positivos formam uma linha de precipitação visível a olho nu em meio semissólido (ágar-gel), decorrente da formação do complexo antígeno anticorpo. Conhecido como Teste de Coggins, o método detecta anticorpos precipitantes

específicos em torno de 45 dias pós-infecção (d.p.i.) (COGGINS et al., 1972; ISSEL; COGGINS, 1979). Esta janela imunológica pode produzir resultados falso-negativos, o que contribui para a manutenção da enfermidade nos rebanhos. Outra limitação é a subjetividade inerente ao teste, uma vez que a leitura é realizada visualmente, requerendo pessoal muito bem treinado para evitar resultados equivocados, principalmente quando os casos de viremia são muito baixos (TOMA, 1980; ISSEL; ADMS, 1982; LANGEMEIER et al., 1996; MOTTA, 2007). Neste contexto, é importante a participação dos asininos e muares, que geralmente apresentam baixos níveis de anticorpos séricos, mantendo um padrão de reação muito fraco positiva nos testes de IDGA, que, por vezes, podem ser interpretados como negativos (SCICLUNA et al., 2013). Apesar da facilidade de execução, o IDGA não é um teste rápido, pois a leitura final só deve ser realizada em 48 horas. Mesmo com algumas deficiências, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda o IDGA como prova padrão-ouro (OIE 2012).

Há mais de trinta anos vem se estudando e discutindo a necessidade de complementação do diagnóstico da AIE (MATSUSHITA et al., 1989; ISSEL; COOK, 1993). Em alguns países como os EUA e em regiões da Itália, o ELISA também vem sendo utilizado como teste de triagem oficial para controle da AIE (ISSEL et al., 1999; USDA/APHIS, 2002; SCICLUNA et al., 2013). O ELISA é um teste comercializado em vários formatos, é mais sensível que o IDGA, é passível de automação e possibilita o exame de grande número de amostras com quantidades mínimas de reagentes (SUZUKI et al., 1982; REIS; LEITE, 1994). No entanto, devido a sua limitada especificidade, podem ocorrer resultados falso-positivos (ISSEL et al., 2013).

Uma forma de minimizar este problema é a utilização do IDGA como teste confirmatório para os ELISAs positivos. No IDGA as chances de liberação de resultados

falso-positivos são bem reduzidas. Assim, diminui-se a probabilidade de resultados errôneos, pois, utiliza-se primeiramente um teste com elevada sensibilidade e confirmam-se os positivos com uma prova de boa especificidade (SUZUKI, 1982; OIE, 2005). O uso de *imunoblots* foi proposto como teste para diagnóstico de AIE desde a década de 1980 (ISSEL et al., 1987) e pode ser usado para detectar anticorpos contra diferentes proteínas virais (*gp45*, *gp90* e *p26*). Atualmente vem sendo discutida a possibilidade de aumentar a acurácia do diagnóstico de AIE através do *Western blot* para definir aqueles casos duvidosos/discordantes entre o IDGA e o ELISA, principalmente em áreas de altas prevalências (ALVAREZ et al., 2007; ISSEL et al., 2013; SCICLUNA et al., 2013).

A utilização do ELISA como teste complementar ao IDGA no Brasil é uma necessidade mais que urgente. Um ELISA utilizando *gp90* recombinante foi desenvolvido por REIS (1997) e demonstrou ser mais eficiente do que o ELISA com antígeno *p26* (SILVA et al., 2003), pois detectou anticorpos mais precocemente. O teste apresentou boa correlação com os resultados do IDGA e foi recomendado como teste de triagem em levantamentos sorológicos (MARTINS, 2004). Outros pesquisadores também vêm desenvolvendo diferentes antígenos recombinantes para serem utilizados em ELISA (PIZA et al., 2007; REIS et al., 2012; COUTINHO et al., 2013). No entanto, deve-se considerar a variabilidade das glicoproteínas de superfície, o que pode limitar o uso destas proteínas como antígenos, se utilizados isoladamente nos testes diagnósticos. Estudos experimentais demonstraram que, assim como ocorre no IDGA, anticorpos contra a *p26* só são detectáveis a partir dos 45 d.p.i no ELISA (LEROUX et al., 2004, COOK et al., 2013). Assim a utilização de mais de uma proteína como a *gp90*, *gp95* e a *p26*, cujos anticorpos direcionados a elas são detectáveis em momentos diferentes da infecção, pode trazer maior acurácia no diagnóstico de AIE. Contudo, ainda é importante destacar que mesmo sendo o ELISA um teste capaz de minimizar resultados falso-negativos gerados pelo IDGA decorrentes dos animais com baixa carga viral,

ele não pode fechar completamente a janela imunológica para aqueles casos de infecção recente, pois, são necessárias cerca de três a quatro semanas pós-infecção, para que os níveis de anticorpos séricos sejam detectáveis nos referidos sorológicos (COOK et al., 2013).

A necessidade de diagnósticos mais precisos para AIE vem estimulando investigadores a novos estudos. A reação em cadeia pela polimerase (PCR), especialmente, o *Nested-PCR* tem sido descrito como uma boa opção para detectar infecções precoces do VAIE (MCCONNELL et al., 1983; SANTOS et al., 2011; DONG et al., 2012). No entanto, os oligonucleotídeos preconizados pela OIE podem não funcionar devido à variabilidade genética encontrada na região gag do genoma viral em isolados de diferentes localizações geográficas (CAPPELLI et al., 2012; BOLDBAATAR et al. 2013). Este fato dificulta o emprego de métodos moleculares para o diagnóstico da AIE na rotina de exames.

2.8. Legislação e Controle

A Instrução Normativa nº 17 do MAPA, de 8 de maio de 2008, instituiu o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE). Esse programa visa o fortalecimento da equideocultura nacional por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal. Um dos objetivos é realizar vigilância epidemiológica e sanitária das principais doenças dos equídeos, tais como Mormo e Anemia Infecciosa Equina, visando a profilaxia, controle e erradicação destas doenças em todos os Estados da Federação. De acordo com o PNSE o trânsito interestadual de equídeos somente é permitido quando os animais estão acompanhados da Guia de Trânsito Animal (GTA). Na emissão da GTA para equídeo com seis meses ou mais de idade é obrigatória a apresentação de resultado negativo à prova de IDGA. A participação de animais em leilões, feiras, rodeios, exposições, torneios e demais concentrações, somente é

permitida a equídeos com resultados negativos na prova de diagnóstico para AIE, independentemente da necessidade da movimentação interestadual.

Desde 1981, através da Portaria nº 200, a AIE está incluída entre as doenças passíveis de aplicação das medidas previstas no Regulamento de Defesa Sanitária Animal (Art.61 do Decreto 24.548, de 03 de julho de 1934), sendo obrigatório o sacrifício dos animais infectados, uma vez que não existe cura ou tratamento. A legislação em vigor é a Portaria nº 84, de 19 de outubro de 1992, e está em consulta pública, a Portaria nº 46, de 10 de setembro de 2002.

A Instrução Normativa nº45, de 15 de junho de 2004, que prevê os procedimentos gerais para profilaxia e combate à AIE, encontra-se em fase de revisão. Uma das medidas previstas refere-se às condições epidemiológicas peculiares a cada Unidade da Federação (UF). Em cada UF deverá ser constituída uma Comissão Estadual de Controle da AIE (CECAIE), que será responsável pelas ações de campo referentes à prevenção e ao combate da AIE.

O Diagnóstico Oficial deverá ser realizado por laboratório credenciado, usando antígeno oficialmente aprovado para IDGA. Os resultados poderão ser utilizados na emissão de atestado negativo para AIE, e terão as seguintes validades para efeito de trânsito: 180 dias para equídeos procedentes de entidades controladas e 60 dias nos demais casos. O equídeo que reagir positivamente à prova de IDGA será considerado portador de AIE. O resultado positivo deverá ser imediatamente comunicado pelo laboratório ao serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal. Esses animais poderão ser sacrificados ou marcados e isolados, dependendo da política sanitária definida na UF. O equídeo portador que não for sacrificado prontamente será marcado na paleta esquerda com a letra A e a sigla da UF onde se encontra o animal. Quando a medida indicada for o sacrifício, este será executado preferencialmente no local onde se encontra o animal, com prazo máximo de 30 dias.

O controle sanitário de entidades hípcas e de estabelecimentos que produzem, criam ou mantêm equídeos é de responsabilidade dos próprios serviços veterinários. As entidades ou estabelecimentos serão considerados controlados quando possuírem assistência veterinária permanente, não apresentarem animais reagentes positivos em dois testes realizados com intervalo de 30 a 60 dias, e todo o seu efetivo equídeo for submetido à prova, no mínimo uma vez a cada seis meses. Essas entidades ou estabelecimentos poderão receber certificados renováveis a cada 12 meses, após o reteste de todo plantel. Além disso, medidas como separação de animais positivos dos negativos, testes sorológicos periódicos, uso de uma agulha por animal e separação de potros provenientes de éguas infectadas também ajudam no controle da doença.

Todas estas medidas são extremamente importantes para o controle da AIE, tendo em vista o estágio de desenvolvimento de vacinas contra o VAIE que atingimos até o momento. Os últimos ensaios produziram ampla variedade de resultados, que incluem desde agravamento da doença até potencial imunidade à infecção homóloga (LIN et al., 2011a). No entanto, no que diz respeito à proteção contra a infecção, algumas lacunas ainda ficaram claramente abertas, havendo variações importantes a depender do esquema vacinal utilizado. Vacinas atenuadas são as mais recentemente estudadas e induzem respostas humorais que não são distinguíveis daquelas produzidas por infecções naturais, o que é incompatível com todos os esforços de controle da AIE, atualmente baseados em testes sorológicos (LIN et al., 2011b). Portanto, ainda não há perspectivas de uso vacinal aplicável para AIE em larga escala (COOK et al., 2013).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como exposto, o impacto negativo que a AIE causa no agronegócio equino brasileiro não é recente e envolve diversos aspectos. A começar pelos elevados custos de controle e

fiscalização sanitária, baseados em sistema de diagnóstico impreciso. Seguindo como entrave no desenvolvimento de um potencial setor econômico, indo de encontro ao bem estar animal e podendo causar prejuízos ao patrimônio biológico brasileiro. Melhorar o *status* sanitário do Brasil em relação à AIE nos tornaria mais competitivos no mercado mundial, permitindo disputar maior espaço com outros países. As exigências do mercado internacional são grandes e sem a acurácia diagnóstica necessária mantém-se um número significativo de animais positivos nos rebanhos servindo de fonte de infecção e inviabilizando o controle da doença.

