



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JÉSSICA MÜLLER

**PROTOCOLO PARA AUMENTAR A SEGURANÇA NO DIAGNÓSTICO DA
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**

Gurupi – TO

2024

Jéssica Müller

Protocolo para aumentar a segurança no diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Eduardo de Oliveira Melo.
Coorientador: Paulo Sérgio Ribeiro de Mattos.

Gurupi – TO

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M958p Müller, Jéssica.

Protocolo para aumentar a segurança no diagnóstico da Anemia Infeciosa Equina. / Jéssica Müller. – Gurupi, TO, 2025.
89 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2025.

Orientador: Eduardo de Oliveira Melo

Coorientador: Paulo Sérgio Ribeiro de Mattos

1. Revisão de Literatura sobre Anemia Infeciosa Equina. 2. Influência dos anticoagulantes na extração e amplificação de DNA genômico equino. 3. Extração e amplificação de DNA genômico para genotipagem equina em amostras de soro e coágulo. 4. Extração e amplificação de DNA proviral do Virus da Anemia Infeciosa Equina em amostras de soro e coágulo. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, pelas oportunidades que Ele me proporcionou e por guiar cada passo desta caminhada.

À minha família e amigos, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Em especial, aos meus pais e ao meu noivo por serem minha base, sempre acreditarem em mim, por estarem sempre ao meu lado, oferecendo força e encorajamento.

Ao meu orientador, Eduardo Melo, por depositar confiança no meu trabalho, por acatar minhas sugestões e infinitos testes, e por sua dedicação e ensinamentos valiosos, que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

Ao meu coorientador, Paulo Mattos, pelo apoio constante, pela prontidão e solicitude em atender às minhas demandas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório Santé Brasília, por fornecer as amostras essenciais para este estudo.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio, pelas investigações científicas e pelo ambiente colaborativo que tornou esta jornada mais leve e produtiva. Agradeço especialmente a Melissa Shizue, por toda ajuda, paciência e dedicação em me ensinar e auxiliar ao longo de todo o meu tempo na Embrapa, contribuindo imensamente para o meu aprendizado e crescimento profissional.

Aos professores, funcionários e pesquisadores da UFT e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília, pelo suporte e pela contribuição direta e indireta para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), pelo financiamento e apoio ao projeto.

E, por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado, meu sincero muito obrigada.

RESUMO

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença viral contagiosa que afeta equídeos globalmente, sendo registrada no Brasil desde a década de 1960. Causada por um lentivírus, o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE) integra-se ao genoma do hospedeiro tornando a infecção permanente. Sem tratamento ou vacina eficaz devido à alta variabilidade genética do vírus, o diagnóstico e controle são desafiadores. A transmissão ocorre principalmente por contato com sangue infectado, via vetores mecânicos ou materiais contaminados, e apesar de ser mais comum em regiões úmidas, sua disseminação é global. A infecção pode ser aguda, crônica ou subclínica, com ciclos de febre, anemia e perda de peso. O diagnóstico baseia-se na detecção de anticorpos, com IDGA como padrão-ouro e ELISA como teste complementar. A PCR detecta o DNA proviral, mas é uma técnica limitada pela diversidade genética dos isolados virais. O controle envolve vigilância sorológica e restrições ao comércio de animais soropositivos. No Brasil, animais positivos devem ser submetidos à eutanásia (abate sanitário), salvo em áreas endêmicas como o Pantanal. Entretanto, o diagnóstico atual apresenta vulnerabilidades a fraudes, como a substituição de amostras, principalmente nos retestes. A identificação genética dos animais testados em amostras submetidas aos exames oficiais de AIE, por meio da extração de DNA do soro ou coágulo, poderia minimizar fraudes e melhorar a segurança diagnóstica. Além disso, a detecção molecular do vírus ajudaria a identificar infecções na fase aguda, melhorando o controle da AIE. Esse trabalho teve o objetivo de viabilizar a extração de DNA genômico (gDNA) em amostras de soro e coágulo para genotipagem e detecção do DNA proviral a fim de estabelecer um protocolo seguro para o diagnóstico da AIE. Foram avaliadas diferentes condições para extração de gDNA visando à genotipagem equina e à detecção do provírus da AIE. Amostras de sangue total, coletadas com quatro anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato e fluoreto), foram submetidas à extração de gDNA e à PCR em diferentes tempos (3, 30, 60 e 90 dias) e temperaturas de armazenamento (4 °C e -20 °C), utilizando primer específico para genotipagem equina. Também foram analisadas amostras de soro e coágulo, avaliando a influência do tipo de tubo (com ou sem gel separador) e do preparo do soro (centrifugado ou decantado) na extração e amplificação do gDNA e do provírus. Os resultados demonstraram que os anticoagulantes, o tempo e a temperatura não interferiram negativamente na PCR. O soro se mostrou uma matriz viável, embora influenciada pelo método de preparo e de extração. O coágulo apresentou os melhores resultados, com amplificação consistente em todas as condições testadas, permitindo também a

detecção molecular do VAIE em amostras de animais soropositivos provenientes de diferentes estados do Brasil.

Palavras-chave: AIE. DNA proviral. Genotipagem. Soro.

ABSTRACT

Equine infectious anemia (EIA) is a contagious viral disease that affects equids worldwide and has been recorded in Brazil since the 1960s. It is caused by the Equine Infectious Anemia Virus (EIAV), a lentivirus that integrates into the host genome, making the infection permanent. Due to the high genetic variability of the virus, there is no effective treatment or vaccine, making diagnosis and control challenging. Transmission occurs primarily through contact with infected blood, either via mechanical vectors or contaminated materials, and although more common in humid regions, its spread is global. The infection may present in acute, chronic, or subclinical forms, with cycles of fever, anemia, and weight loss. Diagnosis is based on antibody detection, with agar gel immunodiffusion (AGID) as the gold standard and ELISA as a complementary test. PCR can detect proviral DNA but is limited by the genetic diversity of viral isolates. Control measures include serological surveillance and restrictions on the trade of seropositive animals. In Brazil, positive animals must be euthanized (sanitary slaughter), except in endemic areas such as the Pantanal. However, current diagnostic protocols are vulnerable to fraud, including sample substitution, especially during retesting. Genetic identification of tested animals through DNA extraction from serum or clot samples could minimize fraud and improve diagnostic reliability. Moreover, molecular detection of the virus could help identify acute-phase infections, contributing to better EIA control. This study aimed to enable genomic DNA (gDNA) extraction from serum and clot samples for equine genotyping and proviral DNA detection, in order to establish a reliable diagnostic protocol for EIA. Different conditions for gDNA extraction were evaluated for equine genotyping and EIAV detection. Whole blood samples collected with four anticoagulants (EDTA, heparin, citrate, and fluoride) were subjected to gDNA extraction and PCR at different storage times (3, 30, 60, and 90 days) and temperatures (4 °C and -20 °C), using an equine genotyping-specific primer. Serum and clot samples were also analyzed, assessing the influence of tube type (with or without gel separator) and serum preparation method (centrifugation or decantation) on gDNA and proviral DNA extraction and amplification. The results showed that anticoagulants, time, and temperature did not negatively affect PCR performance. Serum proved to be a viable matrix, although results were influenced by the extraction and preparation methods. The clot samples yielded the most consistent results, with successful amplification under all tested conditions, and also allowed for molecular detection of EIAV in samples from seropositive animals from different regions of Brazil.

Keywords: EIA. Genotyping. Proviral DNA. Serum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Vírus da Anemia Infecciosa Equina	16
Figura 2 - Organização genômica do VAIE	17
Figura 3- Preparo com filtro para extração de gDNA em soro. Alíquota do soro sem filtro e alíquota com soro filtrado.....	35
Figura 4 - Preparo com centrifugação e filtragem para extração de gDNA em soro.	35
Figura 5 - Coleta, preparo e armazenamento das amostras para extração magnética (M), por coluna QIAGEN (Q) e por Salting Out (S).	37
Figura 6 – Posição dos oligonucleotídeos no genoma para amplificação do DNA pró-viral por nPCR.....	40
Figura 7 - Gel agarose para quantificação do gDNA de sangue (S), de leucócitos (L) e de 400 uL e 1mL de plasma (P400 e P1000). Controle positivo com 140 ng de gDNA bovino previamente extraído.	44
Figura 8- (A) Efeito de anticoagulantes distintos na qualidade do DNA: EDTA; HEP (Heparina); CIT (Citrato); FLU (Fluoreto). (B) Efeito do armazenamento em temperatura (4°C ou -20°C) na qualidade do DNA. (C) Efeito do tempo de armazenamento na qualidade do DNA, medido em dias (3, 30, 60 e 90 dias).....	46
Figura 9- (A) Efeito dos anticoagulantes na concentração de DNA (ng/ul): EDTA; HEP (Heparina); CIT (Citrato); FLU (Fluoreto). (B) Efeito da temperatura de armazenamento (4°C ou -20°C) na concentração de DNA. (C) Efeito do tempo de armazenamento na concentração de DNA, medido em dias (3, 30, 60 e 90 dias).	48
Figura 10- Análise de qualidade por eletroforese do DNA extraído. A) Amostra 4C em: 3d, 30d e 60d. B) Amostra 4C em: 90d, e -20C em: 3d, 30d e 60d. C) Amostra -20C em: 90d. E (EDTA); H (Heparina); C (Citrato); F (Fluoreto).C: Controle com 70 ng/μL.....	49
Figura 11- Gel agarose de gDNA para avaliação do volume inicial para extração. 1,5D: 1,5mL de soro decantado; 1,5C: 1,5mL des soro centrifugado; 1D: 1,0mL de soro decantado; 1C: 1,0mL de soro centrifugado.	50
Figura 12- Gel de agarose 1,5% para visualização da integridade das amostras de DNA genômico extraídas de coágulo. Números de 1 a 10 indicam a numeração dos animais. Sequência das amostras no gel para cada animal: GC, GD, SC e SD.C: Controle com 50 ng/μL.	53
Figura 13- Gel agarose 1,5% do DNA genômico extraído das amostras de coágulo. C: controle com 50ng/μL.	54
Figura 14- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para avaliação da concentração de gDNA com os oligonucleotídeos ASB 23 (175-211 bp), HMS 2 (222-248 bp), HMS 6 (151-169 bp) e HTG4 (127-139 bp). PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).	56
Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para análise da concentração de MgCl ₂ dos 4 oligonucleotídeos e da concentração de primer e gDNA para HTG4. PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).	57
Figura 16- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para gradiente de temperatura de anelamento com o oligonucleotídeos HMS2 (222-248 bp), sendo C- o controle negativo com água MiliQ. PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).	58
Figura 17- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados HMS 6 (151-169bp) para definição da concentração de gDNA. PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).	58
Figura 18- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os 4 oligonucleotídeos após a otimização), sendo C- o controle negativo com água MiliQ. PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).	59

- Figura 19- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com microssatélite ASB 23 (211 pb) produzidos a partir de DNA extraído com anticoagulantes distintos. A) 4C em 3d e 4C em 30d; B) 4C em 60d e 4C em 90d; C) -20C em 3d e -20C em 30d; D) -20 em 60d e -20C em 90d. EDTA; HEP (Heparina); CIT (Citrato); FLU (Fluoreto). MW (1Kb Plus Ladder). Controle positivo C+; controle negativo C- (PCR com água). PM= peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). 60
- Figura 20- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com ASB23 (175-211pb) para avaliar o desempenho do cfDNA. C-: controle negativo (PCR com água); Q: soro não filtrado QIAGEN; M: soro não filtrado MagMAX; QF: soro filtrado QIAGEN; MF: soro filtrado MagMAX (M); C+: gDNA de sangue; MW (1Kb Plus Ladder)..... 62
- Figura 21- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com ASB23 (175-211pb) para analisar a origem do DNA extraído. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-4: animais; 2.500 RPM: primeira alíquota do soro obtido por centrifugação para extração; 13.400 RPM: segunda alíquota do soro sobrenadante pós centrifugação; Filtro: terceira alíquota do soro sobrenadante filtrado. 63
- Figura 22- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com HMS2 (222-248pb), HMS6 (151-169pb), HTG4 (127-139Bp) e ASB23 (175-211pb) para comparar o tempo de decantação do soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; MW (1Kb Plus Ladder); 1: soro decantado 4 dias; 2: soro decantado 24 horas QIAGEN; 3 soro decantado 24 horas Salting out, 4: soro decantado 24 horas MagMAX; 5: coágulo 4 dias; 6: coágulo 24 horas..... 64
- Figura 23- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para selecionar a quantidade de gDNA extraído de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder)..... 65
- Figura 24- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com HMS2 (222-248pb) para validar o uso de soro e coágulo para genotipagem . C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-10: animais; M: extração MagMAX; Q: extração por colunas QIAGEN; S: Salting Out; C: tubo centrifugado; D: tubo decantado 66
- Figura 25 - Resultado da genotipagem do Laboratório Allele. 68
- Figura 26- Resultado da genotipagem do Laboratório Raça. 69
- Figura 27- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos JAP, nJAP, ITA, nITA, EUA e nEUA para validar o uso de coágulo para detecção molecular do VAIE. 0:(PCR com água); C-: controle negativo; 3,4 e 30: animais soronegativos para AIE; 1, 2, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 06, Ros: animais soropositivos para AIE; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder). Destacado em vermelho os amplicons com PM esperado. 70
- Figura 28- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos FWD nJAP e REV nITA (630pb) para otimização da temperatura de anelamento. C-: controle negativo (PCR com água); C+ Jap: gDNA n°21 com os oligonucleotídeos nJAP; C- Ita: gDNA 21 com os oligonucleotídeos nITA; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder). 71
- Figura 29- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos FWD nJAP e VER nITA (630pb) para validar o uso de coágulo para detecção molecular do VAIE. 0:(PCR com água); C-: controle negativo; 3,4 e 30: animais soronegativos para AIE; 1, 2, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 06, Ros: animais soropositivos para AIE; PM: Peso (1Kb Plus Ladder)..... 71

Figura 30- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos HMS2 (222-248 bp) para confirmação de presença de gDNA extraído. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder);1-35: amostras de soro; 1c, 32c, 33c, 34c e 35c: amostras de coágulo.....	73
Figura 31- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nJAP (203 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal nº21; PM: PESO MOLECULAR (1Kb Plus Ladder);1-35: amostras de animais soropositivos.	74
Figura 32- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nITA (313 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal nº21; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder);1-35: amostras de animais soropositivos.	74
Figura 33- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nEUA (427 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal nº21; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-35: amostras de animais soropositivos.	75
Figura 34- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nLG (630 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal nº21; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder);1-35: amostras de animais soropositivos.....	75
Figura 35- Resultados do BLASTn realizado com os fragmentos amplificados por nJAP.	79
Figura 36- Resultados do BLASTn realizado com os fragmentos amplificados por nITA.	80
Figura 37- Resultados do BLASTn realizado com o fragmento amplificados por nLG.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nome dos oligonucleotídeos , sequência FWD (senso) e REV (antisense), tamanho em pares de base e cromossomo.....	39
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na PCR para provirus.....	41
Tabela 3- Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na PCR para provirus.	42
Tabela 4 - Qualidade do DNA medida por densidade óptica (OD, 260/280) do DNA extraído em amostras com diferentes anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato de sódio, fluoreto de sódio) e armazenada a 4°C (4C) e -20°C (-20C) durante: 3d (3 dias após a coleta), 30d.	45
Tabela 5- Concentração de DNA (ng/uL) extraído de uma amostra de sangue total equino coletada em diferentes anticoagulantes do grupo 4C (4°C) e -20C (-20°C) durante: 3d (3 dias pós-coleta), 30d (30 dias pós-coleta), 60d (60 dias pós-coleta) e 90d (90 dias pós-coleta) antes da extração de gDNA.	47
Tabela 6- Quantificação das amostras de DNA extraídas de coágulo.....	52
Tabela 7- Identificação, localização e resultado sorológico das amostras de coágulo para identificação do vírus da Anemia Infecciosa Equina, e sua respectiva quantificação pelo espectrofotômetro.	54
Tabela 8- Dados brutos e porcentagem de eficiência das ampliações por PCR em amostras de soro e coágulo com diferentes condições de preparo de amostra, tubo de coleta e método de extração.....	67
Tabela 9- Identificação e localização das amostras dos animais soropositivos e os resultados para detecção do DNA proviral. Os estados destacados em diferentes cores indicam animais da mesma propriedade.	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Histórico da Anemia Infecciosa Equina	15
2.2	Etiologia e características do vírus	16
2.3	Epidemiologia.....	19
2.3.1	<i>AIE na Europa</i>	20
2.3.2	<i>AIE na Ásia</i>	21
2.3.3	<i>AIE na América</i>	22
2.3.4	<i>AIE no Brasil</i>	23
2.4	Transmissão.....	24
2.5	Fisiopatologia	25
2.6	Manifestações clínicas e alterações laboratoriais	26
2.7	Diagnóstico da AIE	28
2.8	Controle e prevenção	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivo específico	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Extração de DNA em amostras de sangue.....	33
4.2	Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para identificação individual equina 34	
4.3	Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para detecção do provírus	38
4.4	Reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação individual equina	38
4.5	Reação de polimerase em cadeia nested (nPCR) para detecção do provírus	40
4.6	Clonagem de DNA proviral e sequenciamento	42
4.7	Análises estatísticas	42
4.8	Aprovação Ética	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Extração de DNA em amostras de sangue.....	44
5.2	Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para identificação individual equina 50	
5.3	Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para detecção do provírus	53
5.4	Otimização da reação de polimerase em cadeia (PCR).....	55
5.5	Reação de polimerase em cadeia (PCR) para avaliar os anticoagulantes.....	59
5.6	Reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação individual equina com amostras de soro e coágulo	61
5.7	Reação de polimerase em cadeia nested (nPCR) para detecção do provírus	69
5.8	Clonagem de DNA proviral e sequenciamento	78
6	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO 1.....	90

1 INTRODUÇÃO

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença viral altamente contagiosa e de distribuição mundial que afeta equídeos. No Brasil, foi descrito pela primeira vez no final da década de 60 e, desde então, a doença permanece em sendo notificada no país, representando uma ameaça significativa para a indústria equina devido ao seu impacto econômico e às implicações no bem-estar animal (LEROUX et al., 2004).

O agente causador da AIE é um lentivírus da família *Retroviridae*, chamado *Lentivirus equifane* ou Vírus da Anemia Infecciosa Equina (VAIE), que promove uma infecção vitalícia ao integrar-se ao genoma do hospedeiro, garantindo sua persistência no organismo (ISSEL et al., 1988). Além disso, sua elevada variabilidade genética, decorrente da baixa fidelidade da transcriptase reversa, dificulta tanto o diagnóstico quanto ao desenvolvimento de tratamentos e vacinas eficazes (LEROUX, 2005).

Embora tenha maior incidência em regiões úmidas, a expansão do comércio de equinos tem contribuído para a disseminação global da doença (ISSEL et al., 2014). Em alguns países, como grande parte da Europa, a AIE é notificada apenas esporadicamente, enquanto em áreas endêmicas, como Brasil e Estados Unidos, novas ocorrências continuam a ser registradas devido às condições climáticas favoráveis à presença de vetores e, conseqüentemente, à transmissão da AIE (ROBERTS, 2017). A principal forma de propagação do VAIE ocorre pelo contato com sangue infectado, seja por meio de vetores mecânicos ou por transmissão iatrogênica devido à contaminação de materiais perfurocortantes (RICOTTI et al., 2016). Além dos equinos (cavalos), os muares (burros) e asininos (jumentos) também são suscetíveis à infecção e, por serem testados com menor frequência, podem atuar como reservatórios do vírus, aumentando o risco de propagação da doença (CÂMARA et al., 2020).

Os sinais clínicos da AIE variam conforme a fase da infecção, que podem ser agudos, crônicos ou subclínicos. A doença apresenta um padrão cíclico, caracterizado por episódios febris associados a picos de viremia, anemia, trombocitopenia, edema e perda de peso. Embora a maioria dos animais evolua para uma fase assintomática e mantenha uma infecção crônica persistente, em alguns casos a enfermidade pode ser fatal (CRAIGO et al., 2007).

O diagnóstico da AIE baseia-se na detecção da titulação de anticorpos gerados pelo hospedeiro em resposta ao vírus. O teste padrão-ouro para identificação da infecção é a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), enquanto o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) também é um método oficial utilizado para diagnóstico (WANG et al., 2016). No entanto, os testes sorológicos apresentam limitações devido ao período necessário para

soroconversão. Assim, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser empregada como ferramenta complementar para detectar o DNA proviral, sendo útil em testes confirmatórios ou em casos de resultados sorológicos conflitantes. Entretanto, sua eficácia pode ser comprometida pela baixa identidade genética entre isolados virais (sorotipos) de diferentes regiões geográficas na sequência-alvo dos oligonucleotídeos (ZHANG et al., 2024).

A AIE não possui tratamento ou vacina eficaz. O controle determinado pela Organização Mundial da Saúde Animal é realizado através da interrupção do ciclo de transmissão da doença por meio da vigilância sorológica e restrição do comércio de animais positivos, incluindo o abate sanitário ou o isolamento de infectados (RICOTTI et al., 2016). Em território brasileiro, o Ministério da Agricultura, e Pecuária (MAPA) determina a eutanásia obrigatória para equinos positivos no teste de IDGA, exceto em áreas endêmicas como o Pantanal. A erradicação da AIE no Brasil é dificultada pela vasta extensão territorial, fiscalização deficiente do trânsito animal e eventos equestres frequentes sem as devidas medidas sanitárias de prevenção (TORRES, et al., 2024).

Para emissão do Guia de Trânsito Animal, o animal tem que testar negativo para AIE. No Brasil está em vigor a Instrução Normativa nº42 de 2018 que descreve os requisitos e critérios para realização do diagnóstico da AIE no Brasil. A amostra de soro é coletada por um veterinário habilitado e o teste sorológico realizado por um laboratório credenciado, se a amostra der positiva, o proprietário do animal tem direito a contraprova realizada no mesmo laboratório com a mesma amostra do primeiro exame. Caso os resultados discordem, o laboratório oficial faz o reteste com uma nova coleta para fins de perícia. Em dezembro de 2024, foi publicada a Portaria nº 124, estabelecendo diretrizes complementares para o estado do Piauí. Entre as atualizações, destaca-se a proibição da coleta de nova amostra para diagnóstico de AIE em animais previamente diagnosticados como positivos. Cabe ao médico veterinário assegurar, ao realizar coletas em uma mesma propriedade, que não está colhendo sangue de um animal que já tenha sido diagnosticado como positivo, evitando assim reincidências irregulares no processo diagnóstico.

O protocolo atual de diagnóstico da AIE apresenta vulnerabilidades a fraudes, uma vez que o proprietário pode tentar evitar a eutanásia de animais de elevado valor econômico e/ou afetivo. Essas fraudes podem ocorrer no momento da coleta da amostra, substituindo o sangue de um animal infectado por sangue de um animal saudável. Dada a relevância da AIE, o MAPA vem buscando soluções para minimizar as possibilidades de fraudes no diagnóstico. Sob essa perspectiva, o MAPA encomendou à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia o desenvolvimento de um protocolo que consiste em realizar a identificação genética do indivíduo

no momento da testagem sorológica, preferencialmente extraindo o DNA da mesma amostra biológica utilizada nos testes de IDGA e ELISA. Dessa forma, cada vez que um animal fosse submetido ao teste, sua genotipagem estaria registrada, permitindo comparações futuras e aumentando a segurança do diagnóstico.

O DNA do animal suspeito poderia ser extraído a partir do soro ou de materiais residuais, como o coágulo presente no tubo utilizado para a obtenção do soro para os testes sorológicos oficiais. Além disso, a detecção molecular do vírus no soro por nPCR auxiliaria a diagnosticar infecções na fase inicial, uma limitação do diagnóstico sorológico, devido ao tempo de soroconversão de animais infectados nas fases iniciais da AIE. No presente estudo, foram desenvolvidos e adaptados protocolos de extração e detecção de DNA de diversas amostras biológicas de equinos que permitem um melhor aproveitamento da amostra, reduzindo a possibilidade de fraudes e resultando em diagnósticos mais confiáveis e seguros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Anemia Infeciosa Equina

A AIE é uma doença viral altamente contagiosa que afeta os equídeos, representando uma preocupação significativa para a indústria equina em todo o mundo (LEROUX et al., 2004). Essa enfermidade tem sido amplamente estudada devido ao seu impacto econômico e às implicações no bem-estar animal, uma vez que os equinos infectados, de acordo com determinação do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), devem ser submetidos ao abate sanitário e, juntamente com as medidas de quarentena, geram perdas econômicas consideráveis (ZIMMERLI; THÜR, 2019).

O primeiro relato da doença ocorreu na França, em 1843, pelo pesquisador Ligneé, que constatou uma maior prevalência da AIE em regiões úmidas. Um dos sinais clínicos predominante era a hipertermia, o que levou à denominação popular de “Febre do Pântano”. Atualmente, se sabe que essa predominância da AIE em ambientes pantanosos (úmidos) é devida ao efeito das temperaturas elevadas que favorece o crescimento da população dos tabanídeos e dos artrópodes do gênero *Stomoxys*, que são vetores mecânicos da doença (ISSEL et al., 1988).

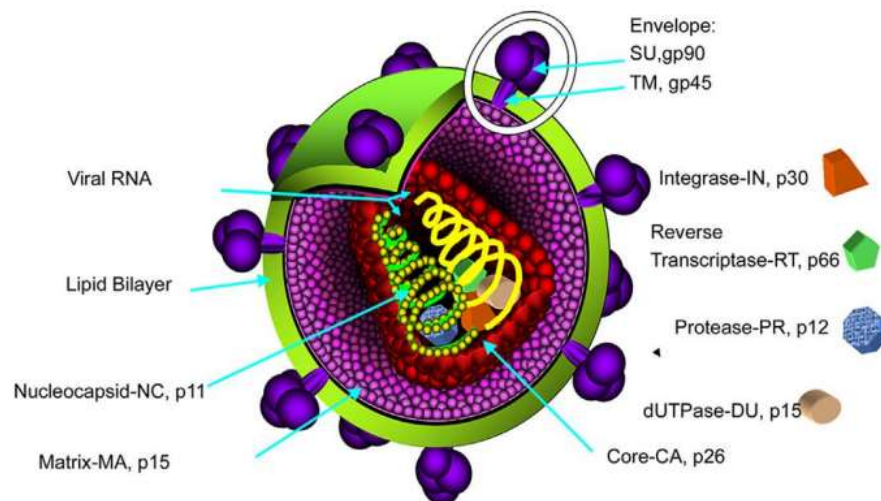
Entretanto, apenas em 1904 a AIE foi reconhecida como uma patologia viral. Esse avanço ocorreu por meio dos experimentos de Vallée e Carré, que classificaram o causador da doença como um "agente filtrável". O estudo consistiu na filtragem de amostras de um animal doente e posterior inoculação em um animal saudável, o qual desenvolveu a doença, confirmando a presença de um agente infeccioso (SELLON et al., 1993). Dois anos depois, em 1906, Vallée e Carré constataram que o vírus permanecia no organismo do animal experimental mesmo após a remissão dos sintomas clínicos, evidenciando a possibilidade de casos assintomáticos. Esse estudo permitiu ainda a diferenciação das fases da doença em aguda, subaguda e crônica (COOK et al., 2013).

A AIE foi a primeira doença retroviral descrita em animais não humanos, o que contribuiu significativamente para a compreensão da replicação viral, da patogênese e da imunologia de infecções retrovirais. Além disso, estudos sobre essa enfermidade auxiliaram no entendimento e desenvolvimento de abordagens terapêuticas para retrovírus humanos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MONTAGNIER et al., 1984).

2.2 Etiologia e características do vírus

A AIE, também conhecida como "AIDS Equina", é causada por um vírus *Lentivírus equinfane*, pertencente à família Retroviridae. Assim como outros lentivírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV). O VAIE possui um genoma composto por duas fitas simples de RNA de sentido positivo envelopado por um capsídeo proteico com organização específica, permitindo sua integração ao genoma do hospedeiro como DNA próviral e a persistência da infecção ao longo da vida do animal (ISSEL et al, 1988; LEROUX et al., 2004; COOK et al., 2013) (Figura 1).