Infelizmente, a vacina ainda não é uma realidade para uso em larga escala e no longo prazo, portanto, o foco do controle deve estar baseado em ferramentas diagnósticas mais precisas. Entendendo que é mais importante concentrar esforços para definir com a mínima chance de erro os verdadeiros positivos, corrobora-se com a ideia de um diagnóstico em três camadas (ELISA, IDGA e WB). A utilização, conjunta ou paralela, de antígenos que estimulam o aparecimento de anticorpos em diferentes momentos da infecção, também parece ser uma alternativa para o diagnóstico da AIE no ELISA. O uso de técnicas moleculares é uma boa perspectiva, levando-se em conta, principalmente, a capacidade de detectar animais em estágios iniciais da infecção. Espera-se que, com brevidade, o diagnóstico da AIE no Brasil possa contar com alguma complementação para que seu controle seja mais efetivo. Não desmerecendo o IDGA, que tem muitas qualidades, considera-se um atraso contar apenas com esta técnica para definir o destino do equídeo testado, especialmente do ponto de vista econômico e do bem estar animal. Diante de todas as inovações biotecnológicas da atualidade, acredita-se serem possíveis maiores avanços no controle da doença.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAHSA. American Association for Horsemanship Safety. Disponível em <http://www.horsemanshipssafety.com/>. Acesso em: 21.05.2014.

AGUIAR D.M., CAVALCANTE G.T., LARA M.C.C.S.H., VILLALOBOS E.M.C., CUNHA E.M.S., OKUDA L.H., STEFANO E., NASSAR A.F.C., SOUZA G.O., VASCONCELOS S.A., LABRUNA M.C., CAMARGO L.M.A. & GENNARI S.M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* v.45, p 269-276, 2008.

ALMEIDA, H. B. Sincronização do estro e dinâmica folicular de éguas crioulas submetidas a tratamentos com Norgestomet, Acetato de Melengestrol e ALTRenogest. 2001. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

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

ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; OSTUND, E.; BARRANDEGUY.; TRONO, K. Western Blot Assay Using Recombinant p26 Antigen for Detection of Equine Infectious Anemia Virus-Specific Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 12, p. 1616-1648, 2007.

ARCHAMBAULT D., WANG Z., LACAL J.C., GAZIT A., YANIV A., DAHLBERG J.E. & TRONICK S.R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anaemia virus detection using recombinant Pr55gag. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, 1167–1173, 1989.

BANCO de dados agregados. IBGE, 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>> Acessado em: 20.05.14

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

BIRKETT, A.J.; YÉAMOS, B.; CRESPO, I. R.; GAVILANES, F.; PETERSON, D. L. Cloning expression purification, and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1339, p. 62-72, 1997.

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

BOUILLANT A. M.; NIELSEN K., RUCKERBAUER G. M.; SAMAGH B.S.; HARE W. C.; The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus

and preliminary data on the production of viral antigens. *Journal of Virological. Methods*, n.13, p. 309–321, 1986.

BOLDBAATAR, B., BAZARTSEREN, T., KOBAYASHI, R., MURAKAMI, H., OGUMA, K., MURAKAMI, K., SENTSUI, H. Amplification of complete gag gene sequences from geographically distinct equine infectious anemia virus isolates. *Journal of Virological Methods*, 189 (2013) 41–46.

BORGES, A.M.C.M., SILVAA, L.G., NOGUEIRA, M.F., OLIVEIRAC, A.C.S., SEGRI, N. J., FERREIRA, F., WITTER, R. AGUIAR, D. M. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in Veterinary Science*, n, 95, p. 76–81, 2013.

BRADFORD, MM . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, n. 72, p.248-254, 1976.

BRASIL, 2004.Normas para prevenção e controle da Anemia Infecciosa Equina- AIE. Instrução Normativa nº 45 de 15 de junho de 2004. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASECIMENTO. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Brasil.

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

CAPOMACCIO, S. ; WILLAND, Z.A. ; COOK, S.J. ; ISSEL, C.J. ; SANTOS, E.M. ; REIS, J.K.P. ; COOK, R.F. Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. *Veterinary Microbiology (Amsterdam. Print)*, v. 157, p. 320-332, 2012.

CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COOK, F.R. et al. Molecular detection, epidemiology and genetic characterization of novel european fields isolates of equine infectious anemia virus. *Journal Clinical Microbiology*, v.49, p.27-33, 2011.

CARVALHO M., DERSE, D., Physical and functional characterization of transcriptional control elements in the equine infectious anemia virus promoter, *Journal of Virology*, n. 67, p. 2064–2074, 1993.

CEPEAEstudo do complexo do agronegócio cavaloCEPEA/ESALQ/USP.2007.Disponível em:<<http://www.cepea.esalq.usp.br/cavalo/>>. Acesso em: 30.05.14.

CEREGHINO J. L.; CREGG J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, n. 24, p. 45-66, 2000.

CHEEVERS, W.P. & MCGUIRE, T.C.Anemia Infecciosa Eqüina Vírus imunopatogênese e Persistência.*Clinical Infectious Diseases*, n. 7, v 1, p. 83 – 88, 1985.

CHENG-MAYER, C., BROWN, A., HAROUSE, J., LUCIW, P. A. & MAYER, A. J. Selection for neutralization resistance of the simian human immunodeficiency virus HIV a

variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *Journal of Virology*, n.73, p. 5294–5300, 1999.

CLABOUGH, D.L. The immunopathogenesis and control of equine infectious anemia. *Veterinary Medicine*, n. 85, p. 1020–1028, 1990.

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

CNA. Comissão Nacional de Equinocultura da Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/noticias/>. Acesso em: 25.05.14

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo / Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Brasília, *Coletânea Estudos Gleba*. v. 39, 68 p, 2004.

COGGINS, L., NORCROSS N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Veterinary*, v. 60, n. 2, p. 330-335, 1970.

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

COOK, R.F.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia. In:... *Virus Infections of Equines*. ed Studdert M. J. Amsterdam: Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands, 1996. p. 297–323.

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

COOK, R. F., LEROUX, C., ISSEL, C.J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia vírus in 2013: A review. *Veterinary Microbiology*, n. 167, p. 181–204, 2013.

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

CRAIGO, J. K., BARNES, S., ZHANG, B., COOK, S.J., HOWE, L., ISSEL, C. I., MONTERALO, R. C. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirology*, n. 6, p. 95, 2009.

CRAIGO, J.K. AND MONTELARO, R.C. Lessons in AIDS Vaccine Development Learned from Studies of Equine Infectious, Anemia Virus Infection and Immunity. *Viruses*, n. 5, p. 2963-2976, 2013.

CREGG, J. M., CEREGHINO, J.L., SHI, J., HIGGINS, D. Recombinant Protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, n. 16, p. 23-52, 2000.

CRAWFORD, T.B.; WARDROP, K.J.; TORNQUIST, S.J.; REILICH, E.; MEYERS, K.M.; MCGUIRE, T.C. A primary production defect in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. *Journal of Virology*, v.70, n.11, p.7842-7850, 1996.

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

DUPONT, O., DARCOS FILHO, P., MUCHALUAT, M. LANGENEGGER, J. Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2. CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. Anais. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p. 160-161.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em 20 de maio de 2014.

FERRAZ, I. B. F. Vírus da Anemia Infecciosa Equina: amplificação por PCR do DNA proviral da *gp90*, comparação com o teste de ELISA e IDGA e variabilidade genética de amostras brasileiras. 1998. 153f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

FIORILLO, K. S. Prevalência da Anemia Infecciosa Equina em Haras de Minas Gerais. 2011. 47p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

FLORES, E. F. (Org.). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007.

FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. Y.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 155-156, 1983.

FRANCO, M.M.J. E PAES, A.C. Anemia Infecciosa Equina. *Veterinária e Zootecnia*. v.18, n. 2, p. 197- 207, 2011.

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

GUERREIRO, M.G.; BAUER, A.G.; GLOSS, R.M.; VIDOR, T.; FARIAS, M.T.; TREIN, E.; MANCUSO, P.C. In: SIMPÓSIO SOBRE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA. 1968. Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor". Porto Alegre, n.1/2, p.3-4.

HENSON, J.B., MCGUIRE, T.C. Immunopathology of equine infectious anemia. *American Journal of Clinical Pathology*, n. 56, p. 306–313, 1971.

- HOWE, L., LEROUX, C., ISSEL, C. J. & MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype. *Journal of Virology*, n. 76, p. 10588–10597. 2002.
- HUSSAIN, K. A.; ISSEL C. J.; RWAMBO P. M.; ARNIZAUT A. B.; BALL J. M.; SCHNORR K. L.; MONTELARO R. C. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26, *Journal General Virology*, n. 69, p. 1719–1724, 1998.
- ISSEL, C.J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. *Journal of American Veterinary Medical Association*, n. 174, p. 727–733, 1979.
- ISSEL, C.J.; ADAMS JUNIOR, W.V.; MEEK, L. et al. Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.180, n. 3, p. 272-275, 1982.
- ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V.; FOIL, L.D. Prospective study of the progeny of inapparent carriers of equine infectious anemia virus. *American Journal of Veterinary Research*, v.46, p.1114-1116, 1985.
- ISSEL, C.J., SCICLUNA, M.T., COOK, S.J., COOK, R.F., CAPRIOLI, A., RICCI, I. Evolution of equine infectious anemia diagnostic tests: recognition of a need for detection of Anti-EIAV glycoprotein antibodies. In: Powell, D.G. (Ed.), *Equine Infectious Diseases V*. University of Kentucky Press, Lexington, KY, pp.196–200.
- ISSEL, C.J.; RUSHLOW, K.E.; FOIL, L.D.; MONTELARO, R.C. A perspective on equine infectious anemia with emphasis in vector transmission and genetic analysis. *Veterinary Microbiology*, v.17, p.251-386, 1988.
- ISSEL, C.J., COOK, S.J., COOK, R.F., CORDES, T.R. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). *Journal of Equine Veterinary Science*, v 19, n. 11, p. 728–732, 1999.
- ISSEL, C.J., M. T. SCICLUNA, S. J. COOK, R. F. COOK, A. CAPRIOLI, I. RICCI, F. ROSONE, J. K. CRAIGO, R. C. MONTELARO, G. L. AUTORINO. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr-2012-100735, 2013.
- JIN, S.; ZHANG, B.; WEISZ, O. A.; MONTELARO, R. C. Receptor-mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. *Journal of Virology*, v. 79, n. 23, p. 14489-14497, 2005.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W.; *Patologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2004.
- KARAM, C.H.V., ROLIM, M.F., GRAÇA, F.A.S., ARAGÃO, A.P. Anemia infecciosa equina no estado do Rio de Janeiro: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Revista eletrônica novo enfoque*, v.09, n.9, p.01-13, 2010.