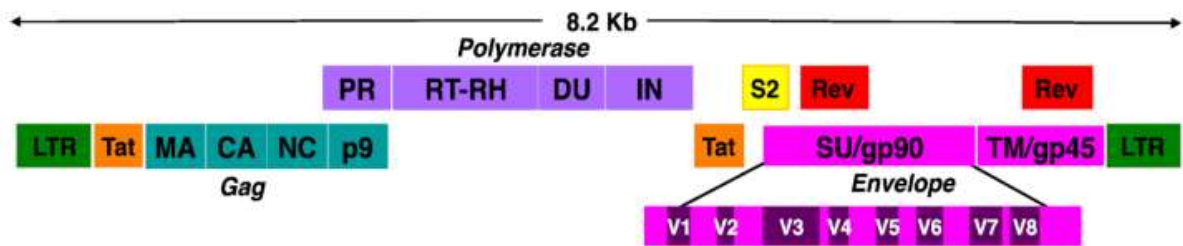
Figura 1- Vírus da Anemia Infecciosa Equina



Fonte: MALOSSSI 2019.

O genoma do VAIE possui aproximadamente 8,2 kb e é composto por três genes principais: gag (proteínas estruturais), pol (polimerases) e env (glicoproteínas de superfície), flanqueados por repetições terminais longas (LTRs). Além disso, o VAIE codifica três genes acessórios: tat, rev e S2 (LEROUX et al., 1997; COOK et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2 - Organização genômica do VAIE



Fonte: CRAIGO; MONTECARLO, 2013.

O gene *gag* é responsável por codificar as proteínas estruturais do vírus, como a matriz (p15) e a do capsídeo (p26), ambas fundamentais para a formação do capsídeo viral. Também codifica a proteína do nucleocapsídeo (p11), que tem a função de proteger o material genético do vírus e contribuir para a sua entrada nas células hospedeiras, e a p9, proteína de domínio tardio, que auxilia no brotamento do vírus (MAURY, 1994; HENDERSON et al., 1987). A p9 também desempenha um papel crítico na produção e integração do provírus, e consequentemente, tem importante função na infectividade das partículas virais (CHEN; LI; MONTECARLO, 2001; JIN; CHEN; MONTECARLO, 2005). O gene Gag consiste em aproximadamente 1500 nucleotídeos que codificam 487 aminoácidos de uma poliproteína, que posteriormente será clivada para formação das proteínas: p15 (124 aminoácidos, aas), p26 (232 aas), p11 (79 aas) e p9 (52 aas) (MALOSSI, et al., 2020), dispostas nessa ordem no genoma viral (HENDERSON, et al., 1987). A proteína p26 é considerada altamente conservada e constitui a base para a maioria dos testes sorológicos comerciais para diagnóstico da infecção pelo VAIE (MALOSSI et al., 2020). Em contrapartida a região de domínio tardio p9 é bastante variável e, por esse motivo, é bastante empregada na rastreabilidade da origem e progressão dos surtos de AIE (COOK, et al., 2013).

O gene *pol* codifica enzimas essenciais para a replicação viral, sendo a região mais conservada entre os retrovírus. As sequências *pol* são compostas por aproximadamente 3400 nucleotídeos, codificando uma cadeia polipeptídica de 1137 aminoácidos, que após processamento, dão origem a cinco proteínas: protease (PR), transcriptase reversa (RT), RNase H (RN), dUTPase (DU) e integrase (IN), respectivamente (MALOSSI ET AL., 2020). A protease cliva as proteínas virais em sua forma funcional, a transcriptase reversa transcreve o RNA viral em DNA de fita dupla (cDNA), e trabalha junto com a RNase H que degrada a fita de RNA após a síntese do DNA. A dUTPase catalisa a hidrólise de dUTP para evitar a

incorporação da uracila no DNA viral sintetizado pela RT. Finalmente, a integrase (INT) permite a integração do cDNA viral ao genoma do hospedeiro (SELLON, 1993; CRAIGO et al., 2007; COOK et al., 2013).

Os lentivírus possuem um dos genomas de evolução mais rápida, uma característica atribuída à baixa fidelidade da transcriptase reversa (RT), enzima exclusiva dos retrovírus, que tem baixa atividade de revisão/edição, visto que o mecanismo de reparo do DNA ocorre no núcleo celular (LEROUX, 2005). Acredita-se a cada rodada de transcrição reversa resulta em pelo menos uma mutação no genoma viral, aumentando significativamente a diversidade genética do VAIE (SELLON, 1993). A alta taxa de replicação viral e os fenômenos de recombinação entre genomas virais coinfectantes também contribuem para essa variabilidade genética. Outro fator que auxilia na alta variabilidade genética do vírus é seu material ser composto por duas fitas de RNA simples, que não são idênticas em termos de sequência de nucleotídeos (LEROUX, 2005). Entretanto, as mutações observadas, principalmente no gene pol, são conservativas, uma vez que as proteínas codificadas por esse gene desempenham funções altamente específicas e sob intensa pressão evolutiva (COOK et al., 2013).

O gene env é responsável pela síntese das glicoproteínas de superfície (gp90) e transmembrana (gp45) (COOK et al., 2003), fundamentais para a entrada do vírus na célula hospedeira. A alta variabilidade genética dessa região está associada à tentativa do vírus de escapar do sistema imune do hospedeiro, e conseqüentemente, está intimamente relacionada à virulência do patógeno (BRINDLEY; MAURY., 2008; DONG; COOK; ZHU, 2014; MALOSSI, et al., 2020). O aparecimento de novas variantes antigênicas dessas glicoproteínas de superfície no hospedeiro leva ao surgimento de reações febris recorrentes, que são características do estágio crônico da doença, isso ocorre devido a mutações do gene e na síntese das glicoproteínas (SELLON, 1993). Pesquisas genômicas evidenciam rápidas variações genéticas por parte do gene env responsável pela codificação da glicoproteína de superfície gp90, delimitando oito regiões hiper variáveis. As mutações pontuais, assim como deleções e inserções, tendem a se concentrar especialmente na região V3, que corresponde ao principal domínio neutralizante da gp90. Nesse local, até 80% dos aminoácidos podem sofrer alterações ao longo da infecção (LEROUX et al., 2005; COOK et al., 2019). A glicoproteína gp45, por apresentar menor variabilidade em relação à gp90, é utilizada em alguns testes de ELISA como antígeno complementar à p26 (MALOSSI et al., 2020).

Além dos três genes principais (gag, pol e env), o genoma do VAIE possui regiões não codificantes, como as sequências repetitivas conhecidas como Long Terminal Repeats (LTRs), localizadas nas extremidades do genoma e fundamentais para a transcrição, replicação e

integração do DNA proviral ao genoma do hospedeiro (LEROUX et al., 2004). Os LTRs do VAIE são compostos por regiões idênticas e invertidas, situadas nas extremidades do genoma, e subdividem-se em três segmentos principais: U3 (LTR-3'), que contém sequências reconhecidas por fatores de transcrição do hospedeiro e desempenha um papel crucial na ativação da transcrição viral; R (LTR-R), responsável pelo reconhecimento da integrase durante a incorporação do DNA proviral ao genoma da célula infectada; e U5 (LTR-5'), complementar a U3, essencial para a transcrição reversa do RNA viral em cDNA (COOK et al., 2013).

Assim como outros lentivírus, o VAIE codifica genes reguladores essenciais para sua replicação e transmissão. O gene *tat* (trans-acting transcriptional activator) sintetiza a proteína Tat, um fator de transcrição que aumenta a eficiência da expressão viral e pode modular a resposta imunológica do hospedeiro, favorecendo a persistência da infecção. O gene *rev* (regulator of expression of virion proteins) codifica a proteína Rev, que transporta o RNA viral do núcleo para o citoplasma, onde ocorre a montagem de novas partículas virais, sendo essencial para a liberação eficiente do vírus (MAURY et al., 1994; DONG; COOK; ZHU, 2014).

O estudo das sequências de seus genes tem fornecido importantes informações sobre a biologia e a patogênese do VAIE, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de controle da AIE (WANG et al., 2018b; ZHANG et al., 2024). A compreensão do genoma do VAIE, suas regiões conservadas e variáveis, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de diagnóstico, prevenção e controle da AIE, possibilitando avanços na elaboração de vacinas e terapias antivirais (BOLDBATAAR et al., 2013; WANG et al., 2016). Análises genômicas revelaram que os genes *gag*, *pol*, ORF1 (codificante do exon 2 de Tat) e ORF2 (codificante de S2) apresentam alta conservação, enquanto *env* e ORF3 (codificante do segundo exon de Rev) são altamente variáveis (DONG; COOK; ZHU, 2014).

2.3 Epidemiologia

Apesar da AIE ter maior predominância em áreas úmidas, sua distribuição é mundial devido a expansão do comércio de equinos entre vários países. Seu local de surgimento ainda não foi determinado e não há um consenso sobre em que país o VAIE surgiu, porém há um estudo que analisa a filogeografia das sequências já publicadas que sugerem que a origem mais provável seria a Hungria com rota de migração da Europa para as Américas. Entretanto, a Itália e os Estados Unidos carregam grande influência na disseminação da doença, pois configuraram regiões de maior fonte de dispersão do vírus (JARA; FRIAS-DE-DIEGO; MACHADO, 2020).

Embora muitos países tenham implementado programas de prevenção, a AIE ainda persiste em alguns lugares sendo notificada de forma esporádica, como em grande parte da Europa, ou classificadas em áreas endêmicas, como o Brasil e EUA onde o clima é favorável aos vetores, ou Itália e Romênia onde abate sanitário de animais positivos não é obrigatório (ROBERTS, 2017). Até o momento, não foram registrados relatos recentes de AIE na África, exceto por um caso isolado em março de 2013, na localidade de Shambiko, na Eritreia. Essa situação pode ser atribuída à falta de estudos e à ausência de testes sorológicos em animais africanos. (MALOSSI et al., 2020; REZENDE et al., 2016). Nos últimos dez anos, foram notificados casos da doença na Alemanha, Hungria, Chile, Bélgica, Bulgária, Grécia, França, Uruguai, Peru, Grã-Bretanha, Espanha, Suíça, Países Baixos e Áustria (WAHIS WOA, 2025). Um surto de AIE ocorreu em 2006 na Europa, de forma simultânea na Itália e Irlanda e estudos sugerem que a origem foi a infusão de plasma contaminados em potros recém-nascidos (CAPPELLI et al., 2011), fato que corroborou para a relevância da inspeção de produtos de origem animal (BRAGAN et al., 2008). Os animais acometidos nesse surto desenvolveram sintomatologia grave, por vezes fatal, de forma contrária a maioria dos casos da Europa, que envolviam animais assintomáticos (CAPPELLI et al., 2017; GAUDAIRE et al., 2017).

2.3.1 AIE na Europa

Na Itália, a detecção de casos envolvendo cavalos de corrida valiosos gerou grande repercussão e atraiu atenção de autoridades veterinárias em todo o mundo, pelo impacto negativo na população de equídeos. Foi então implementado no país, a testagem anual de todos os equídeos a partir de 6 meses de idade, e não somente de garanhões reprodutores ou animais para exportação, como era realizado desde 1995 (CAPPELLI et al., 2011). Essa política foi encerrada em 2012, quando a vigilância baseada no risco foi aplicada a nível nacional. Os casos de AIE foram avaliados neste período de quatro anos na Itália e foi observado que as medidas tomadas na vigilância ativa reduziram significativamente a prevalência da doença no país. Entretanto, esse sistema foi implementado de forma similar em apenas três países além da Itália, na Irlanda por 6 meses até a doença ser erradicada, na Sérvia e na Romênia (BRAGAN et al., 2008).

O programa de vigilância da AIE na Sérvia funciona desde 1981, em que todos os equídeos são testados uma vez ao ano, os animais usados para produção de material biológico são testados duas vezes por ano, e os positivos para AIE são submetidos a eutanásia. Apesar de ainda haver registros de casos, a presença da doença na população de equídeos no país é muito

baixa, e por fazer fronteira com a Romênia, país considerado endêmico, expõe mais uma vez, a eficácia do sistema de controle ativo (LUPULOVIC et al., 2021).

Os casos de AIE em três regiões da Romênia foram analisadas no período de 3 anos e na área onde foi implementado as medidas de erradicação ativa e havia o pagamento de compensação dos animais positivos, houve uma diminuição de 1036 animais positivos em 2007 para 25 casos em 2010. Entretanto, as outras duas regiões ainda são consideradas de alto risco para transmissão da doença (LAZAU et al., 2012).

Apesar de alguns países da Europa estarem livres da AIE e grande parte dos surtos no continente ocorrerem de forma esporádica, não há um controle absoluto da transmissão. Em 2017 houve surtos nos Países Baixos, Alemanha, Espanha, Suíça e Macedônia, mas não é provável que todos estejam epidemiologicamente ligados. Todos os países com casos confirmados elaboram medidas de controle, mas a monitorização e rastreamento é por um período curto e que ocorre somente quando há surtos, fator que contribui como uma ameaça constante para a indústria e comércio equino, já que a vigilância passiva (somente em animais que apresentam sinais clínicos) se mostra ineficaz em erradicar a AIE (ROBERTS, 2017; CARVELLI et al., 2024). Estudos indicam que as regiões da Europa ocidental, central e meridional apresentam um alto risco para a ocorrência de surtos de AIE. Esses surtos têm o potencial de gerar uma nova onda de epidemias, o que representa uma ameaça considerável ao desenvolvimento saudável da indústria equina a qual engloba atividades de lazer, esportes, serviços veterinários e alimentação (AN, et al., 2024).

2.3.2 AIE na Ásia

Até o início do século XX, não havia sido registrado casos de AIE na China, mas durante a Segunda Guerra Mundial, o Japão acabou levando o VAIE para o território chinês. A situação foi exacerbada por uma quarentena ineficaz, que permitiu a comercialização de cavalos com infecções latentes provenientes da antiga União Soviética e da Mongólia, contribuindo ainda mais para a introdução do vírus na China. Foi adotado um programa de controle integrado que inclui vacinação e quarentena que acelerou significativamente o controle e a erradicação do VAIE na China. (WANG, et al., 2018a).

A AIE (AIE) foi relatada pela primeira vez no Japão em 1883, com cepas japonesas isoladas entre as décadas de 1940 e 1960. No entanto, até 2012, havia poucas informações genômicas disponíveis sobre essas cepas, limitando o conhecimento sobre suas sequências de nucleotídeos. Estudos filogenéticos indicaram que os isolados japoneses pertencem à mesma linhagem de cepas dos Estados Unidos, sugerindo que o vírus pode ter sido introduzido no

Japão através do comércio global de cavalos. Além disso, há indícios de que essas cepas não sejam nativas do Japão, mas sim variantes importadas dos Estados Unidos na década de 1960, (DONG; COOK; ZHU, et al., 2014).