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

KOBAYASHI, K., KONO, Y. Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. *National Institute of Animal Health Q*, v. 7, n.1, p. 8–20, 1967.

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FUKUNAGA, Y.; TANIGUCHI, T. Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *National Institute of Animal Health Quarterly*, v.16, p.8 -15, 1976.

KONEMAN, E. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KONG X. K., PANG H., SUGIURA T., SENTSU H., ONODERA T., MATSUMOTO Y. & AKASHI H. Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiology Immunology*, v.41, p.975–980, 1997.

LANGEMEIER, J.L.; COOK, S.J.; COOK, R.F.; RUSHLOW, K.E.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.1481-1487, 1996.

LEROUX, CAROLINE.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *Journal of Virology*, v.71, p.9627-9639, 1997.

LEROUX, C.; 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.

LIGNÉ, M. Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydrohémie, cachexie acquise Du cheval, *Recueil de médecine vétérinaireAlfort*. p. 30–44, 1843.

LIN, Y-Z., CAO, X-Z., LI, L., LI, L., JIANG, C-G., WANG, X-F., MA, J., ZHOU. The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression and apoptosis in macrophages. *Virus Research*, v.60, n1/2, p. 274–282, 2011a.

LIN, Y-Z., SHEN, R-X., ZHU, Z-Y., DENG, X-L., CAO, X-Z., WANG, X-F., MA, J., JIANG, C-G., ZHAO, L-P., LV., X-L., SHAO, Y-M., ZHOU, J-H. An attenuated EIAV vaccine strain induces significantly different immune responses from its pathogenic parental strain although with similar *in vivo* replication pattern. *Antiviral Research*, v. 92, n. 2, p. 292–304, 2011.

LLOBERAS J. SOLER, C., CELADA, A. The role key of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunology Today*, v. 20, p 184-189, 1999.

MALMQUIST W.A., BARNETT D. & BECVAR C.S. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, v.42, p.361–370, 1973.

MARTINS, M. F. Comparação entre os testes IDGA(p26) e ELISA indireto (gpr90) no diagnóstico da anemia infecciosa equina. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2004.

MATSUSHITA, T.; HESTERBERG, L.K., PORTER, J.P., SMITH, B. J., NEWMAN, L. E. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 1, p. 50-52, 1989.

MATHEKA, H.D., COGGINS, L., SHIVELY, J.N., NORCROSS, N.L. Purification and characterization of equine infectious anemia virus. *Archives of Virology*. v51, n.1-2, p 107-114, 1976.

McCONNELL, S.; KATADA, M.; DARNTON, S. M. Occult equine infectious anemia in an immunosuppressed serologically negative mare. *Equine Practice*, v.5, p.32-39, 1983.

MONTEVERDE, J. J.; MORÁN, B. L.; GABERS, G. V. Anemia infecciosa equina. *Revue de Médecine Vétérinaire*,v.45, n.6, p.431-434, 1964.

MCCLURE J.J., LINDSAY W.A., TAYLOR W., OCHOA R., ISSEL C.J., COULTER S.J. Ataxia in four horses with equine infectious anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.180, n.3, p.279-83, 1982.

MCILWRAITH, CW, KITCHEN, DN. Neurologic signs and neuropathology associated with a case of equine infectious anemia. *The Cornell Veterinarian*. v.68, n.2, p. 238-249, 1978.

MDIC. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. 2006. Disponível em: <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 30.05.2014.

MONTELARO, R. C.; LHOREY, N.; PAREKH, B.; BLAKENEY, E. W.; ISSEL, C. H. Isolation and comparative biochemical polypeptides of equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v. 42, n.3, 1029-1038, 1982.

MONTELARO R.C., PAREKH B., ORREGO A. & ISSEL C.J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. *Journal Biological Chemical*, v.16, p.10539–10544, 1984.

MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.) *The retroviridae*. New York: Plenum Press, 1993. v. 2, cap. 5, p. 257-359.

MOTTA, P.M.C. Comparação da IDGA, ELISA e “NESTED” PCR no diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muare. 2007. 29 f. Dissertação (Mestrado

em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NEWMAN, M.J.; ISSEL, C.J.; TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; HOROHOV, D.W.; MONTELARO, R.C. Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV). *Virology*, New York, v.184, n.1, p.55-66, 1991.

NOCITI, D. L. P. ; SENNA, D. ; REGO, C. L. P. ; HOFMEISTER, K. S. ; MUTZENBERG, E. R. ; NOCITI, R. P. . Anemia Infecciosa Equina em Equídeos de tração no município de Cuiabá, MT, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 29, p. 165-167, 2007.

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Manual of standards diagnostic tests and vaccines. Disponível em: www.oie.int. Acesso em: 21.05.2014.

OIE-World Organisation for Animal Health. Mapa de Distribuição da AIE. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/diseasehome. Acesso em 27.05.14

ORSOLINI, H. M. P.; LIMA, R. A. S. Características das exportações brasileiras de carne de cavalo, no período de 1996 a 2004. In: XLIII CONGRESSO DA SOBER: “Instituições, eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”. Ribeirão Preto, 2005.

O'ROURKE, K., PERRYMAN, L. E. & McGUIRE, T. C. Antiviral, anti-glycoprotein and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anaemia virus. *Journal of General Virology*, n. 69, p. 667-674, 1998.

PARÉ, J.; SIMARD, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *The Canadian journal of Veterinary Research*, v. 68, p. 254-258, 2004.

PIZA, A.S.T.; PERIRA, A.R.; TERRERAN, M.T.; MOZZER, O.; TANURI, A.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Preventive Veterinary Medicine*, v.78, p.239-45, 2007.

QUINLIVAN, M.; COOK, R. F.; CULLINANE, A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association* v. 160, n 18, p. 611-618, 2007.

REIS, J.K.; MELO, L.M.; REZENDE, M.R.; LEITE, R.C. Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anemia focus. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburg, v.26, n.2, p.65-68, 1994.

REIS, J. K.; LEITE, R. C.. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 20, p. 261-267, 1994.

REIS, J. K. P. Produção de antígenos recombinantes *gp90* e *p26* do vírus da anemia infecciosa equina, para seu uso em imunodiagnóstico. 1997. 184 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

RICHTZENHAIN, L.J. Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da arterite viral dos equinos e do aborto viral equino no município de Uruará, PA, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.39, n.1, 2002.

RIET- CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS R. A. *Doenças de Ruminantes e Equinos*. 1 ed., São Paulo, Varela, 2003.

ROESSLE, P. R. A comercialização de carne de eqüídeos. 2009. 41f. Especialização (Lato sensu em Vigilância Sanitária e Controle de Qualidade dos Alimentos) - Universidade Castelo Branco, São Paulo, SP, 2009.

SANTOS, S. A.; MAZZA, M. C. M.; SERENO, J. R. B.; ABREU, U.G.P. de; SILVA, J. A. *Avaliação e conservação do cavalo pantaneiro*. Corumbá-MS: EMBRAPA-CPAP, 1995. 40 p.il. (EMBRAPA-CPAP. Circular Técnica, 21).

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

SAXER, E. Report to the Government of Venezuela on veterinary laboratories, with special reference to equine infectious anaemia. In: *Informe al gobierno de Venezuela sobre laboratorios de veterinaria con especial referencia a la anemia infecciosa del caballo*. 1960. Disponível em: <http://www.cabdirect.org/abstracts/>. Acessado em: 30.05.14.

SCICLUNNA, M.T., ISSEL, C.J., COOK, F.R., MANNAA, G., CERSINI, A., ROSONEA, F., FRONTOSA, R., CAPRIOLI, A., ANTONETTI, V., AUTORINO, G.L. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology*, v. 165, p. 123–134, 2013.

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

SILVA, R. A., SILVA, N. M., FREITAS, W.M., DEAK, M.H.R., ANDRÉ, C.A.F. A Ocorrência da anemia infecciosa no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2. CONGRESSO FLUMINENSE DE

MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. Anais. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. P. 173-182.

SILVA, M. F.; GOMES, T.; DIAS, A. S.; MARQUES, J. A.; JORGE, L. M.; FAÍSCA, J. C.; PIRES, G. A.; CALDEIRA, R. M. Estimativa da idade dos equinos através do exame dentário. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 98, n. 547, p. 103-110, 2003.

SILVA, R.A.M.S., DAVILA, A.M.R., IVERSSON, L.B., ABREU, U.G.P. Equine viral diseases in the Pantanal, Brazil. Studies carried out from 1990 to 1995. *Revue Elevge de Medicine Veterinaire des Pays Tropicaux* v. 52,p. 9–12. 1999b.

SILVA, C. F.; PEQUENO, N. F. CLEMENTINO, I. J.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, A. Frequência da anemia infecciosa equina em equinos nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará durante o ano de 2010. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, n.1, p.12-17, 2013.

SELLON, D. C. Equine Infectious Anemia. *Veterinary Clinic of North America: Equine Practice*, v. 9, n. 2, p.321-336, 1993.

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

SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSEL, K. E. Equine Infectious Anemia Virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *Journal of Virology*, v. 70, p.590-594, 1996.

STEPHENS R.M., Casey J.W., Rice N.R., Equine infectious anemia virus *gag* and *pol* genes: relatedness to visna and AIDS virus, *Science* 231 (1986) 589–594

SPONSELLER, B.A.; SPARKS, W.O.; WANNEMUEHLER, I. et al. Immune selection of equine infectious anemia virus *env* variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virology*, v.363, p.156-165, 2007.

SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, C.; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*, v. 95, p. 49-59, 2003.

SUZUKI T., UEDA S. & SAMEJINA T. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Microbiology*,v. 7,p. 307–316,1982.

TASHJIAN, R.J. Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 184, p.282-288, 1984.

TOMA, B. Réponse sérologique négative persistante chez une jument infectée. *Recueil de médecine vétérinaire*, v. 156, p. 55–63, 1980.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (2007). Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/oa/pubs/eiaumr.pdf>. Acessado em: 30.05.2014.

USP ESALQ – Exportações brasileiras de carne de cavalo são ameaçadas pela crise europeia. ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO. Disponível em: <http://economia.ig.com.br/Acesso> em: 20.05.14.

VALLÉE, H.; CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval, C. R. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. v. 139, p. 331–333, 1904.

WEI, X., DECKER, J.M., WANG, S., *et al.* 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 422, 307-312.

WEILAND, F., MATHEKA, H.D., COGGINS, L. HARTNER, D. Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). *Archives of Virology*. v.55, n 4, p. 335-340, 1977.

WILLIAMS, DL., ISSEL, CJ., STEELMAN, CD., ADAMS, WV., BENTON, CV. Studies with equine infectious anemia virus: Transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *American Journal of Veterinary Research*, v. 42, n. 9, p. 1469-1473, 1981.

ZHANG, W. AUYONG, D.B., OAKS, J.L. Variation of Equine Infectious Anemia Virus Gag Protein Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes. *Virology*, v 261, p. 242-252, 1999.

ZHANG, B., JIN, S., JIN, J., LI, F., MONTELARO, R.C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macro-phage-tropic equine lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v 102, p. 9918–9923, 2005.

6 ARTIGO CIENTÍFICO 3: Indirect ELISA for Equine Infectious Anemia diagnostic using recombinant antigen (*rp26*) produced in *Pichia pastoris*

Research in Veterinary Science

Luciana Cavalcanti Arruda Coutinho^{a,*}, Luiz Cosme da Silva Júnior^a, Ana Cláudia Campos^a, André Luiz Santos de Jesus^a, Marcelo Nazário Cordeiro^b, Karin Florêncio Lins de Paiva Fontes^a, Antonio Carlos de Freitas^b, Roberto Soares de Castro^a.

^aDepartment of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). Address: Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

^bLaboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

Email authors:

Luciana C. A. Coutinho: lcacoutinho@gmail.com*

Luiz C. da Silva Júnior: luizcosme.s@gmail.com

Ana Cláudia Campos: anabutron@gmail.com

André L. S. Jesus: andreluizsjesus@gmail.com

Marcelo N. Cordeiro: biocellus@yahoo.com.br

Karin F. L. P. Fontes: karinffontes@gmail.com

Antonio C. Freitas: acf_ufpe@yahoo.com.br

Roberto S. Castro: rscastro@dmv.ufrpe.br

***Author for correspondence:**

Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho

Department of Veterinary Medicine, UFRPE.

Phone: +55 81 33206426

Resumo

Em diversos países apenas o sorológico Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é considerado prova oficial para diagnóstico de animais infectados com o vírus da anemia infecciosa equina (VAIE). A legislação de alguns países prevê que animais positivos devem ser sacrificados, determinando a grande relevância do diagnóstico no controle da doença. Em estudo anterior desenvolveu-se a proteína *p26* recombinante (*rp26*) do VAIE, produzido na levedura *Pichia pastoris*, para uso como antígeno em imunoenaios. A finalidade do atual estudo foi padronizar um ELISA indireto (iELISA) utilizando a proteína *rp26* como antígeno e compará-lo com o teste padrão IDGA. Após a análise de 101 soros de animais IDGA-positivos e 704 IDGA-negativos no novo iELISA, foi observada uma excelente concordância ($kappa=0,9$) entre os testes. O ponto de corte (15%) foi selecionado pela observação da distribuição dos valores relativos das densidades ópticas das amostras IDGA-positivas e IDGA-negativas. A sensibilidade e especificidade relativas foram de 97% e 97,9%, respectivamente. Os ótimos resultados encontrados com o uso da *rp26* como antígeno no iELISA possibilita a consideração de uma nova alternativa de diagnóstico para AIE.

Palavras-chave: Diagnóstico; AIE; ELISA; IDGA; proteína recombinante *p26*; *P. pastoris* yeast.

Abstract

In many countries the agar gel immunodiffusion (AGID) is considered the unique official test for diagnostic of the animals infected with equine infectious anemia virus (EIAV). The law of some countries provides that positive animals should be sacrificed, determining the high relevance of diagnosis in disease control. In a previous study, we developed recombinant p26 (rp26) protein from EIAV produced in the yeast *Pichia pastoris* for use as antigen in immunoassays. The purpose of the present study was to standardize an indirect ELISA (iELISA) using rp26 protein as antigen and compare it with the standard serologic test AGID. After analyzing 101 AGID-positive and 704 AGID-negative sera for EIAV at the new iELISA, it was observed an excellent concordance ($Kappa=0.90$) between the tests. The cut-off point (15%) was selected by observing the distribution of the relative values of the optical densities of the AGID-positive and negative samples. The relative sensitivity and specificity were 97% and 97,9%, respectively. The excellent results using the rp26 as antigen in iELISA enables the consideration of a new alternative diagnostic test for EIA.

Key-words: Diagnostic; EIA; ELISA; AGID; p26 recombinant protein; *P. pastoris* yeast.

1 Introduction

Equine infectious anemia (EIA) is an equidae retrovirus which has three different stages of infection: acute, chronic and asymptomatic. The equine infectious anemia virus (EIAV) induces inflammatory responses that lead to a down-regulation of the erythropoietic system during the acute phase of infection (Felli et al., 2005). The EIA has no treatment or vaccine available and belongs at list of exclusive diseases for equine from the World Organization for Animal Health (OIE), constituting an important problem for the horse agribusiness worldwide (OIE 2012). This virus may have high prevalence in areas with hot and humid climate, which is associated with the main transmission form, carried by hematophagous insects (Issel and Foil, 1984).

The OIE recommends the serological tests agar gel immunodiffusion (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as official tests for the international trade of horses. However, most countries use only the AGID as standard serologic test for EIA. In USA and some areas with higher prevalence of EIA in Italy, the ELISA is used as screening test for complementation of EIA diagnosis (USDA/APHIS, 2007; Scicluna et al., 2013). Although considered to be suitable for the routine in the field, due to easy execution and low cost, the AGID test presents higher chances to obtain false-negative results (Issel et al., 1999). This fact may be related to two main reasons; the first is associated with the immunologic window period in the early phase of infection, because in this period it is not possible to detect serum antibodies in serological tests (ELISA and AGID) for up to 45 days post-infection (Coggins et al., 1972; Cook et al., 2013). And the second fact concerns the effective and durable viral neutralization occurred in asymptomatic and chronic phases of the disease that can generate very weak positive reactions in the AGID test, allowing misinterpretations.

For these cases, the sensitivity of ELISA is very important and should be used as screening test complementary to AGID (Craig et al., 2002; Issel et al., 2013).

The immune response of positive animals in the AGID and ELISA tests is mainly directed against the p26 protein, considering that this protein is produced in large quantities (Montelaro et al., 1982; Chen and Montelaro, 2003). Despite showing some genetic variability related to different geographic regions (Quinlivan et al., 2007; Cappelli et al., 2011), this protein is considered conserved because it suffers a lower pressure of immune selection when compared to surface glycoproteins (Zhang et al., 1999). The EIAV p26 protein has been produced in different heterologous expression systems, especially *Escherichia coli* (Jin et al., 1999; Alvarez et al., 2007; Piza et al., 2007). In this system, surface proteins such as gp90 were also produced (Reis et al., 2012). However, *E. coli* may produce recombinant proteins under insoluble form in the inclusion bodies, which makes the process of purification and recovery of intracellular products more laborious (Yang et al., 2011). On the other hand, it can be produced recombinant proteins in the yeast *Pichia pastoris* at low cost and good efficiency. This system performs better post-translational processing than the prokaryotes and enables the secretion of the protein facilitating its recovery (Pokoj et al., 2010). Considering that the control of EIA is based on the diagnosis and the importance of a diagnostic test complementary to AGID, the aim of this work was to standardize an indirect ELISA (iELISA) using EIAV rp26 protein produced in *P. pastoris* as antigen and compare this assay with the standard serologic test AGID.

2 Materials and methods

2.1 Production and preparation of the rp26 antigen for iELISA

The detailed description of the production of rp26 protein in *P. pastoris*, its identification, quantification and preparation for use in iELISA are described in Coutinho et al. (2013).

2.2 iELISA control sera

The serum of a set of four strongly positive animals in AGID test was collected and precipitated as described by Santos (1989), constituting the positive control serum (PC1) used in the test. Similarly, we obtained the negative control serum (NC), however for this group it was selected animals from controlled entities with frequent serological monitoring performed by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). All AGID tests were performed by official entities according to Brazilian legislation (Brazil, 2004) using the Bruch commercial kit (SP, Brazil).

2.3 iELISA test sera

A total of 101 AGID-positive and 704 AGID-negative samples were tested in the iELISA. All positive samples and 224 negative samples were obtained from animals inspected during interstate trips and from properties not monitored by MAPA. The 480 remaining negative samples were from properties monitored by MAPA.

2.4 iELISA standardization

The reagents concentrations were measured by titration using seven different concentrations of *P. pastoris* supernatant containing the rp26 protein ranging from 0,2 to 0,9 µg/well. It was used two dilutions of the protein G conjugate (1/45000; 1/90000) and of the PC1 and NC sera (1/50; 1/100). The best reagents concentrations were determined by the highest discrimination between positive and negative sera. Absorbance values were expressed by the positive/negative (P/N) ratio, using the average of duplicates in the follows form:

average OD of the positive control minus the blank divided for the OD average of the negative control minus the blank.

During 36 months, the biological activity of rp26 was monitored for use in the iELISA. Aliquots of the same batch of antigen produced in 2011, stored at -20°C, were thawed and used for periodic tests with maximum interval of one semester among them, in a total of nine evaluations until the first semester of 2014. During this period, the same batch and different batches of control sera were used. The determining criterion for this monitoring was the antigen functionality in the iELISA compared to the evaluated control sera. These sera were also periodically evaluated by AGID test.

2.5 iELISA

The iELISA was performed according to the descriptions detailed by Coutinho et al. (2013), with the following modifications: ELISA microplate with removable rows (Greiner Bio-One, SP, Brazil); dilution solution of serum 500 mM EDTA (in this solution it was added the supernatant of *P. pastoris* transformed with the pPICZαA empty vector in dilution of 1:25); incubation of the serum in the described solution at room temperature for 30 minutes before placed in the humid chamber; 50µl of tetramethylbenzidine (TMB) chromogenic substrate (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) was added directly to the wells; incubation of the microplate in a dark chamber at room temperature for 5 minutes; reaction interruption with 1N sulfuric acid.