2.3.3 AIE na América

Nos Estados Unidos, a AIE apresenta uma distribuição variável. Estudos indicam que há uma diversidade genética significativa entre os isolados norte-americanos do vírus, sugerindo múltiplas linhagens circulantes no país (COOK et al., 2020). Entre os rebanhos equinos, destaca-se o grupo geneticamente distinto de cavalos selvagens que habitam Shackleford Banks, na Carolina do Norte. Esses animais são considerados descendentes diretos dos cavalos espanhóis que chegaram à América do Norte no século XVI, foram abandonados após tentativas malsucedidas de colonização na costa atlântica e possuem diferentes cepas circulantes do vírus (CAPOMACCIO et al., 2012). Embora os casos tenham diminuído devido a rigorosos programas de testagem e controle, a presença do VAIE ainda é uma preocupação, especialmente em populações de equinos em áreas de difícil monitoramento, que ainda representam um reservatório do vírus da AIE (ISSEL et al., 2014).

Apesar de o Canadá não possuir condições climáticas favoráveis à disseminação do vírus, casos da doença ainda são relatados no país. Para o controle da AIE a Agência Canadense de Inspeção Alimentar (CFIA) realiza investigações de doenças envolvendo amostragem, análises epidemiológicas, restrições de movimentação, monitoramento e, quando necessário, ordenação de eutanásia. Os testes são aplicados a todos os cavalos que tiveram contato com um animal positivo nos 30 dias anteriores à amostragem. Isso inclui cavalos na mesma propriedade, em instalações próximas (com possível contato através de cercas) ou que estiveram temporariamente em contato com o animal infectado, como em eventos, hospitalizações ou alojamentos temporários. A política de testagem leva em conta o risco de transmissão, que aumenta na época de maior atividade de moscas hematófagas (principais vetores de transmissão do VAIE) e quando há sinais clínicos nos animais expostos, pois esses fatores estão associados a uma maior carga viral. (LOHMANN, et al., 2019).

A soroprevalência da EIAV no México varia conforme regiões geográficas e características climáticas, ressaltando a necessidade de programas contínuos de monitoramento e testes em larga escala. Essas iniciativas são essenciais para gerar dados epidemiológicos atualizados, permitindo um controle mais eficiente da transmissão de equídeos e reduzindo o risco de propagação da doença, uma vez que a AIE no México é pouco estudada e há escassez de informações (VILLA-MANCERA, et al., 2024). Uma análise filogenética de cepas

circulantes no estado de Nuevo León revelou uma identidade de 84–90% com cepas relacionadas em diversos países, no entanto, agruparam-se em um clado distinto em comparação com outros isolados globais, revelando uma diversidade genética única do EIAV presente no México (ROMO-SÁENZ, et al., 2021).

Nos últimos anos, Colômbia e Paraguai foram os países das Américas, exceto o Brasil, com o maior número de casos de AIE (TORRES, et al., 2024). Em algumas regiões da Argentina, o EIAV é endêmico, com taxas de prevalência sorológica de 14,7% a 63,3%. Apesar da alta incidência e das condições ambientais favoráveis à proliferação de insetos vetores, estudos laboratoriais no país identificaram que muitos equinos permanecem sorologicamente negativos por anos, tanto no teste oficial de AGID quanto em métodos não oficiais mais sensíveis como a testagem por ELISA, mesmo vivendo próximos a equídeos portadores inaparentes confirmados (RICOTTI, et al., 2016).

2.3.4 AIE no Brasil

O primeiro caso de AIE relatado no Brasil foi em 1968 no antigo estado de Guanabara, correspondente ao atual Rio de Janeiro, e no mesmo ano foi observado um caso no Rio Grande do Sul (LIMA, et al., 2022). Devido à significativa variação observada nas sequências brasileiras, não é possível confirmar uma origem plausível para a AIE no Brasil (CURSINO et al., 2018). Entretanto, estudos filogenéticos apontam a possibilidade do VAIE ter sido introduzido no Brasil por meio da rota Europa-Estados Unidos (JARA, FRIAS-DE-DIEGO; MACHADO, 2020). Essa variabilidade genética pode estar associada ao longo período de permanência do vírus na população equina no Brasil e, especialmente, no Pantanal onde a AIE é endêmica e os animais infectados não são eutanasiados (CURSINO et al., 2018).

No Brasil, a prevalência de AIE (AIE) varia significativamente entre as regiões, e não há dados consolidados que abranjam todo o território nacional, além disso sua presença é variável devido ausência de dados em cavalo de trabalho que não são testados e diagnosticados de forma rotineira. As informações disponíveis são provenientes de estudos regionais específicos. Apesar da baixa prevalência notificada no país, a doença apresenta maior incidência nos estados do Ceará, Maranhão, Roraima e Alagoas. Além disso, a menor concentração de casos por foco no Ceará, Distrito Federal e Piauí sugere uma maior dispersão do vírus nesses locais, ou seja, a presença do vírus não está limitada a determinadas regiões e sim, espalhada por todo o estado (TORRES et al., 2024).

2.4 Transmissão

O principal fator que contribui para predominância da doença em determinadas regiões, é a temperatura e umidade elevadas, a qual favorece a população de artrópodes que são vetores da doença como moscas do gênero *Tabanus* spp e *Stomoxys calcitrans*. A principal via de transmissão é pelo sangue, podendo ser transmitida pelos vetores mecânicos, ou seja, sem etapa de replicação nos insetos (TORRES, et al., 2024), e embora o vírus não se replique nesses artrópodes, ele permanece infeccioso nas partes bucais por várias horas (LUPULOVIC, et al., 2021). Entretanto, os responsáveis pela disseminação mundial da AIE é o movimento imprudente de equídeos portadores do VAIE e a forma iatrogênica por contaminação de materiais perfurocortantes (RICOTTI, et al., 2016).

A transmissão vertical é possível (AN, et al., 2024), mas há resultados conflitantes na literatura, demonstrando que apenas uma pequena porcentagem dos potros de éguas soropositivas mantém resultados positivos após o desmame. Além disso, há uma grande incidência de falsos positivos, resultado da quantidade de anticorpos de origem materna presentes no colostro (KEMEN; COGGINS, 1972; TASHJAN; KITTLESON 1976; ISSEL, et al., 1985; NOGUEIRA, et al., 2012; RESENDE, et al., 2022). Foi analisado também, a presença do vírus em fragmentos esplênicos pós eutanásia de potros e fetos de éguas positivas, em um surto na Eslovênia, para avaliar transmissão transplacentária, mas resultou em testes negativos (KUHAR, et al., 2014).

Muares e asininos são suscetíveis à infecção pelo VAIE e podem atuar como fontes de disseminação da doença (COOK et al., 2001). No entanto, a prevalência estimada nesses animais pode ser subestimada, uma vez que eles são frequentemente de baixo valor comercial e podem não ser testados com a mesma frequência que os equinos (CÂMARA et al., 2020). A subnotificação representa um risco significativo para a propagação do VAIE, sendo uma grande ameaça epidemiológica e potenciais transmissores da infecção (CÂMARA et al., 2020; COSTA et al., 2022; CARVELI et al., 2024).

Os fatores de risco para disseminação do vírus abrangem principalmente condições ecológicas como a temperatura e precipitação anual, e a densidade de cavalos (AN, et al., 2024), levando em consideração a presença e desenvolvimento de vetores transmissores e práticas de manejo (CAPOMACCIO, et al., 2012). Em regiões onde o uso de equídeos como meio de transporte e trabalho é predominante, teve altos números de casos notificados (TORRES, et al., 2024). Além disso, a população de cavalos de montaria e/ou mantidos para lazer e produção de carnes, e a problemática quanto aos testes diagnósticos os quais, eventualmente, podem deixar

animais escaparem da detecção, também torna esses animais potenciais reservatórios da doença (KUHAR, et al., 2016). Ademais, dentro de uma subpopulação de animais de alto risco, outro fator que se apresentou significativo foi a idade do animal (LOHMANN, et al., 2019).

Se o controle da doença não for eficaz e se não houver detecção dos positivos, a AIE continuará sendo uma ameaça na equideocultura (WANG, et al., 2018a). Foi observado que nas áreas as quais a eutanásia não é obrigatória, o risco para transmissão de AIE é alto (CURSINO, et al., 2018). Ademais, as estatísticas sobre a prevalência da doença são baseadas quase que exclusivamente em teste para trânsito de animais ou participação em eventos, envolvendo apenas animais de alto valor, fazendo com que animais de baixo valor zootécnico sejam excluídos dos programas de controle e que sejam possíveis fontes de infecção (CÂMARA, et al., 2020).

2.5 Fisiopatologia

A infecção pelo VAIE tem início quando a glicoproteína gp90 viral interage com seu receptor na célula hospedeira, promovendo a entrada do vírus. Esse processo pode ocorrer por fusão direta da membrana viral com a membrana plasmática da célula ou por endocitose, onde o vírus é internalizado em um endossomo. Em casos de endocitose, eventos subsequentes dentro do endossomo resultam na fusão da membrana viral com a vesícula, liberando o capsídeo no citoplasma da célula infectada. Para facilitar sua internalização, o VAIE se aproveita de mecanismos celulares naturais de endocitose, os quais normalmente são utilizados para a absorção de nutrientes (BRINDLEY; MAURY, 2008).

Uma vez no interior da célula do hospedeiro, o vírus inicia a transcrição reversa e o cDNA viral é transportado para o núcleo, onde ocorrerá a integração do DNA proviral no genoma hospedeiro. Os genes são transcritos a partir do DNA proviral integrado e traduzidos para montagem e brotamento das novas partículas virais, podendo se ligar a outras células de defesa ou eritrócitos do hospedeiro. A glicoproteína gp90, codificada pelo gene env, desempenha um papel essencial na adsorção viral ao se conectar ao equine lentivirus receptor-1 (ELR-1), um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF), facilitando a infecção das células-alvo (COOK et al., 2013). A replicação do VAIE ocorre predominantemente em tecidos ricos em macrófagos, presentes em órgãos como fígado, baço, pulmões, rins, nódulos linfáticos e glândulas adrenais (MAURY, 1994; LIMA et al., 2022). Além disso, a replicação viral contínua se mantém em reservatórios teciduais como fígado, baço e medula óssea (HARROLD et al., 2000), tanto em animais que apresentam sinais clínicos,

quanto em animais clinicamente assintomáticos (OAKS et al., 1998). Além dos macrófagos, o vírus também pode se adaptar para infectar outros tipos celulares quando cultivado *in vitro*, incluindo células endoteliais e fibroblastos. Essa capacidade de adaptação não se restringe a células equinas, uma vez que o VAIE demonstrou ser capaz de infectar células de origem felina e canina *in vitro* (BRINDLEY; MAURY, 2008).

2.6 Manifestações clínicas e alterações laboratoriais

Os sinais clínicos da AIE (AIE) variam conforme a fase da infecção e incluem febre, petéquias, edema e perda de peso, tendo como principal alteração laboratorial a anemia e trombocitopenia. A apresentação clínica pode diferir dependendo da virulência da cepa viral, da dose infecciosa e do estado imunológico do hospedeiro (CÂMARA et al., 2020). A infecção no geral segue um curso cíclico, com episódios febris associados a picos de viremia. Embora a doença possa ser fatal, muitos animais sobrevivem aos estágios iniciais e evoluem para uma infecção persistente e assintomática (CRAIGO et al., 2007).

A partir da absorção viral, imunoglobulinas IgG e IgM reagem com o complexo viral, ativando o sistema complemento e desencadeando a hemólise intra e extravascular, o que contribui para o desenvolvimento da anemia, principal característica da doença. Além disso, equinos infectados podem manifestar outras complicações, como glomerulonefrite, hepatite e linfadenopatia. Como os animais não conseguem eliminar completamente o VAIE, devido à integração do DNA proviral ao genoma do hospedeiro, a infecção é considerada vitalícia. A resposta imune humoral e celular do hospedeiro exerce um papel significativo na manifestação clínica da doença, sendo responsável por muitos dos sinais clínicos observados, mais do que a própria replicação viral (LIMA et al., 2022).

As fases da doença são divididas em fase aguda, crônica e subclínica ou assintomática. A fase aguda ocorre entre 10 e 15 dias após a infecção e se manifesta com um quadro semelhante ao da gripe, caracterizado por febre superior a 39°C e trombocitopenia acentuada. Em geral, os animais sobrevivem a esse primeiro episódio febril e evoluem para a fase crônica, que pode durar de 6 a 12 meses e se caracteriza por episódios recorrentes de hipertermia acompanhados de trombocitopenia (LEROUX et al., 2005). No estágio crônico, a persistência da febre intermitente e anemia está relacionada a variações antigênicas do envelope viral e à resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTLs). A recorrência da febre pode levar à morte ou à transição gradual para a fase assintomática (BOLDBAATAR et al., 2013).

Na fase assintomática, que pode durar décadas, os equinos infectados não apresentam sintomas clínicos evidentes, mas continuam a abrigar o vírus e a transmiti-lo. Embora a carga

viral seja reduzida, o DNA proviral e os RNAs virais ainda são detectáveis nos tecidos, independentemente do estado clínico do animal (OAKS et al., 1998). O equilíbrio entre o sistema imunológico do hospedeiro e o vírus impede o desenvolvimento da doença clínica, mas a imunossupressão pode reativar os sinais clínicos que aparecem com o aumento da replicação viral (LEROUX et al., 2005). A patogênese da AIE envolve a resposta imune do hospedeiro e a variabilidade genética do vírus. A trombocitopenia e a anemia, as principais alterações laboratoriais da infecção, resultam da destruição imunomediada das plaquetas e hemácias, associada à presença de anticorpos IgG e IgM. Além disso, macrófagos infectados produzem citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e TGF β , que suprimem a produção de megacariócitos e precursores eritróides, além de contribuem para a destruição plaquetária. Essas citocinas também podem induzir febre, perda de apetite e, por deixar o animal em estado pró-inflamatório, a concentração de hepcidina aumenta, diminuindo a absorção de ferro no trato gastrointestinal, que interfere diretamente na disponibilidade do ferro livre para produção de novas hemácias (LEROUX et al., 2005).