2.6 iELISA performance analysis

2.6.1. Repeatability and reproducibility

The repeatability of the test was assessed by the variability of the optical density (OD) obtained in repetitions of known samples on the same plate. For this intraplate assay, besides

the positive control serum (PC1) previously described in section 2.2, it was used a second positive control serum (PC2) formed by another set of four strongly positive animals in AGID. The PC1, PC2 and NC were tested 16 times on each plate. The reproducibility (interplate variation) was evaluated using the same samples described above and performed 36 times for distinct executors in different days and plates. The means and the variation coefficients (VC) were calculated.

2.6.2. Comparative analysis of iELISA with the AGID test

The agreement between iELISA and AGID test was determined by Kappa statistics with 95% confidence interval using the program Epi Info version 2002 (Dean and Arner, 2002). The cut-off was defined based on the results of 480 AGID-negative samples from properties monitored by MAPA. The absolute values of OD were converted into relative numbers using the average of duplicates of PCV1 for each ELISA plate as 100% parameter (Castro et al., 1999). The estimates of sensitivity and specificity were calculated as described by Astudillo and Kantor (1981).

3 Results

3.1 Standardization

The best P/N ratio ($P/N = 26$) obtained in the standardization process determined the following titrations for the iELISA: serum dilution 1/50, antigen dilution 1/300 (0.3 $\mu\text{g}/\text{well}$) and conjugate dilution 1/90000. The analysis of absorbance data presented minimal difference between the negative control and blank (0.019).

The evaluation of iELISA showed the persistence of the functionality of rp26 antigen, even when it was used high dilutions of the antigen. Additionally, the test maintained an excellent ability to distinguish positive and negative sera during all the period of the study.

3.2 Qualitative analysis of the iELISA

3.2.1 Repeatability

Data analysis demonstrates excellent repeatability of the test, since that it was only observed mean standard deviation (SD) for the PC2 (SD = 0.027). The OD mean of PC2 was 0.819 (range 0.764 - 0.873) (mean \pm 2 SD) and the VC was 3%. The SD for the NC and PC1 was insignificant. The OD mean of NC was 0.020, varying between 0.017 and 0.026. The OD mean of PC1 was 0.576 (range 0.549 - 0.620).

3.2.2 Reproducibility

The OD mean of NC was 0.019 (range 0.012 - 0.026) (mean \pm 2 SD) and the VC was 19%. The OD mean of PC1 was 0.579 (range 0.473 - 0.685) (mean \pm 2 SD) and the VC was 9%.

3.2.3 Comparison between AGID test and iELISA

The OD mean of 480 AGID-negative sera used to define the cut-off was 3% and the standard deviation was also 3%. The 15% cut-off value (mean + 4 SD) determined that of 805 sera tested in iELISA, 787 were in agreement with AGID test and 18 were discordant. Among the discordant samples, 3 animals were considered false positive and 15 false negative (Table 1). These discordant samples can be observed in the intersection area of the frequency distribution of positive and negative samples (between 5% and 40%), represented in Figure 1. The concordance between the tests was 98% (Kappa index = 0.90) and the sensitivity and specificity were 97% and 97.9%, respectively.

4 Discussion

The P/N ratio obtained in the iELISA standardization indicates excellent discrimination between positive and negative sera. In this iELISA, there is little difference between the OD values of NC and blank. This little difference may be related to the fact that *P. pastoris* is not considered pathogenic to mammals; by contrast, this yeast is currently studied as immunomodulators and induces growth in swine (Peng et al., 2014). The absence of immunological memory against native *P. pastoris* proteins in negative sera of horses may justify the OD values very similar to blank.

The data obtained in iELISA corroborate with the well-discussed sensitivity of this assay (Suzuki et al., 1982; Reis and Leite, 1994), since 15 AGID-negative samples were positive in iELISA. This fact may be associated with the possibility of these animals were tested in the period before the appearance of detectable serum antibodies or effective immune response, which determines the necessity of this samples be retested by ELISA and AGID (Cook et al., 2001), or Western Blot (Issel et al., 2013). For the AGID-positive samples, it was obtained high level of agreement in the iELISA, since only 3 samples were negative, that may be related to nonspecific reactions or misclassification (Astudillo and Kantor, 1981).

The VC (repeatability and reproducibility) of iELISA were below the limit of 20% variability cited by Jacobson (1998), which is considered a good result. Furthermore, statistical analyzes revealed Kappa coefficient of 0.90, interpreted as excellent agreement between AGID and iELISA (Landis and Koch, 1977). The similarity between these tests can be explained because both assays utilize p26 as antigen, so it is expected very close sensitivity (97%) and specificity (97.9%) data (Reis et al., 2012).

The production of viral proteins from cell culture is widely used and produces proteins with very similar conformation to the native one (Kim et al., 1992), however it has higher cost and requires more manufacturing steps (up to ten times more steps than the production of recombinant antigens). Additionally, the presence of bovine serum proteins or even proteins

from cells removed of the horses, used for the cultivation, contributes to conflicting results immunoassays (Langemeier et al., 1996). Among the recombinant systems, *E. coli* is the most widely used despite the known limitation that prokaryotes have for protein processing. However, primary peptide structures are able to induce immune responses forming antigen-antibody complex. Thus it becomes possible to obtain satisfactory results in immunological assays using as antigens glycosylated proteins produced in prokaryotic expression systems (Jenkins et al., 1996; Reis et al., 2012). Even so, it was used the yeast *P. pastoris* that presents the ability to produce recombinant proteins with good processing pattern (Macauley-Patrick et al., 2005) and secrete proteins, reducing the purification steps (Kobayashi et al., 2000).

The results presented in Coutinho et al. (2013) demonstrated that rp26 produced in *P. pastoris* system was secreted and recovered through a simple process of dialysis. Current results show that, even after 24 months of storage, the rp26 protein maintained its functionality. Maintain the quality of biological macromolecules has become a major challenge in the development of biotechnological products. In this sense, Singha et al. (2014) presented good results with the utilization of deuterated water (D₂O) to evaluate the stability of recombinant EIAV p26 protein used in an ELISA. However, in this study, it was considered that the extracellular environment in which the rp26 was stored do not damaged its structure and that the mechanisms used for protein stabilization were sufficient to maintain the bioactivity of the recombinant protein.

One of the variations that ELISA may present to minimize false-positive results is the use of protein G as conjugate (Zanoni et al, 1989; Lambert et al., 1998). The great affinity that this protein possesses with IgG molecules enables its use as a substitute for secondary antibody classically applied in ELISA (Kronvall, 1973; Encinas et al., 2011). Furthermore, it is also described that the use of this protein in ELISA can minimize background reactions (Ficapal et al., 1995), which was also observed in this study.

In the EIAV infection, it is considered that the first antibodies are against the surface glycoproteins, specifically gp90, whose titers are up to 10^2 - 10^3 higher than the antibodies produced against p26 (Montelaro et al., 1984; O'Rourke et al., 1988). However, because of the immune pressure, these glycoproteins undergo frequent changes in the glycosylation process which results in a mechanism of viral escape (Wei et al., 2003). Associated with this, the glycosylation process may simply mask the immune neutralization epitopes (Kwong et al., 2002; Sponseller et al., 2012). Taking these facts into consideration, we chose to use the p26 protein, which despite showing some genetic variability, have considered their coding sequences conserved among different viral strains.

Facing the necessity to more accurate diagnoses for EIA, some options have been proposed. The nested PCR is described as a good option to detect EIAV early infections (Santos et al., 2011; Dong et al., 2012). However, the primers recommended by the OIE and conditions for amplification may not produce amplicons from plasma or tissue samples. This fact may be attributed to genetic variability found in the gag region of the viral genome in isolates from different geographical locations (Boldbaatar et al., 2013). This limitation may hinder the use of molecular techniques for the EIA diagnosis in routine examinations. On the other hand, ELISA is a method already well established and used as the official screening test (complementary to AGID) by some countries like USA and some regions of Italy (Matsushita et al., 1989; Issel and Cook, 1993).

Besides ELISA, Western blot assay has also been proposed as a third option for EIA diagnosis, especially in cases of disagreement between the ELISA and AGID, generally associated with formation of non specific lines in the latter test (Alvarez et al., 2007; Issel et al., 2013). According to Issel et al. (2013), for greater control of EIA, it is necessary to eliminate any chance of keeping false negative animals in the herd, even if it is necessary to consider the possibility of false positive diagnosis. Corroborating with these authors, it is

understood that every effort to ensure greater accuracy in the diagnosis of EIA is valid. This justifies the definition of the cut-off value in 15% for the iELISA, which favors on the diagnostic sensitivity (Martinez et al., 2003), necessary for the AGID complementation.

In conclusion, *P. pastoris* expression system revealed a good choice for the synthesis of EIAV rp26 protein due to its easy recovery from the culture supernatant, good biological activity for the proposed assay during a long period (the antigen was evaluated during 36 months) and low cost of production. The great results using the rp26 as coating antigen in iELISA allows the consideration of a new alternative for EIA diagnosis.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was sponsored by the Foundation for the Support of Science and Technology Pernambuco State (FACEPE), Research and Projects Financing (FINEP) (PAPPE - 2008; Proc APS 0338-5.05/08), and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPQ) and Biovetech. The authors would like to thank Dr Hans Aymeric from the Laboratory for Equine Disease (Maisons-Alfort, France) for supplying the OIE reference anti-EIAV serum and the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock for granting an import license. Some of the experiments were conducted in the Laboratory of Molecular and Experimental Therapy Studies (LEMTE) at the Federal University of Pernambuco (UFPE).