Estudos sugerem que os episódios febris recorrentes durante a fase crônica estão associados à emergência de variantes virais que escapam da resposta imune, devido a mutações na proteína de superfície gp90. Essas mutações ocorrem em domínios hipervariáveis da proteína, permitindo que o vírus continue a se replicar mesmo na presença de anticorpos específicos contra o VAIE (MALOSSI et al., 2020). Apesar da infecção vitalícia, o sistema imunológico equino é capaz de controlar a replicação viral através da ação combinada de linfócitos T citotóxicos e anticorpos, resultando em uma infecção persistente, mas assintomática (HULL-NYE et al., 2023). No entanto, mesmo apresentando uma aparência clínica normal, o animal permanece infectado com o VAIE, funcionando como um reservatório potencial para o vírus (CAPOMACCIO et al., 2012).

Apesar da suscetibilidade ao VAIE, muares e asininos apresentam características distintas em relação à replicação viral e ao desenvolvimento da doença. Os muares, embora infectados, geralmente não desenvolvem sinais clínicos evidentes e mantêm uma carga viral circulante baixa. Em contraste, os asininos podem apresentar uma carga viral até 10.000 vezes maior do que a observada em muares, sugerindo a existência de um “limiar patogênico” necessário para o desenvolvimento dos sinais clínicos (LEROUX et al., 2005). A baixa viremia nos muares pode explicar a ausência frequente de sintomas clínicos nesses animais, apesar da infecção (COOK et al., 2001).

2.7 Diagnóstico da AIE

A maioria dos cavalos sintomáticos, apresentam sinais clínicos e alterações laboratoriais típicas, porém inespecíficas como febre, trombocitopenia e anemia, por isso, se faz necessário o uso de diagnósticos mais precisos. Os animais infectados com VAIE exibem uma viremia de alta titulação de anticorpos, viabilizando o diagnóstico por meios sorológicos (WANG et al., 2016). O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi criado há mais de 5 décadas (KEMEN; COGGINS, 1972) e é fundamentado na detecção de anticorpos direcionados à proteína p26 do capsídeo viral. Esse teste é reconhecido como o "padrão ouro" para o comércio internacional de importação e exportação, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde Animal. O IDGA é um método econômico e apresenta alta especificidade para a detecção de animais infectados com o VAIE. Entretanto, sua aplicação demanda considerável experiência operacional e fornece baixa sensibilidade (ZHANG et al., 2024).

A proteína p26, a mais abundante entre as proteínas do núcleo do VAIE, desempenha um papel fundamental na resposta imune e no diagnóstico da doença. Diferente das glicoproteínas de superfície, ela apresenta menor variabilidade antigênica, tornando-se um alvo confiável para testes sorológicos (MALOSSI et al., 2020). No entanto, mutações na sequência de nucleotídeos de p26 podem modificar sua estrutura epítópica, afetando a eficiência diagnóstica e resultando em casos de equinos sorologicamente silenciosos em diversas regiões do mundo (LIMA, et al., 2022). Foi encontrado uma variação significativa nas sequências dos genes gag, fator que aumenta a importância de estudos constantes sobre a melhor metodologia de diagnóstico para o VAIE (BOLDBAATAR, et al., 2013).

Outra técnica, conhecida como ensaios de imunoabsorção enzimática, ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), foi desenvolvida para a detecção de anticorpos dirigidos contra as principais proteínas estruturais dos vírus. Entre essas proteínas, destaca-se a proteína do capsídeo p26, bem como a glicoproteína de superfície gp90 e a glicoproteína transmembrana gp45. Foi relatado também, um ELISA de bloqueio (bELISA) baseado em um epítipo comum de células B usando um anticorpo junto a proteína p26 para detecção dos anticorpos para VAIE. Nesse estudo, o bELISA para AIE detecta anticorpos contra a proteína p26 do VIAE por meio da competição entre os anticorpos do soro e um anticorpo monoclonal marcado com HRP. A reação colorimétrica é inversamente proporcional à presença de anticorpos no soro. É uma técnica altamente específica e sensível (HU et al. 2023).

Um dos desafios do diagnóstico sorológico da AIE é a “janela imunológica”, período entre a infecção e a soroconversão, durante o qual os equídeos podem abrigar altas cargas virais

no sangue sem apresentar anticorpos detectáveis, aumentando o risco de transmissão (COOK et al., 2013). Em cavalos e pôneis, esse período geralmente dura menos de 45 dias, mas pode se estender até 157 dias no teste IDGA, enquanto em jumentos a soroconversão pode levar o dobro do tempo (COOK et al., 2019). Além disso, há relatos de equinos que permanecem soronegativos por até 24 meses, sugerindo a existência de uma forma oculta e sorologicamente silenciosa da infecção (RICOTTI et al., 2016). Estudos indicam que equídeos com sinais clínicos têm 3,74 vezes mais chance de serem soropositivos do que aqueles assintomáticos, reforçando a importância de métodos complementares para a detecção do VAIE (BORGES et al., 2013). Ademais, para jumentos geralmente as reações no IDGA são fracas, o que pode levar a falsos negativos ou resultados difíceis de interpretar devido à resposta tardia de anticorpos ou níveis mais baixos de anticorpos em comparação com equinos e muares (OLIVEIRA, et al., 2017).

Para casos discordantes, pode ser utilizado o Immunoblot para detecção da p26, gp45 e gp90, mas por ser uma técnica mais demorada e onerosa, não é muito utilizada. A técnica de detecção molecular do vírus por reação em cadeia da polimerase (PCR) é a forma mais sensível para o diagnóstico. Esse método foi recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal (OMSA) para amplificar a região gag do VAIE e foi amplamente adotado (NAGARAJAN; SIMARD, 2001). No entanto, a aplicabilidade e a precisão desta técnica são limitadas devido aos baixos níveis de identidade genética entre isolados virais de VAIE geograficamente distintos na região de ligação dos oligonucleotídeos (DONG, et al., 2012; COOK, et al., 2019; ZHANG, et al., 2024). Embora a detecção de sequências específicas tenha sido considerada promissora em diversos ensaios publicados, nenhuma delas está sendo usada rotineiramente, inclusive os oligonucleotídeos recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal, os quais já se provaram ineficazes em alguns casos (CAPPELLI, et al., 2011; DONG, et al., 2012; MALOSSI, et al., 2020)

A possibilidade de usar RT-PCR para detecção do RNA viral circulante não é recomendada, devido às baixas cargas virais comumente encontradas em portadores inaparentes de VAIE, que podem limitar a sensibilidade diagnóstica dos testes (COOK, et al., 2019). Todavia, seria de extrema importância a extração, sequenciamento e publicação desse material genético para auxiliar na escassez de informações sobre o genoma do vírus e na construção de oligonucleotídeos aplicáveis a todos os vírus circulantes (CURSINO, et al., 2018).

2.8 Controle e prevenção

A AIE é uma doença sem tratamento específico ou vacina eficaz disponível. Diante do risco representado pelos equídeos infectados, a OMSA recomenda a vigilância sorológica, restrição do comércio e movimentação de animais positivos (AN, et al., 2024). O controle da doença baseia-se no isolamento ou eutanásia (abate sanitário) dos animais infectados, resultando em perdas econômicas significativas (JARA, FRIAS-DE-DIEGO; MACHADO, 2020). No Brasil, a eutanásia de equinos positivos no teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) é obrigatória, exceto em áreas endêmicas, como o Pantanal. A ampla extensão territorial, o controle deficitário do trânsito animal e a realização frequente de eventos equestres dificultam a erradicação da doença no Brasil (TORRES, et al., 2024).

Embora a AIE seja de notificação obrigatória mundialmente, a maioria dos países adota apenas medidas de vigilância clínica passiva e mitigação, levando à subnotificação, especialmente devido à alta prevalência de portadores assintomáticos. A implementação de testes em toda a população equina ocorre em poucos países, como Itália, Romênia e Sérvia (CARVELLI et al., 2024). Além disso, a detecção de todos os casos subclínicos é limitada pela variação nos níveis de anticorpos circulantes nos equinos infectados, tornando insuficiente o uso exclusivo de medidas de quarentena (WANG, et al., 2018a).

Diversas abordagens vacinais foram testadas para a AIE, incluindo vacinas de subunidade recombinante e vírus inativado, mas os resultados foram inconsistentes, reduzindo a infecção e outros aumentando a replicação viral (HULL-NYE, et al., 2023). A vacina chinesa de vírus vivo atenuado, utilizada entre 1975 e 1990, demonstrou proteção contra algumas cepas heterólogas e permanece como o único imunizante lentiviral utilizado em larga escala (WANG, et al., 2018a). No entanto, sua eficácia global é incerta devido à grande diversidade genética do vírus, além da impossibilidade de distinguir entre animais vacinados e infectados naturalmente, comprometendo o controle baseado em testes sorológicos (CÂMARA, et al., 2020).

A variação genética do envelope viral representa um desafio significativo para o desenvolvimento de vacinas eficazes em nível global. Pequenas diferenças na sequência da glicoproteína gp90 podem anular a imunidade conferida por vacinas atenuadas, tornando improvável a obtenção de uma proteção ampla e duradoura (DONG; COOK; ZHU, 2014; CRAIGO, et al., 2007). O desenvolvimento de vacinas contra o HIV tem alternado entre a estimulação de células T e a produção de anticorpos. Após resultados decepcionantes obtidos com anticorpos neutralizantes, a atenção voltou-se para as células T. No entanto, evidências recentes indicam que a combinação de ambas as abordagens pode oferecer uma solução mais

eficaz (HULL-NYE et al., 2023). Na falta de vacinas eficazes, o controle do VAIE atualmente se baseia totalmente na identificação e na remoção (abate sanitário) ou quarentena dos animais infectados (RICOTTI et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer um protocolo utilizando soro e coágulo para identificação individual de equinos e do vírus da AIE, visando melhorar a segurança no diagnóstico da AIE.

3.2 Objetivo específico

- I. Extrair gDNA de amostras de sangue total, soro e coágulo em diferentes tubos de coleta, tempo e temperatura de armazenamento, métodos de preparo e extração;
- II. Estabelecer um protocolo simples e acessível para a extração de DNA a partir dessas amostras;
- III. Amplificar o gDNA extraído com oligonucleotídeos microssatélites para genotipagem animal;
- IV. Amplificar por nPCR o gDNA extraído para detecção do DNA proviral do VAIE.
- V. Sequenciar o DNA proviral amplificado por nPCR para confirmar a exatidão do teste.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração de DNA em amostras de sangue

A fim de padronizar e otimizar o protocolo de extração de DNA genômico (gDNA) e amplificação por PCR, foram usadas amostras de sangue com anticoagulante EDTA, colhidas por venopunção da jugular de cavalos (*Equus ferus caballus*) da Fazenda Sucupira, Embrapa, Brasília-DF, Brasil. Como controle positivo foi utilizado sangue total e capa leucocitária, que são amostras padrão mais usadas para obtenção de gDNA a partir do tecido sanguíneo. Além disso, amostras de plasma também foram usadas para extração de gDNA, pois é uma amostra que se assemelha ao soro, foco do estudo, em relação a sua característica hipocelular e com esperada baixa concentração de gDNA.

As extrações de gDNA foram feitas usando o kit comercial DNeasy & Tissue Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, com volume inicial de 200µL de sangue, 100 µL de capa leucocitária, 400 µL a 1mL de plasma. Foram aplicados 1 µL da solução final do protocolo de extração do gDNA de sangue e leucócitos e 25 µL do gDNA de plasma, no gel agarose 1,5% para averiguar a integridade e qualidade da amostra, e confirmar a quantificação feita pelo espectrofotômetro NanoDrop (Thermo scientific) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Também foram realizadas extrações de gDNA para amplificação por PCR com sangue tratado com diversos anticoagulantes: EDTA, Heparina de lítio, Citrato de sódio e Fluoreto de sódio; com o objetivo de analisar a influência dos anticoagulantes mais comumente usados para acondicionamento de amostras de sangue em laboratórios de análises clínicas. Além disso, foi investigado o efeito do tempo (3, 30, 60 e 90 dias) e temperatura de armazenamento (4°C e -20°C) das amostras de sangue equino sobre as reações de PCR. Essa análise foi realizada inicialmente para verificar quais outros tubos de coleta de sangue poderiam ser utilizados para extração do gDNA equino, caso o soro não fosse uma amostra viável para amplificação do gDNA por PCR.

O sangue venoso foi coletado por venopunção jugular duas vezes do mesmo animal em dois momentos, denominados grupos 4C (4°C) e -20C (-20°C), respectivamente. As amostras foram coletadas em tubos contendo os seguintes anticoagulantes: EDTA K2 (FirstLab® 4mL) a 1,5%, Heparina de Lítio (FirstLab® 6mL), Citrato de Sódio (VacuPlast® 3,6mL) a 3,2% e Fluoreto de Sódio + EDTA K3 (Vaccum® 2mL), com um volume de 2mL de sangue venoso em cada tubo. As concentrações de anticoagulante Heparina de Lítio e Fluoreto de sódio não são fornecidas pelos fabricantes dos tubos de coleta. Os tubos foram transportados para o

Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia sob refrigeração (4°C) em até duas horas após a coleta.

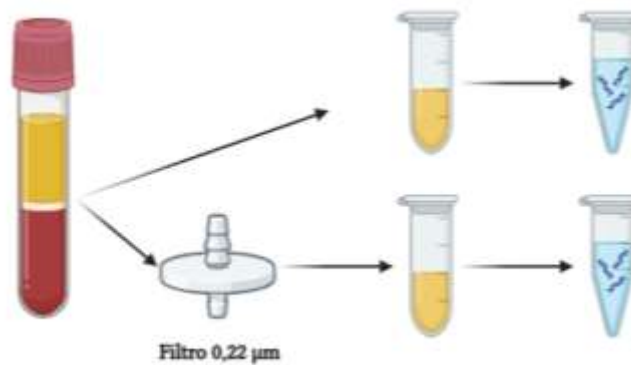
No laboratório, as amostras foram aliqüotadas em microtubos com volume de 200 µL até o momento da extração e foram submetidas a diferentes condições de armazenamento: refrigeração a 4 °C e congelamento a -20 °C. Para testar a influência do tempo de armazenamento na qualidade do DNA extraído, as amostras 4C e -20C foram acondicionadas em suas respectivas temperaturas e extraídas nos seguintes intervalos de tempo pós-coleta: 3d (3 dias pós-coleta), 30d (30 dias pós-coleta), 60d (60 dias pós-coleta) e 90d (90 dias pós-coleta).