References

- Alvarez, I., Gutierrez, G., Ostund, E., Barrandeguy, M., Trono, K., 2007. Western Blot Assay Using Recombinant *p26* Antigen for Detection of Equine Infectious Anemia Virus-Specific Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1616–1648.
- Astudillo, V.M., Kantor, I.N., 1981. El problema de La validez de una prueba diagnostica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificacion. *Boletim Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 43, 37-44.
- Boldbaatar, B., Bazartseren, T., Koba, R., Murakami, H., Oguma, K., Murakami, K., Sentsui, H., 2013. Amplification of complete gag gene sequences from geographically distinct equine infectious anemia virus isolates. *Journal of Virological Methods* 189, 41-46.
- Brasil, 2004. Normas para a prevenção em o controle da Anemia Infecciosa Equina –AIE. Instrução Normativa 45 de 15 de junho de 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, Diário Oficial, Brasília, DF, Brasil.
- Cappelli, K., Capomaccio, S., Cook, F.R., Felicetti, M., Marenzoni, M.L., Coppola, G., Verini-Supplizi, A., Coletti, M., Passamonti, F., 2011. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 27–33.
- Castro, R.S., Leite, R.C., Resende, M.; Gouveia, A. M.G., 1999. A Labelled Avidin-Biotin ELISA to Detect Antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis Virus in Goats Sera. *Veterinary Research Communications* 23, 512-522.
- Chen, C., Montelaro, R.C., 2003. Characterization of RNA elements that regulate gag-pol ribosomal frameshifting in equine infectious anemia virus. *Journal of Virology* 77, 10280–10287.
- Coggins, L., Norcross, N.L., Nusbaum, S.R., 1972. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *American Journal of Veterinary Research* 33, 11–18.

- Cook, S.J., Cook, R.F., Montelaro, R.C., Issel, C.J., 2001. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Veterinary Microbiology* 79, 93–109.
- Cook, R.F., Leroux, C., Issel, C.J., 2013. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Veterinary Microbiology* 167, 181-204.
- Coutinho, L.C.A., Jesus, A.L.S., Fontes, K.F.L.P., Coimbra, E.C., Mariz, F.C., Freitas, A.C., Maia, R.C.C., Castro, R.S., 2013. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods* 191, 95-100.
- Craig, J.K., Leroux, C., Howe, L., Steckbeck, J.D., Cook, S.J., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2002. Transient immune suppression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. *Journal General Virology* 83, 1353–1359.
- Dean A.G., Arner, T.G. Epi-Info, version 2002: a word processing, data base, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention 2002.
- Dong, J.B., Zhu, W., Cook, F.R., Goto, Y., Horii, Y. Haga, T., 2012. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Archives of Virology* 157, 2105-2111.
- Encinas, P., Gomez-Casado, E., Estepa, A., Coll, J.M., 2011. An ELISA for detection of trout antibodies to viral haemorrhagic septicemia virus using recombinant fragments of their viral G protein. *Journal of Virological Methods* 176, 14-23.
- Felli, N., Pedini, F., Zeuner, A., Petrucci, E., Testa, U., Conticello, C., Biffoni, M., Di Cataldo, A., Winkles, J.A., Peschle, C., De Maria, R., 2005. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *Journal of Immunology* 175, 1464–1472.

- Ficapal, A., Alonso-Urmeneta, B., Velasco, J., Moriyón, I., Blasco, J. M., 1995. Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Veterinary Record*, 137, 145-147.
- Issel, C.J.; Cook, R.F., 1993. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 137–141.
- Issel, C.J., Foil, L.D., 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 184, 293–297.
- Issel, C.J., Cook, S.J., Cook, R.F., Cordes, T.R., 1999. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). *Journal of Equine Veterinary Science* 19, 728–732.
- Issel, C.J., M.T. Scicluna, S.J. Cook, R.F. Cook, A. Caprioli, I. Ricci, F. Rosone, J. K. craigo, R. C. Montelaro, Autorino, G. L., 2013. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record* doi: 10.1136/vr-2012-100735.
- Jacobson, R.H., 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Epizooties* 17, 469–526.
- Jenkins N, Parekh RB, James DC., 1996. Getting the glycosylation right—implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* 14, 975–981.
- Jin, Z.; Jin, L.; Peterso, N.D.L., Lawson, C.L.J., 1999. Model for Lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV *p26*. *Molecular Biology* 286, 83 – 93.
- Kim, C.H.; Casey, J.W., 1992. Genomic variation and segregation of equine infectious anemia virus during acute infection. *Journal of Virology* 66, 3879-3882.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Tomomitsu, K., 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fedbatch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 280–288.

- Kronvall, G., 1973. A surface component in group A, C and G Streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *The Journal of Immunology* 111, 1401-1406.
- Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J.C., 2002. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking or receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.
- Lambert, M., Calamel, M., Dufour, P. E., Cabasse, C. Vitu, M. Pépin, 1998. Detection of false-positive serum in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 70, 326-330.
- Landis, J.R., Kock, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Langemeier, J.L.; Cook, S.J.; Cook, R.F.; Rushlow, K.E.; Montelaro, R.C.; Issel, C.J., 1996. Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1481-1487.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., Mcneil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270
- Martinez, E.Z., Louzada- Neto, F., Pereira, B.B, 2003. A curva ROC para testes diagnósticos. *Caderno de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro* 11, 7-31.
- Matsushita, T.; Hesterberg, L.K., Porter, J.P., Smith, B. J., Newman, L. E., 1989. Comparison of diagnostic tests for the detection of equine infectious anemia antibody. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1, 50-52.
- Montelaro, R.C., Lohrey, N., Parekh, B., Blankeney, E.W., Issel, C.J., 1982. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia. *Journal of Virology* 42, 1029–1038.

- Montelaro R.C., Parekh B., Orrego A., Issel C.J., 1984. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anaemia, a retrovirus. *Journal of Biological Chemistry* 16, 10539–10544.
- O' Rourke, K.I., Besola, M.L., McGuire, T.C., 1991. Proviral sequences detected by polymerase chain reaction in peripheral blood cells of horses with equine infectious anemia lentivirus. *Archives of Virology* 117, 109-119.
- OIE, 2012. Equine Infectious Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th edition, pp. 866–870 (Chapter 2.5.6).
- Peng, Z., Wang, A., Feng, O., Wang, Z., Ivanova. I.V., He, X., Zhang, B., Song, W., 2014. High-level expression, purification and characterization of porcine β -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potencial as a cost-efficient growth promoter in porcine feed. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 5487-5497.
- Piza, A.S.T., Pereira, A.R., Terreran, M.T., Mozzer, O., Tanuri, A., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Preventive Veterinary Medicine* 78, 239-45.
- Pokoj, S., Lauer, I., Fötish, K., Himly, M., Nari, A., Enrique, E., Miguel-Moncin, M.M.S., Lidholm, J., Vieths, S., Scheurer, S., 2010. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non -specific lipid -transfer protein. *Protein Expression and Purification* 69, 68–75.
- Quinlivan, M., Cook, R.F., Cullinane, A., 2007. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on equence determination of the gag gene. *Veterinary Record* 160, 611–618.

- Reis, J.K.P., Leite, R.C., 1994. Otimização da produção e estabilização do antígeno do vírus da anemia infecciosa equina, para uso diagnóstico. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 46, 380–385.
- Reis, J.K.P, Diniz, S.R., Haddad, J.P.A., Ferraz, I.B.F., Carvalho, A.F., Kroon, E.G., Ferreira, P.C.P., Leite, R.C, 2012. Recombinant envelope protein (*rgp90*) ELISA for equine anemia vírus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *Journal of Virological Methods* 180, 62-67.
- Santos, M.C., Lima, M.R.D'Império, G.C., Furtado, Colleto, G.M.D.D., T.L. Kipnis, Silva, W.D., 1989. Purification of F (ab')₂ Anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon* 273, 297 – 303.
- Scicluna, M. T., Issel, C.J., Cook, F.R., Manna, G., Cersini, A., Rosone., F., Frontoso, R., Caprioli, A., Antonetti, V., Autorino, G.L., 2013. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology* 165, 123-134.
- Singha, H., Goyal, S. K., Malik, P., Singh, R. K. 2014. Use of water (D₂O) in developing thermostable recombinant *p26* protein based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serodiagnosis of equine infectious anemia virus infection. *Hindawi*
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/620906>.
- Sponseller, B. A., Clark, S.K., Friedrich, A.R., 2012. Mechanisms of Equine Infectious Anemia Virus escape from neutralizing antibody reponses from define epitope specificity. *Viral Immunology* 25, 324-328.
- Suzuki, T., Ueda, S., Samejima, T., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Microbiology* 7, 307–316.

United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service (2002).

Equine Infectious Anemia Uniform Methods and Rules.

<http://www.aphis.usda.gov/oa/pubs/eiaumr.pdf>

Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F.,

Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S. Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H. Kwong,

P.D., Shaw, G.M., 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307-312.

Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao,

C., Wang, X., 2011. Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion

Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method. *Plos one* 6, 1–8.

Zanoni, R., Krieg, A., Peterhans, E., 1989. Detection of antibodies to caprine arthritis-

encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting.

Journal of Clinical Microbiology 27, 580-582.

Zhang, W., Auyong, D.B., Oaks, J.L., McGuire, T.C., 1999. Natural variation of equine

infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virology*

261, 242–252.

TESTS	AGID +	AGID -	TOTAL
iELISA +	98	15	113
iELISA -	3	689	692
TOTAL	101	704	805

Table 1. Comparison between results of serological analysis with iELISA and AGID.