4.2 Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para identificação individual equina

Após a definição das melhores condições para amplificação por PCR, foram realizadas extrações de DNA a partir de amostras de soro obtidas de tubos com ativador de coágulo, sem centrifugação prévia, ou seja, a separação espontânea entre soro e coagulação ocorreu por decantação durante 24 horas a 4°C, enquanto outro conjunto de amostras foi submetido à centrifugação a 2.500 RPM por 10 minutos. Essas amostras foram denominadas, respectivamente, **Soro Decantado** e **Soro Centrifugado**. Para a extração de DNA, foram testados volumes iniciais de 1mL e 1,5mL utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) eluídos em 80 µL, e 25 µL do DNA extraído foram analisados em gel de agarose.

Para a avaliação da origem do DNA extraído, um segundo experimento foi realizado, diferenciando a presença de leucócitos em suspensão e de DNA livre de células (cell-free DNA; cfDNA). Para isso, amostras de soro do mesmo animal foram submetidas a dois métodos diferentes de extração: Extração total de DNA realizadas com o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), que recupera tanto o DNA celular quanto o cfDNA, e Extração seletiva de cfDNA, utilizando o kit MagMax Cell Free DNA Isolation (Invitrogen), que emprega nanopartículas magnéticas para isolar preferencialmente o cfDNA. Além disso, o soro obtido por decantação foi dividido em duas alíquotas iguais, a Alíquota 1: Extração direta sem tratamento adicional, e a Alíquota 2: Passou por filtração em um filtro de 0,22 µm para remover células em suspensão antes da extração de DNA (Figura 3).

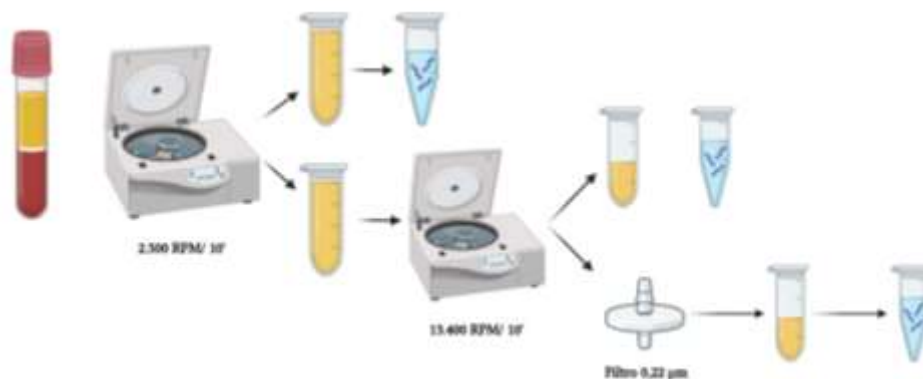
Figura 3- Preparo com filtro para extração de gDNA em soro. Alíquota do soro sem filtro e alíquota com soro filtrado.



Fonte: produção própria.

Com o objetivo de melhorar a purificação do soro e reduzir ainda mais a presença de células em suspensão, um terceiro experimento foi conduzido, incluindo uma etapa adicional de centrifugação antes da extração. Para isso, amostras de soro de quatro animais foram processadas da seguinte forma: Centrifugação inicial: as amostras foram centrifugadas a 2.500 RPM por 10 minutos e divididas em duas alíquotas: alíquota A: Seguiu diretamente para a remoção de DNA, e alíquota B: passou por uma segunda centrifugação a 13.400 RPM por 10 minutos para uma etapa adicional de purificação. Após a segunda centrifugação, a alíquota B foi novamente dividida em duas partes: extração direta do DNA e filtragem com filtro de 0,22 µm, seguida da extração de DNA para avaliar a remoção de células remanescentes (Figura 4).

Figura 4 - Preparo com centrifugação e filtragem para extração de gDNA em soro.



Fonte: produção própria.

Independentemente do método de preparo, todas as extrações foram realizadas utilizando 200 µL de volume inicial para garantir a padronização dos experimentos.

Posteriormente a esses resultados, aplicou-se às amostras de soro, um método de concentração amplamente utilizado em laboratórios de patologia clínica para análise de líquidos biológicos. Essa técnica visa sedimentar as células no fundo do tubo, reduzindo o volume da amostra e aumentando a concentração celular, facilitando a remoção do gDNA. O procedimento, denominado concentração de soro, consiste em centrifugar a amostra a 13.400 RPM por 10 minutos, seguido do descarte cuidadoso do sobrenadante, dessa forma, o volume inicial de 1mL é reduzido a um conteúdo concentrado, utilizado posteriormente na extração conforme o protocolo de cada método.

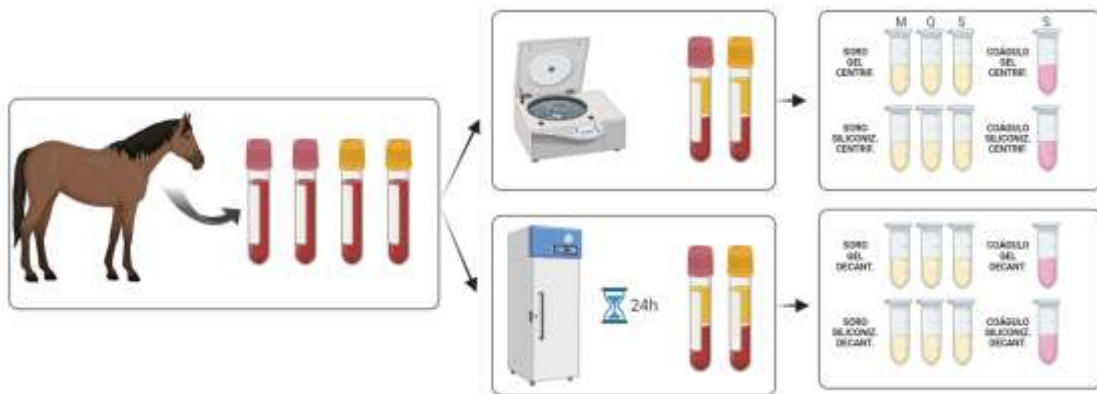
Foi realizada a extração do gDNA a partir de soro obtido por separação espontânea, uma vez que há maior presença de leucócitos em suspensão, em dois períodos diferentes: 24 horas e 4 dias. As amostras de soro com 24 horas de separação foram submetidas a três métodos de extração: colunas de sílica, magnética e Salting Out, enquanto as amostras com 4 dias foram extraídas apenas por colunas de sílica. Além disso, o coágulo resultante desses períodos (24 horas e 4 dias) também foi submetido a extração por Salting Out, protocolo padronizado no laboratório (descrito no Anexo 1), com o objetivo de avaliar a interferência do tempo de preparo na recuperação de DNA.

A aplicação desse preparo foi usada para analisar a influência dos métodos de extração, além de verificar se o tipo de tubo de coleta interfere do resultado. Isso deve-se ao fato de que laboratórios de diagnóstico de AIE frequentemente recebem amostras de soro sem um padrão de processamento definido. Para esta análise, foram coletadas amostras de sangue venoso de 10 animais da Fazenda Sucupira da Embrapa, por meio de venopunção da jugular. O sangue foi coletado em quatro tubos sem anticoagulante animal: dois contendo gel separador (**tampa amarela**) e dois contendo apenas ativador de coágulo (**tampa vermelha**), denominados **Gel** e **Siliconizado**, respectivamente. Para cada animal, um par de tubos Gel e Siliconizado foi centrifugado a 2.500 RPM por 10 minutos para obtenção de soro e armazenado a -20°C em microtubos de 2,0 mL. O outro par de tubos foi submetido à separação espontânea do soro por incubação a 4°C durante 24 horas e, posteriormente, armazenado sob as mesmas condições das amostras centrifugadas até o momento da extração. Além disso, as amostras de coágulo também foram preparadas para extração, sendo divididos em fragmentos pesando cerca de 300mg, descartando a parte superior que fica em contato com o gel e com o soro, e também armazenadas em microtubos de 2,0mL a -20°C.

Para realização da extração de DNA das amostras de soro, os 2mL foram divididos em 3 tubos com 650µL de soro em cada, que passaram por três protocolos de extração diferentes: o método de colunas utilizando o kit comercial da QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Kit), o

método com nanopartículas e estante magnética por meio do kit comercial MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit (Invitrogen), ambos seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, e o método de extração com precipitação de proteínas Salting Out, que também foi utilizado com as amostras de coágulo. O volume inicial de amostra para extração foi 200µL para o kit da QIAGEN, 300 µL para Salting Out e 600 µL para MagMAX do soro concentrado, e 300mg de coágulo. As quantidades de amostras processadas diferiram para cada método, pois foi usado o volume máximo de amostra de soro que cada método permitia. O preparo e armazenamento das amostras está esquematizado na Figura 5.

Figura 5 - Coleta, preparo e armazenamento das amostras para extração magnética (M), por coluna QIAGEN (Q) e por Salting Out (S).



Fonte: produção própria.

A identificação das amostras consistiu em: **CV1 a CV10** (Cavalo 1 a Cavalo 10), **G ou S** (Tubo de coleta usado: Gel ou Siliconizado), **C ou D** (Preparo da amostra: Centrifugado ou Decantado), **M, Q ou S** (Método de extração: MagMAX, QIAGEN ou Salting Out) e **S ou C** (Tipo de amostra: Soro ou Coágulo), por exemplo: **CV1 GCMS** (Cavalo 1/ Gel/ Centrifugado/ MagMAX/ Soro), **CV4 SDQS** (Cavalo 4/ Siliconizado/ Decantado/ QIAGEN/ soro) e **CV7 GDSC** (Cavalo 7/ Gel/ Decantado/ Salting Out/ Coágulo), totalizando 16 extrações por animal.

Todas as amostras foram eluídas em 80µL de tampão TE. As amostras extraídas de coágulo foram quantificadas pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, e analisadas em gel agarose 1,5% por meio da eletroforese a 100v por 1 hora e posteriormente submetidas a ensaios de PCR. No entanto, devido à baixa concentração do DNA produzido em amostras de soro, optou-se por seguir diretamente para a amplificação por PCR, já que a aferição prévia da concentração por espectrometria ou eletroforese em gel de agarose se mostraram inviáveis.

Para comprovar a viabilidade do uso dessas amostras para identificação individual equina, os DNAs extraídos de soro foram enviados a dois laboratórios de genotipagem animal (Laboratório Raça e Allele Biotecnologia), como controle positivo foram enviadas amostras de gDNA extraídas de sangue total, coágulo e soro de um animal.

4.3 Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para detecção do provírus

As amostras que estavam armazenadas no repositório do banco de soro do laboratório de genética animal da Embrapa, foram processadas para extração de DNA e amplificação por PCR no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília em 2024. Essas amostras são provenientes de coletas de sangue de 15 animais de 2022, sendo 12 de Sergipe e 3 de Pernambuco, que foram submetidas a testes sorológicos de AIE. Como o objetivo na época, era específico de testes sorológicos, foram coletadas em tubos sem anticoagulante e, portanto, apresentavam o sangue coagulado e o soro, na maioria delas bastante hemolisado.

Para a extração de DNA genômico a partir dessas amostras de coágulo, os tubos foram centrifugados a 2.500RPM por 10 min e as amostras foram separadas e fragmentadas de acordo com o preparo citado anteriormente. Foi utilizado o método de extração por precipitação de proteínas Salting Out. Já as amostras de soro foram descartadas devido à sua intensa condição de hemólise, consequência do tempo de armazenamento. Todos os DNAs extraídos foram quantificados pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e submetidos a eletroforese em gel de agarose para avaliação da qualidade e concentração da amostra.

Para a detecção de DNA proviral em amostras de soro, foram utilizadas amostras frescas de 35 animais soropositivos para AIE, previamente diagnosticados pelo método de ELISA e/ou IDGA. Essas amostras, provenientes do Mato Grosso, Tocantins, Amapá, Pará, Roraima e Brasília, foram fornecidas pelo Laboratório Santé de Brasília, com autorização do Ministério da Agricultura e Pecuária, para a realização dos testes moleculares. A extração de DNA foi realizada com o método de concentração de soro e o protocolo Salting Out, descrito anteriormente nesse estudo.

4.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação individual equina

O gDNA extraído de sangue e capa leucocitária foi usado como controle positivo para otimização dos oligonucleotídeos nos ensaios de PCR. Nessa etapa, foram testados diversos

parâmetros para aperfeiçoar a reação, como concentração de gDNA, MgCl₂, oligonucleotídeos, e melhor temperatura de anelamento. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR foram sintetizados com base no painel de marcadores de microssatélites Single Tandem Repeat (STR) recomendado pela International Society for Animal Genetics (ISAG) Equine Core Panel 2014 (Tabela 1).

Tabela 1- Nome dos oligonucleotídeos , sequência FWD (senso) e REV (antisenso), tamanho em pares de base e cromossomo.

Locus	Sequência FWD (5'-3')	Sequência REV (5'-3')	Produto da PCR (pb)	ECA
ASB 23	GAGGGCAGCAGGT TGGGAAGG	ACATCCTGGTCAAAT CACAGTCC	175-211 pb	3
HMS 2	CTTGCAGTCGAATG TGTATTAAATG	ACGGTGGCAACTGC CAAGGAAG	222-248 pb	10
HMS 6	GAAGCTGCCAGTAT TCAACCATTG	CTCCATCTTGTGAAG TGTA ACTCA	151-169 pb	4
HTG4	CTATCTCAGTCTTG ATTGCAGGAC	CTCCCTCCCTCCCTC TGTTCTC	127-139 pb	9

ECA: = Equus caballus chromosome

O DNA extraído com EDTA foi submetido a ensaios de PCR com as seguintes concentrações de reagentes: 100 - 150 ng de DNA genômico, 1x PCR Buffer (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4 mM de dNTP mix (Invitrogen), 0,15 µM de cada primer (Exxtend Thecnologies), 1U de Taq polimerase Platinum (Invitrogen) e água Milli-Q para completar o volume final de 20 µL. As reações no termociclador (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD) foram realizadas nas condições de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos (desnaturação 94°C por 20 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 40 segundos) e extensão final a 72°C por 3 minutos. Os produtos das PCRs (Amplicons) foram submetidos a eletroforese em gel agarose 2,0%, corado com Brometo de Etídio (0,2 µg/mL), usando o tampão TBE 0,5x e submetidos a uma carga de 100 volts por 1 hora para que houvesse migração homogênea dos amplicons de acordo com seu peso molecular (MW, 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) e, posteriormente, visualizados por meio de um transiluminador de luz Ultravioleta com comprimento de onda de 306 nm.