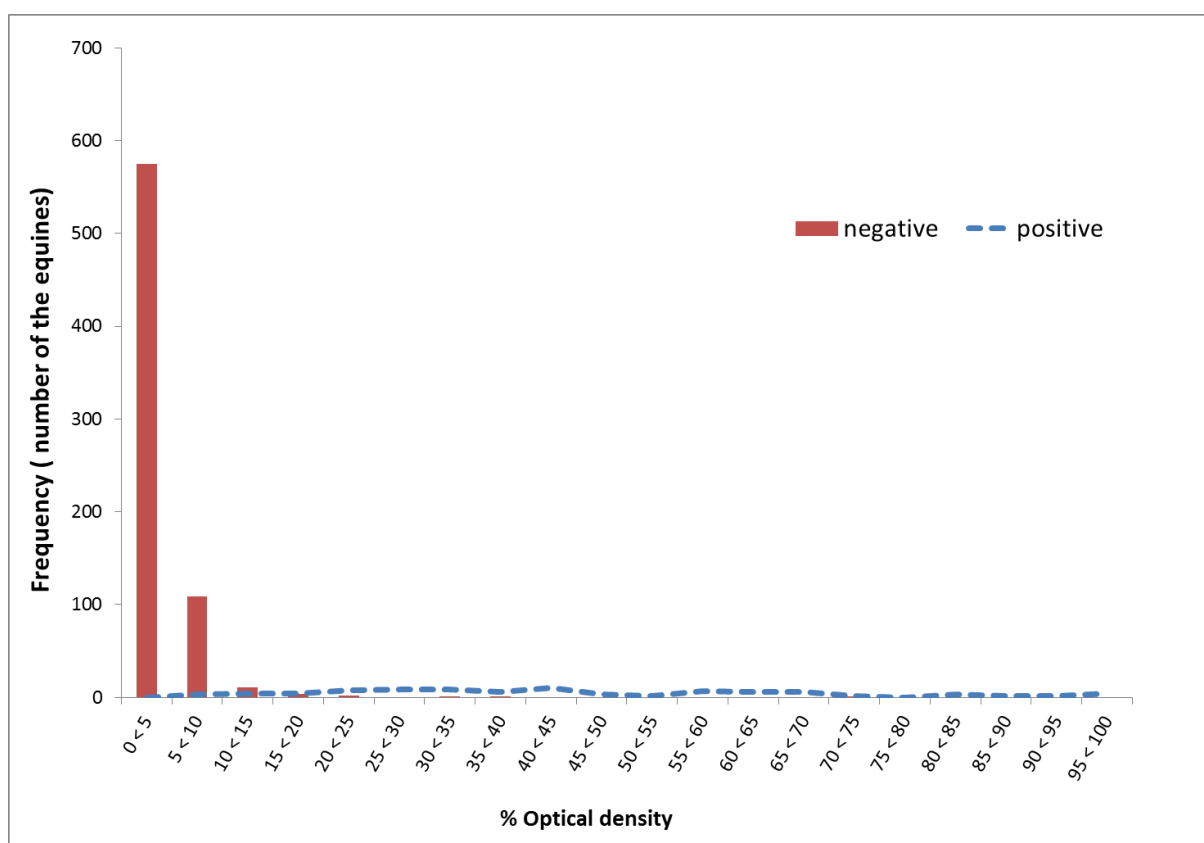


Figure 1. Distribution of relative values of OD from 101 AGID-positive and 704 AGID-negative equine sera.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como a maior parte das amostras de soro testadas no iELISA foi proveniente do nordeste brasileiro, e diante da falta de trabalhos que descrevam os tipos e variações das cepas do VAIE circulantes no Brasil, não foi possível discutir a cobertura que o novo ELISA, aqui desenvolvido, pode alcançar. Isto deve ser objeto de reflexão, uma vez que estudos mais recentes vêm demonstrando a variabilidade da p26 relacionada a diferentes áreas geográficas. Considerando-se que o Brasil tem dimensões continentais, esta questão torna-se mais importante ainda.

Mesmo com excelentes resultados do iELISA, obtidos a partir da síntese do antígeno em *P. pastoris*, faz-se necessário registrar algumas críticas em relação ao uso deste sistema. Apesar de todas suas qualidades já descritas, o sistema *P.pastoris* não produziu uma quantidade de proteína tão grande quanto o sistema *E. coli*, que também é utilizado para produzir a p26 para os mesmos fins em outro estudo paralelo. No ensaio de IDGA, que requer uma significativa quantidade de proteína para possibilitar boa visualização da linha de precipitação no gel, a *rp26* produzida em *P. pastoris* não demonstrou bom desempenho, produzindo linhas de baixa intensidade; fato que foi relacionado à quantidade de proteína produzida. É bem verdade que isto não foi um problema para o iELISA, uma vez que este teste, ao contrário do IDGA, requer quantidades mínimas de reagentes. Além disso, é importante relatar que foi realizada uma tentativa de otimização da produção da *rp26* em biorreator, porém sem sucesso. As análises do sobrenadante nos ensaios de bioatividade não demonstraram a presença da proteína. Apesar de frustrante, esta não é uma condição rara de acontecer. A literatura relata inúmeros casos de dificuldades em se reproduzir proteínas bioterapêuticas de alta qualidade ou simplesmente funcionais, mesmo em sistemas como o de *P. pastoris*. Entretanto, não se deve inferir maiores críticas a este processo de otimização, uma vez que o mesmo não foi repetido.


Quanto ao diagnóstico de AIE com o iELISA, é válido salientar que o teste não atende a necessidade do diagnóstico precoce, mantendo aberta a janela imunológica da doença. Através da análise de infecção experimental, é relatado que, assim como no IDGA, somente após 45 d.p.i. os anticorpos contra p26 são detectáveis no soro dos animais infectados. Mesmo assim, considera-se a importância do ELISA na complementação diagnóstica para AIE, por ser um teste bem mais sensível que o IDGA. Para animais que possuem carga viral muito baixa, como é o caso de grande parte dos asininos e muares, ou mesmo para aqueles equinos

que se encontram no estado crônico/inaparente, o ELISA é uma ferramenta extremamente útil, pois pode evitar o diagnóstico falso-negativo.


8 APÊNDICE A – Comitê de Ética UFRPE

Para que pudessem ser coletados os soros controle-positivo utilizados no iELISA fez-se necessário formar processo junto ao Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da UFRPE. Todas as coletas foram realizadas conforme descrição no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido momentos antes da eutanásia dos animais determinada pelo MAPA. A seguir são apresentados os documentos que compõem o processo de aprovação deste projeto no CEUA.

LICENÇA Nº -
016/2012
011608/2011-D03



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



SOLICITAÇÃO DE LICENÇA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

1. IDENTIFICAÇÃO DO SOLICITANTE


NOME	Roberto Soares de Castro
INSTITUIÇÃO DE ORIGEM	Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
CARGO/FUNÇÃO	Professor Associado de Vírus dos Animais Domésticos
DEPARTAMENTO/UNIDADE ACADÊMICA	Departamento de Medicina Veterinária
ENDEREÇO ELETRÔNICO E TELEFONE	[REDACTED]

2. DADOS DA EQUIPE

NOME	FORMAÇÃO/QUALIFICAÇÃO	FUNÇÃO
Roberto Soares de Castro	Médico Veterinário/ Virologista	Coordenador
Rita de Cássia Maia	Médico Veterinário /Microbiologista Molecular	Colaboradora
Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho	Médica Veterinária	Execução do projeto
Karin Florencio Lins de Paiva Fontes	Biomédica	Execução do projeto
Luiz Cosme da Silva Júnior	Médico Veterinário	Execução do projeto

3. DADOS GERAIS DO PROJETO

TÍTULO	USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE P26 DO VIRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA PRODUZIDA EM <i>Pichia pastoris</i> PARA TESTES DIAGNÓSTICOS
ÁREA TEMÁTICA	Medicina Veterinária Preventiva
FINANCIAMENTO	FACEPE/ FINEP
DATA INICIO/TÉRMINO	Março/2011 a Março/2015
LOCAL DE EXECUÇÃO	Departamento de Medicina Veterinária (Laboratório de virologia animal - LAVIAN)


CEUA - UFRPE
Aprovado em
13/07/2012
Validade
13/07/2014

4. RESUMO DO PROJETO

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é causada por um lentivírus da família *Retroviridae* capaz de produzir uma infecção persistente, potencialmente fatal em equídeos. O Vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE), caracteriza-se por apresentar um quadro degenerativo, não existindo vacina ou tratamento eficiente para a doença. Esta virose, endêmica no Brasil, possui altas prevalências em áreas de clima quente e úmido, refletindo a forma mais comum de transmissão realizada por insetos hematófagos. O rebanho equídeo é estimado em 120 milhões de animais no mundo, ficando o Brasil na quarta posição, com aproximadamente seis milhões de equinos. O diagnóstico da AIE é realizado através do teste de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), indicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Animais positivos devem ser eutanasiados de acordo com a legislação vigente, fato que justifica a grande preocupação e vigilância da doença. Diante deste cenário, desenvolveu-se a proteína p26 recombinante (p26r) do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) produzido na levedura *Pichia pastoris* para ser utilizado nos imunoenaios IDGA e ELISA. Portanto, tem-se como objetivos para este projeto de doutorado a otimização dos bioprocessos envolvidos na produção do antígeno recombinante, bem como a padronização e a validação dos testes sorológicos referidos, utilizando-se a proteína p26r do VAIE. O processo de produção da proteína recombinante p26r do VAIE descrito em Coutinho (2011) deverá ser otimizado mediante matriz de variação de condições físico-químicas. Deverão ser realizadas a padronização e a validação dos testes sorológicos IDGA/ELISA p26r que se mostraram capazes de reconhecer a proteína recombinante, indicando seu potencial diagnóstico. Com o intuito de alcançar esses objetivos teremos como meta a análise da resposta sorológica de 100 animais negativos e 200 positivos. Para isto, nossa equipe conta com amostras de soros advindos de animais previamente testados pertencentes a laboratórios credenciados pelo MAPA. Entretanto, para completar nosso número amostral, também serão necessárias coletas de soro de animais positivos que estão sob a custódia do MAPA, seguindo a legislação vigente. Espera-se, ao final do projeto, a obtenção de um processo aperfeiçoado para a produção do antígeno recombinante em questão, e que o mesmo possa ser utilizado em diferentes testes diagnósticos para detecção da Anemia Infecciosa Equina.

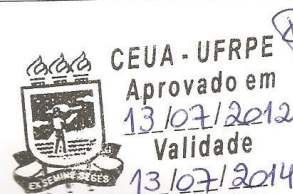
5. JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO (DESTACAR A RELEVÂNCIA DO PROJETO E CONTRIBUIÇÃO PARA O AVANÇO DO CONHECIMENTO ATUAL E/OU POTENCIAIS BENEFÍCIOS PARA A ESPÉCIE SOB ESTUDO E/OU ESPÉCIE HUMANA)

O MAPA instituiu medidas sanitárias obrigatórias no combate à AIE em todo território nacional, que incluem o diagnóstico oficial, pela prova IDGA; sacrifício ou isolamento dos animais positivos e exigência do certificado negativo para trânsito interestadual e concentrações de equídeos, como feiras e exposições. Neste sentido, ressalta-se a importância do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas diagnósticas que ajudem na adoção de medidas de controle da doença no país. Assim, faz-se necessário a coleta de sangue de animais positivos a ser utilizada no processo de validação dos testes sorológicos IDGA/ELISA p26r. O trabalho com proteínas virais recombinantes, que representam apenas uma fração do vírus e não a partícula viral completa, proporciona uma menor exposição aos manipuladores, fato que está em consonância com os preceitos de biossegurança. Além disso, a expansão da plataforma tecnológica dominada durante a execução do projeto permitirá sua aplicação a outras enfermidades.