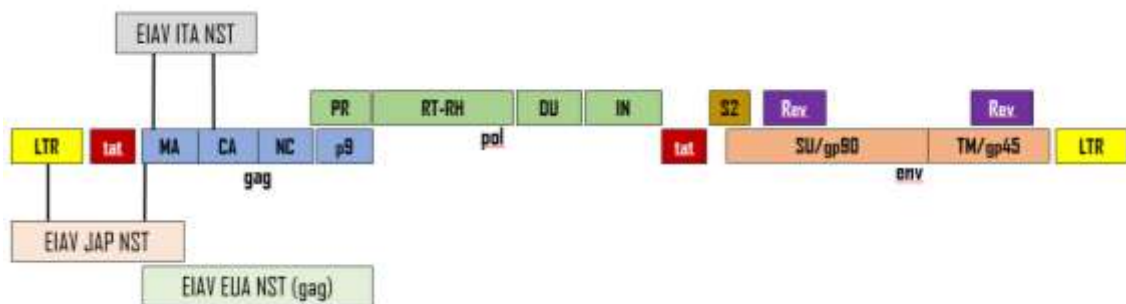
Para a amplificação do DNA extraído com os diferentes anticoagulantes foi usado apenas o par de primer do Locus ASB 23 (cromossomo 3 do genoma equino). As sequências

de oligonucleotídeos do ASB 23 estão descritas na Tabela 1. Os DNAs extraídos de soro, passaram por testes para adaptações em relação ao volume de gDNA usado na reação, testados 10 e 5µL, uma vez que as amostras não foram quantificadas e não há sua concentração estabelecida. Para as amostras de coágulo foi padronizado o volume de 1µL na reação, equivalente a 100-150ng de gDNA. Além disso, foram amplificados com os microsatélites descritos na Tabela 1, e as condições da reação no termociclador foram as mesmas usadas em análises de amostras de sangue total.

4.5 Reação de polimerase em cadeia nested (nPCR) para detecção do provírus

A amplificação por PCR convencional das amostras de animais soropositivos, teve o objetivo de identificar a presença do DNA proviral do VAIE nas amostras de DNA extraído de coágulo e soro, e para isso foram selecionados 3 pares de oligonucleotídeos que flanqueiam diferentes regiões do genoma viral para *nested*PCR descritas na literatura (Oaks et al, 1998; Capelli et al 2011; Dong et al, 2012) denominados de acordo com o país onde foi realizado o estudo, sendo o Oaks dos Estados Unidos da América (EIAV EUA), Capelli da Italia (EIAV ITA) e Dong do Japão (EIAV JAP) do como mostra a Figura 6.

Figura 6 – Posição dos oligonucleotídeos no genoma para amplificação do DNA pró-viral por nPCR.



Fonte: produção própria.

Ademais, todos os DNAs extraídos foram amplificados com o primer HMS2, para garantir que a amostra estava viável para a reação com os oligonucleotídeos do vírus da AIE. As reações de PCR foram realizadas em alíquotas com volume final de 20µL, 50-100ng de DNA genômico extraído de coágulo e 5 µL de DNA extraído de soro, e para as nPCR foi adicionado 2 µL do primeiro ensaio de PCR. O nPCR (segunda amplificação) foi realizado com as mesmas concentrações dos reagentes e condições do termociclador usados nas reações de PCR da primeira amplificação (anteriormente descritas). A temperatura de anelamento foi de

acordo com os oligonucleotídeos utilizados, baseados na temperatura utilizada nos estudos originais (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na PCR para provirus.

Primer	Sequência	Amplicon	TA	Referência
EUA FWD	5' – CCATTGCTGGAAGATGTAAC – 3'	782bp	56°C	Oaks et al, 1988.
EUA REV	5' – TGCGTTCTGAATAGTCAGTG – 3'			
nEUA FWD	5' – GGCTGGAAACAGAAATTTTA – 3'	427bp	50°C	Oaks et al, 1998.
nEUA REV	5' – TAGGTTTTCCAATCATCACT – 3'			
ITA FWD	5' – GACATGGAGCAAAGCGCTCA – 3'	547bp	66°C	Capelli et al, 2011.
ITA REV	5' – CTGCCCAGGCACCACATCTA – 3'			
nITA FWD	5' – TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG – 3'	313bp	68°C	Capelli et al, 2011.
nITA REV	5' – TTTCTGTTTCCAGCCCCATC – 3'			
JAP FWD	5' – GACAGTTGGGCACTCAGATT – 3'	246bp	52°C	Dong et al, 2012.
JAP REV	5' – CAGGAACACCTCCAGAAGAC – 3'			
nJAP FWD	5' – ATTCTGCGGTCTGAGTCCCT – 3'	203bp	58°C	Dong et al, 2012.
nJAP REV	5' – TAAGTTCTCCTCTGCTGTCC – 3'			

n: primer para o PCR Nested

Os produtos das duas amplificações (convencional e nested) foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 2,0% corado com Brometo de Etídio, sob a tensão de 100 volts por 1 hora e foram visualizados utilizando transiluminador de luz Ultravioleta e o marcador 1kb DNA Plus Ladder (Invitrogen).

Além disso, foi testado um novo par de oligonucleotídeos, combinando os oligonucleotídeos desenhados por Dong e Capelli. Para isso, utilizou-se o primer forward JAP e nJAP e o primer reverse ITA e nITA com o objetivo de amplificar um fragmento maior do vírus (600-630bp), e identificar linhagens diferentes de vírus nas diversas amostras coletadas, nomeado de LG e nLG (Tabela 3). As amostras de gDNA foram submetidas a essa análise sob as mesmas condições dos demais oligonucleotídeos, exceto pela temperatura de anelamento, que foi otimizada por meio de um gradiente de temperatura (58, 62 e 68°C). Todos os produtos de PCR foram analisados por meio da eletroforese em gel.

Tabela 3– Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na PCR para provirus.

Primer	Sequência	Amplicon	TA	Referência
JAP FWD	5' – GACAGTTGGGCACTCAGATT – 3'	-	52°C	Dong et al, 2012.
ITA REV	5' – CTGCCAGGCACCACATCTA – 3'			Capelli et al, 2011
nJAP FWD	5' – ATTCTGCGGTCTGAGTCCCT – 3'	630bp	58°C	Dong et al, 2012.
nITA REV	5' – TTTCTGTTTCCAGCCCCATC – 3'			Capelli et al, 2011

4.6 Clonagem de DNA proviral e sequenciamento

Os fragmentos que amplificaram no tamanho esperado da nPCR foram purificados dos géis de agarose usando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) para serem clonados no vetor pGEM-Teasy (Promega) e enviados para o sequenciamento Sanger (Macrogen-Coréia). Os amplicons foram clonados no pGEM-Teasy usando a proporção 6:1 (fragmento: vetor) e concentração 25ng do vetor, quantificados por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo) e confirmados por quantificação em gel de agarose usando como referência o marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O sistema de ligação foi montado de acordo as instruções do fabricante e incubados por 1h em temperatura ambiente, posteriormente por mais 14h a 16°C. Após a incubação os sistemas de ligação foram transformados por choque térmico (Inoue, et al, 1990) em bactérias competentes *E. coli* (DH5α). Os clones produzidos com a transformação das *E. coli* foram inoculados em 2ml de meio líquido LB, crescidos a 37°C, 250 RPM por 16 horas e o DNA plasmidial purificados utilizando o kit comercial QIAPREP Spin Miniprep (QIAGEN), e quantificado no gel e Nanodrop. A clonagem do amplicon foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição *PvuI* e *NotI*, e então enviados para sequenciamento.

4.7 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada após verificação da normalidade dos dados. Para comparar a qualidade do DNA entre anticoagulantes, temperaturas e tempos de armazenamento, foi utilizada ANOVA unidirecional, seguida do teste de Tukey para dados normalmente distribuídos. Para concentração de DNA, foi aplicada ANOVA unidirecional para anticoagulantes e temperaturas, enquanto o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para tempo de armazenamento.

Para comparar a taxa de amplificação entre os diferentes métodos de extração de DNA (Salting Out, MagMAX e QIAGEN), os tipos de tubo de coleta (siliconizado e com separador de gel) e os métodos de preparo do soro (centrifugação e decantação), as análises foram realizadas utilizando o teste qui-quadrado (χ^2). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o software Sigmaplot 14.5.

4.8 Aprovação Ética

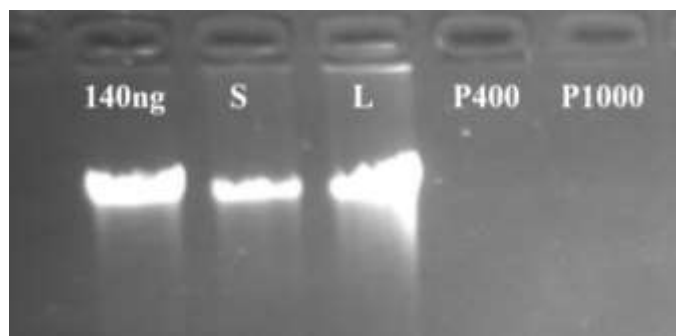
Este estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/Cenargen) em Pesquisa da EMBRAPA, registrado sob o Protocolo nº 004/2022.Nº 004/2022.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA em amostras de sangue

A extração de DNA genômico realizada a partir de amostras de sangue total, capa leucocitária e plasma, utilizando volumes iniciais de 200 μL , 100 μL , 400 μL e 1mL respectivamente, resultou em concentrações analisadas por espectrofotometria e confirmadas por gel, de 50 ng/ μL para o DNA de sangue total e 200 ng/ μL para o DNA de leucócitos, ambos dentro do valor de referência para pureza da extração por meio da razão OD 260/280. Por outro lado, a remoção de DNA a partir do plasma foi quantificada em 0,4 e 0,5 ng/ μL , e mesmo com a aplicação de 25 μL no gel, não foi possível visualizar bandas, revelando baixa recuperação de material genético e impossibilitando a análise quantitativa e qualitativa da extração (Figura 7).

Figura 7 - Gel agarose para quantificação do gDNA de sangue (S), de leucócitos (L) e de 400 uL e 1mL de plasma (P400 e P1000). Controle positivo com 140 ng de gDNA bovino previamente extraído.



Fonte: produção própria.

As análises de qualidade por espectrofotometria das amostras de DNA extraídas para avaliar a influência dos anticoagulantes, temperatura e tempo de armazenamento, estão apresentadas na Tabela 4. A razão OD 260/280 foi a base para avaliação da qualidade dos DNAs extraídos e é amplamente utilizada para indicar contaminação por proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem a 280 m ou próximo a ele (LUCENA AGUILAR et al., 2016).

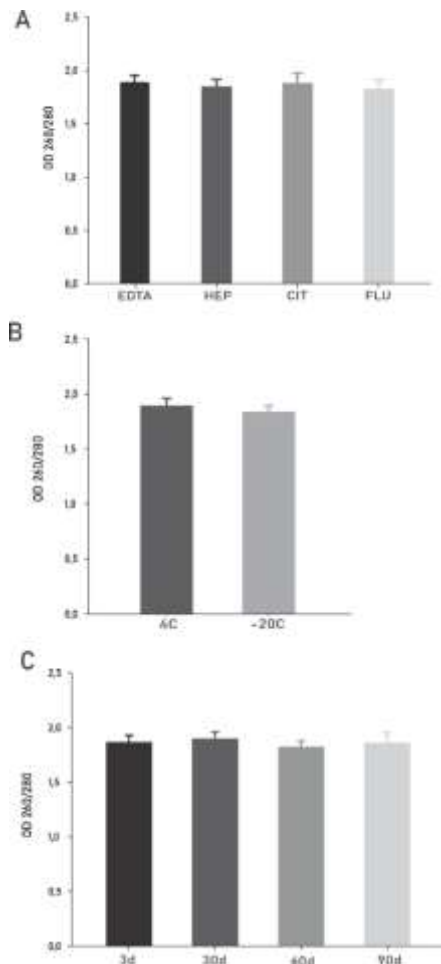
Tabela 4 - Qualidade do DNA medida por densidade óptica (OD, 260/280) do DNA extraído em amostras com diferentes anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato de sódio, fluoreto de sódio) e armazenada a 4°C (4C) e -20°C (-20C) durante: 3d (3 dias após a coleta), 30d.

Amostra	EDTA		Heparina		Na+ citrato		Na+ fluoreto	
	4C	-20C	4C	-20C	4C	-20C	4C	-20C
3d	1,87	1,95	1,87	1,81	1,97	1,81	1,82	1,83
30d	1,99	1,83	1,98	1,86	1,91	1,88	1,74	1,91
60d	1,87	1,85	1,8	1,8	1,76	1,85	1,75	1,94
90d	1,91	1,83	1,84	1,8	2,04	1,85	1,73	1,88

Os dados da Tabela 4 indicam que as amostras do grupo 4C coletadas em EDTA e Heparina mantiveram uma razão OD 260/280 próximas da razão OD ideal entre 1,8 e 2,0 (GUHA et al., 2017) em todos os tratamentos de tempo de armazenamento (3d a 90d). Em contraste, o citrato apresentou valores fora da razão OD de referência desejável de 60d a 90d, e o fluoreto de 30d a 90d. Os valores de OD 260/280 obtidos em amostras refrigeradas em fluoreto de sódio podem ser justificados pela associação dos dois sais, uma vez que este é um anticoagulante fraco quando associado ao EDTA (CERÓN et al., 2003), e possivelmente interferiu na qualidade da amostra, enquanto amostras tratadas apenas com EDTA apresentaram bons resultados de pureza. No entanto, o International Council Standardization of Hematology (ICSH) e outros estudos recomendam o uso do K2 EDTA devido ao seu menor efeito hiperosmolar nas células sanguíneas em comparação ao K3 EDTA e sua ação em prevenir a degradação do DNA (GOOSSENS et al., 1991; ZAHRAINI et al., 2021). Portanto, uma vez que o uso do EDTA sozinho apresentou melhor qualidade e concentração de DNA do que o fluoreto de sódio + EDTA, não há razão para usar um sal mais complexo como anticoagulante para fins moleculares. Além disso, todas as amostras do grupo -20C permaneceram dentro da faixa de valores ideais de OD, sugerindo que o congelamento permite obter uma gDNA com qualidade desejável.