6. INFORMAÇÕES SOBRE O (S) ANIMAL (IS) SUJEITO À EXPERIMENTAÇÃO

ESPÉCIE/NOME
VULGAR

Equus caballus / equino – não serão utilizados para experimentação, apenas sujeitos a coleta de sangue única.



IDADE	Todas as faixas etárias
SEXO	Ambos os sexos
ORIGEM	Oriundos de propriedades particulares – o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do proprietário também se encontra anexado ao projeto.

7. INFORMAÇÕES SOBRE O DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

TIPO DE DELINEAMENTO	Amostra de conveniência	
NÚMERO DE ANIMAIS	POR GRUPO	TOTAL
	Não serão separados por grupos.	

8. INFORMAÇÕES SOBRE MANEJO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

TIPO E TAMANHO DA INSTALAÇÃO (GAIOLA, BAIA, TANQUE, ETC.)	Não haverá animais experimentais neste experimento
DENSIDADE POPULACIONAL POR ÁREA/VOLUME	
CLIMATIZAÇÃO (CASO SE APLIQUE)	
RENOVAÇÃO DO AR/ÁGUA (CASO SE APLIQUE)	
ALIMENTAÇÃO (TIPO, QUANTIDADE E FREQUÊNCIA)	
ÁGUA (QUANTIDADE E FREQUÊNCIA)	
HIGIENIZAÇÃO (TÉCNICA E FREQUÊNCIA)	
COLETA E DESTINO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS	
OUTRAS INFORMAÇÕES	


CEUA - UFRPE
 Aprovado em
 13/07/2012
 Validade
 13/07/2014

9. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PREENCHER UM QUADRO PARA CADA TIPO)

NOME DO PROCEDIMENTO	Coleta de sangue venoso
REQUER INDUÇÃO DE PATOLOGIA OU LESÃO?	Não
GRAU DE SEVERIDADE ¹	Branda
PROVOCA, INTENCIONALMENTE, ESTRESSE NO (S) ANIMAL (IS)?	Não.
PROVOCA, INTENCIONALMENTE, DOR NO (S) ANIMAL (IS)?	Não.
O (S) ANIMAL (IS) SERÁ (ÃO) IMOBILIZADO (S)? ESPECIFICAR (TIPO E TÉCNICA)	Não.
SERÁ REALIZADO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO? ESPECIFICAR (TIPO, TÉCNICA E FREQUÊNCIA).	Não.
USARÁ SEDAÇÃO/ANALGESIA/ANESTESIA? ESPECIFICAR (DROGA, DOSAGEM, VIA E FREQUÊNCIA)	Não.
QUAL O LOCAL ONDE SERÁ REALIZADO O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO?	Não se aplica.
INDIQUE O MÉDICO VETERINÁRIO RESPONSÁVEL ² , INCLUSIVE CRMV, CASO SE APLIQUE	Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho CRMV-PE 3706
USARÁ PROTOCOLO DE PREVENÇÃO DE DOR NO PÓS-CIRÚRGICO? ESPECIFICAR (DROGA, DOSAGEM, VIA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica.
SERÁ REALIZADA EXPOSIÇÃO, INOCULAÇÃO ³ OU ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIA? ESPECIFICAR (TIPO, DOSAGEM, VIA E FREQUÊNCIA)	Não se aplica.
SERÁ REALIZADA EXTRAÇÃO DE FLUIDOS/TECIDOS? ESPECIFICAR (TIPO, MÉTODO DE COLHEITA, QUANTIDADE E FREQUÊNCIA)	Sim. Sangue por venopunção com sistema de coleta a vácuo (vacutainer), 9 mL por animal em coleta única.
SERÁ REALIZADA EUTANÁSIA ⁴ /ABATE ⁵ DURANTE O EXPERIMENTO? ESPECIFICAR (NÚMERO DE ANIMAIS, TÉCNICA, DROGA, DOSAGEM, ETC)	Não se aplica.

¹Para classificação considerar o Guia de Preenchimento do protocolo CEUA-Fiocruz, disponível no link CEUA-UFRPE

²De acordo com a Lei 5.517 de 23 de outubro de 1968, Art. 5º, alínea "a".

³Em caso de inóculo infeccioso, indicar a classe de risco

⁴Considerar a Resolução nº 714 de junho de 2002 do CFMV (atualizada em 2008).

⁵Considerar técnica recomendada pela legislação vigente, de acordo com a espécie (MAPA Instrução Normativa Nº 3, de 17 de janeiro de 2000)

10. JUSTIFICATIVA PARA O ENVOLVIMENTO DE ESTRESSE E/OU DOR INTENCIONAL NO (S) ANIMAL (IS) EXPERIMENTAL (IS) - CASO SE APLIQUE

Não se aplica.

11. INFORMAÇÕES SOBRE O DESTINO DO (S) ANIMAL (IS) VIVO (S) OU MORTO (S), APÓS O TÉRMINO DO EXPERIMENTO¹:

Não se aplica.

 CEUA - UFRPE
Aprovado em
13/07/2012
Validade
13/07/2014

¹Inclusive reutilização do (s) animal (is). Neste caso, justificar.

12. INFORMAÇÕES SOBRE AS CONDIÇÕES DE BIOSSEGURIDADE E IMPACTO AMBIENTAL OFERECIDOS PELO EXPERIMENTO – CASO SE APLIQUE

Não se aplica.



 CEUA - UFRPE
Aprovado em
13/07/2012
Validade
13/07/2014

13. TERMO DE RESPONSABILIDADE:

Certifico que este projeto não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe responsável/colaboradora é treinada para executar os procedimentos descritos nesse protocolo, estando todos cientes dos Princípios Éticos na Experimentação Animal constantes na legislação vigente e no Regimento Interno da CEUA-UFRPE e concordo plenamente com as suas exigências durante a execução desse experimento.

NOME: Roberto Soares de CastroDATA: 24/07/2012ASSINATURA: 

ASSINATURA DO MÉDICO VETERINÁRIO RESPONSÁVEL (CASO SE APLIQUE):

CRMV: 



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(ao Proprietário ou Responsável)

Nome da Pesquisa: USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE P26 DO VIRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA PRODUZIDA EM *Pichia pastoris* PARA TESTES DIAGNÓSTICOS

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE

Prezado Senhor (a),

Estamos realizando um estudo sobre a Anemia Infecciosa Equina (AIE) para contribuir com o controle da doença. Sabemos que a AIE é uma doença causada por um vírus, que é transmitida por insetos, possuindo caráter crônico, não existindo tratamento ou vacina. O objetivo dessa pesquisa é aprimorar os métodos diagnósticos já existentes, desenvolvendo um novo kit diagnóstico mais eficiente.

Assim, pedimos a permissão para coletar sangue de seu animal afim de que este material biológico possa entrar no banco de amostras da pesquisa para estudos posteriores, sendo sua participação voluntária. O volume total de sangue a ser coletado será de 1,0 L (3 latas de coca-cola), numa única vez, por punção venosa, em sistema de coleta com bolsa de sangue, usando seringa estéril e descartável. O procedimento será realizado por um médico veterinário capacitado que trabalhará respeitando o bem-estar do animal. Queremos esclarecer que os riscos são mínimos, pois a coleta de sangue é um método rotineiramente utilizado. No entanto, alguns desconfortos podem ocorrer como pequenos hematomas (manchas roxas no local da coleta).

Ao participar, o senhor estará contribuindo para um melhor controle da doença, tendo garantido os seguintes direitos:

1. Receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. A segurança de que não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade.

Solicitamos ainda a sua autorização para que as informações desta pesquisa possam ser apresentadas em publicações científicas sem que o seu nome apareça. Se o Senhor (a) concordar que o seu animal participe da pesquisa, pedimos que assine este documento, em duas vias, dizendo que entendeu as explicações e que está de acordo. Uma via ficará em sua posse e a outra em posse do coordenador da pesquisa, Dr. Roberto Soares de Castro.

Eu, _____,
portador da cédula de Identidade, RG nº _____, residente à

_____ (MUNICÍPIO JOÃO ALFREDO)

tendo recebido as informações e ciente dos meus direitos acima relacionados, como responsável pelo animal COCADA, do sexo M, de pelagem CASTANHA concordo com sua participação nesta pesquisa.

Assinatura do proprietário (ou responsável):

Data: 11 / 02 / 11.

Assinatura de um membro da equipe:

Pesquisador responsável: Prof.Dr. Roberto Soares de Castro

Obs: Em caso de dúvidas ou questionamentos procurar as pesquisadoras do LAVIAN/UFRPE –Luciana Coutinho ou Karin Fontes, no telefone: _____

9 APÊNDICE B – Figuras A e B

Figura (A). Eutanásia de animais IDGA-positivos para AIE.
Fonte: arquivo pessoal

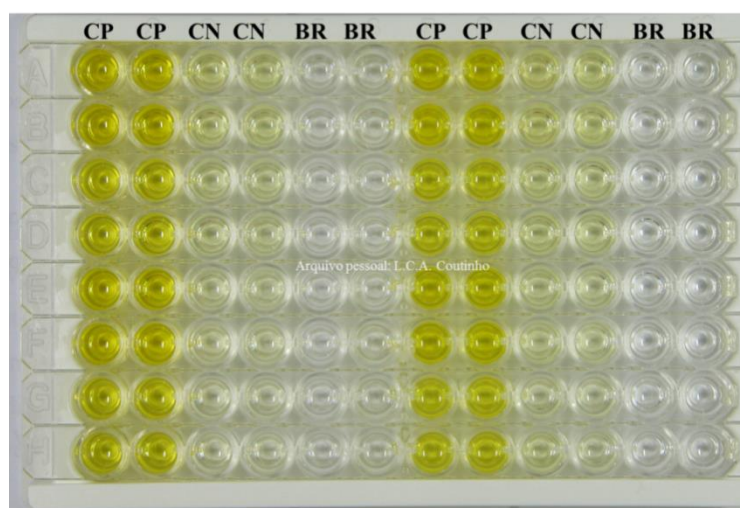
iELISA-Grp26Pp

Figura (B). Placa do iELISA-Grp26Pp . CP: controle positivo; CN: controle negativo; BR: branco.
Fonte: arquivo pessoal