Não foram observadas diferenças significativas na qualidade do DNA extraído de acordo com o tipo de anticoagulante usado (Figura 8A, $P = 0,272$), temperatura de armazenamento (Figura 8B, $P = 0,958$) ou tempo de armazenamento (Figura 8C, $P = 0,221$).

Figura 8- (A) Efeito de anticoagulantes distintos na qualidade do DNA: EDTA; HEP (Heparina); CIT (Citrato); FLU (Fluoreto). (B) Efeito do armazenamento em temperatura (4°C ou -20°C) na qualidade do DNA. (C) Efeito do tempo de armazenamento na qualidade do DNA, medido em dias (3, 30, 60 e 90 dias)



Fonte: produção própria.

Esses resultados indicam que nenhum dos fatores avaliados afetou significativamente a qualidade do DNA, medida pela densidade óptica. Em relação à concentração de DNA extraído ao longo do tempo de armazenamento os dados obtidos estão descritos na Tabela 5

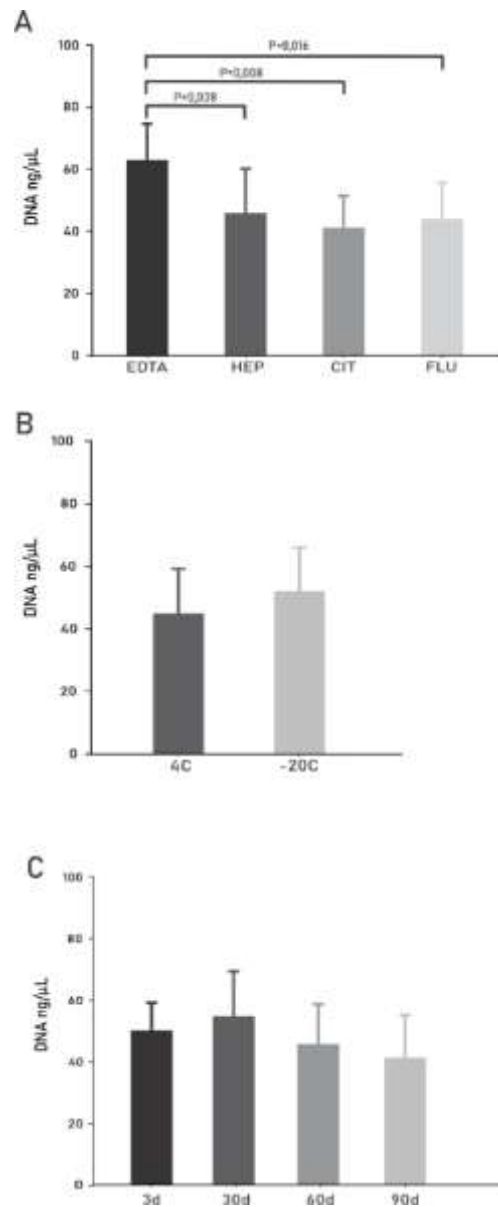
Tabela 5- Concentração de DNA (ng/uL) extraído de uma amostra de sangue total equino coletada em diferentes anticoagulantes do grupo 4C (4°C) e -20C (-20°C) durante: 3d (3 dias pós-coleta), 30d (30 dias pós-coleta), 60d (60 dias pós-coleta) e 90d (90 dias pós-coleta) antes da extração de gDNA.

Amostra	EDTA		Heparina		Na+ citrato		Na+ fluoreto	
	4C	-20C	4C	-20C	4C	-20C	4C	-20C
3d	43	55	61	59	46	39	58	40
30d	73	77	39	62	44	53	40	50
60d	66	74	30	49	34	55	31	54
90d	57	59	42	25	29	39	26	53

Observa-se uma variação na concentração de DNA, nos grupos 4C de Citrato e Flueoreto houve diminuição da concentração, sugerindo uma redução de gDNA nas amostras armazenadas sob refrigeração. Além disso, pode-se observar que as amostras congeladas resultaram em uma maior concentração de DNA genômico após a extração em comparação com as amostras as refrigeradas. Isso pode ser justificado pela maior recuperação de DNA genômico nas amostras congeladas, pois a baixa temperatura causa ruptura dos leucócitos, atuando em sinergia com o tampão de lise e resultando em maior quantidade de DNA livre (GUHA et al., 2018). Portanto, esse método de armazenamento tende a preservar melhor o DNA nas amostras de sangue.

Considerando o efeito anticoagulante, os dados obtidos mostram (Figura 9A) que as médias das amostras armazenadas em EDTA foram maiores do que as obtidas com outros anticoagulantes, com diferença estatística ($P=0,005$). A comparação por fator usando comparação múltipla pareada mostra que o EDTA apresentou diferença estatística em relação aos outros anticoagulantes: EDTA vs. HEP ($P = 0,038$), EDTA vs. CIT ($P = 0,006$) e EDTA vs. FLU ($P = 0,018$).

Figura 9- (A) Efeito dos anticoagulantes na concentração de DNA (ng/ul): EDTA; HEP (Heparina); CIT (Citrato); FLU (Fluoreto). (B) Efeito da temperatura de armazenamento (4°C ou -20°C) na concentração de DNA. (C) Efeito do tempo de armazenamento na concentração de DNA, medido em dias (3, 30, 60 e 90 dias).



Considerando a temperatura e o tempo de armazenamento da amostra, não foram encontradas diferenças entre amostras refrigeradas e congeladas (Figura 9B, $P = 0,163$) e amostras armazenadas por 3 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias (Figura 9C, $P = 0,300$). Considerando a temperatura e o tempo de armazenamento da amostra, não foram encontradas diferenças entre amostras refrigeradas e congeladas, e entre o tempo de 3, 30, 60 e 90 dias. No entanto, o congelamento é relatado como o melhor método para preservação de amostras

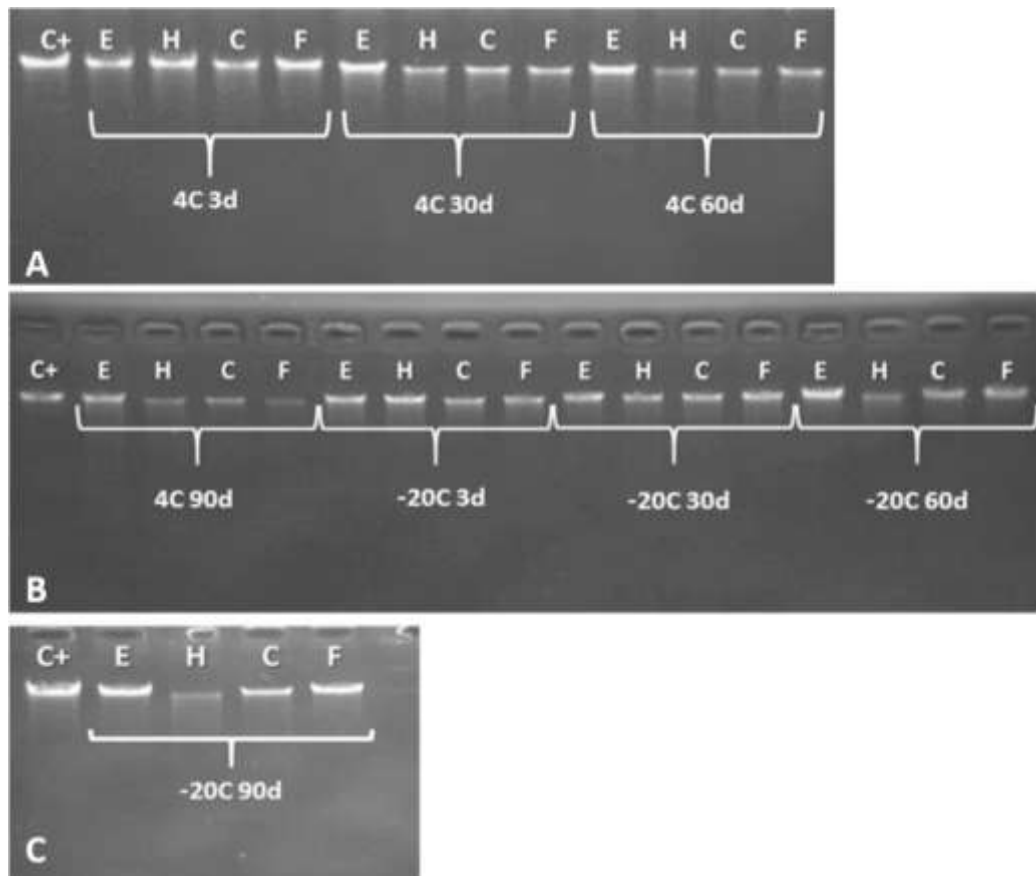
(HOLLAND et al., 2003; SOTOUDEH ANVARI et al., 2021), bem como maiores concentrações de DNA em comparação com amostras refrigeradas (PERMENTER et al., 2015; MOLER et al., 2021). Provavelmente porque as enzimas que degradam o DNA (DNases), encontradas nas amostras de sangue coletadas em campo, podem ser ativas em temperaturas refrigeradas degradando o DNA antes de sua extração e purificação das células nucleadas do sangue.

Para confirmar a integridade do DNA, as extrações foram analisadas via gel de agarose a 0,8% (Figura 10).

Figura 10- Análise de qualidade por eletroforese do DNA extraído. A) Amostra 4C em: 3d, 30d e 60d.

B) Amostra 4C em: 90d, e -20C em: 3d, 30d e 60d. C) Amostra -20C em: 90d. E (EDTA); H

(Heparina); C (Citrato); F (Fluoreto).C: Controle com 70 ng/μL.



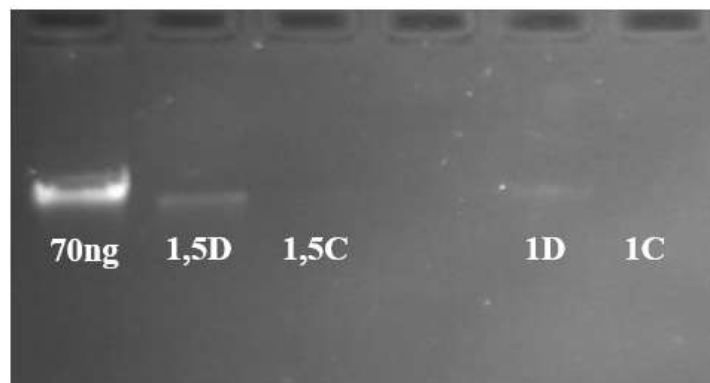
Fonte: produção própria.

Todas as amostras, exceto algumas amostras de heparina (-20C/60d e -20C/90d), resultaram em bandas claras sem contaminação de RNA ou microfragmentos da degradação do DNA, condições que formariam "bandas de esfregaço" ou linhas mais baixas do que o esperado.

5.2 Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para identificação individual equina

A dificuldade na visualização do DNA extraído do plasma no gel de agarose sugere que a concentração de material genético nessa matriz é extremamente baixa, possivelmente abaixo do limite de detecção da técnica. Diante desse resultado, foram testados dois volumes iniciais de amostras de soro para remoção: 1 mL e 1,5 mL, ambos obtidos por centrifugação e decantação (Figura 11). Essa abordagem visou avaliar se o aumento do volume de amostra poderia melhorar a recuperação do DNA e se o preparo do soro influencia na sua detecção e posterior utilização.

Figura 11- Gel agarose de gDNA para avaliação do volume inicial para extração. 1,5D: 1,5mL de soro decantado; 1,5C: 1,5mL de soro centrifugado; 1D: 1,0mL de soro decantado; 1C: 1,0mL de soro centrifugado.



Fonte: produção própria.

O fato de apenas o DNA extraído do soro por decantação ter sido detectável no gel, enquanto aqueles obtidos por centrifugação não apresentaram bandas visíveis, levanta a hipótese de que a principal fonte de DNA nessas amostras seja oriunda de leucócitos em suspensão, e não exclusivamente de DNA livre de células. Esse achado está em consonância com estudos que apontam que a maioria do DNA presente em fluidos biológicos pode ser derivado de células remanescentes do processo de separação da amostra, em vez de exclusivamente cfDNA (WIDSCHWENDTER et al, 2017). A análise quantitativa e qualitativa não foi possível devido sua baixa concentração

Para investigar a origem do DNA extraído, foram realizadas extrações a partir de amostras de soro submetidas a processos de filtragem e centrifugação. No entanto, devido à baixa concentração de DNA nas amostras, a detecção de material genético por eletroforese em gel de agarose não foi possível, uma vez que a visualização em gel exigia volumes muito

elevados de amostra. Diante disso, a amplificação por PCR tornou-se necessária para a posterior análise da presença e origem do DNA extraído, e determinação das melhores condições.

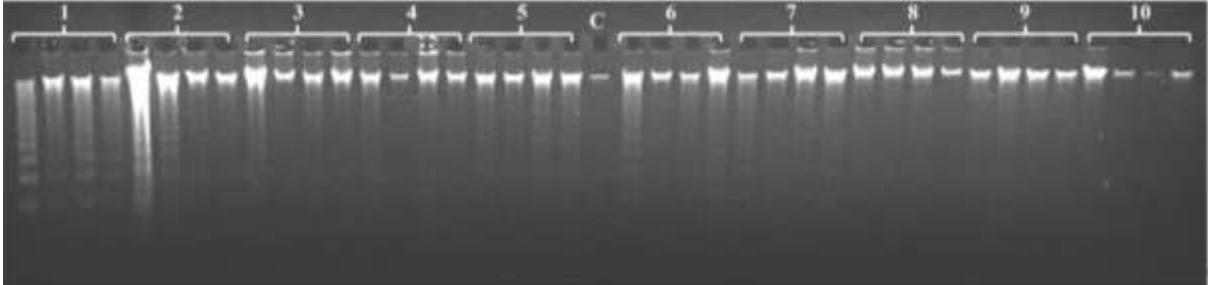
A partir dos resultados das amplificações bem-sucedidas, foram realizadas extrações a partir de amostras de 10 animais, para diferentes métodos de preparo do soro, tipos de tubos de coleta e protocolos de extração. As amostras que puderam ser avaliadas quanto a concentração e qualidade tanto pelo espectrofotômetro quanto pelo gel de agarose, foram as amostras de sangue e coágulo. A Tabela 6 mostra a quantificação realizada nas extrações de DNA a partir de amostras de coágulo dos 10 animais e na Figura 12 pode-se visualizar as amostras no gel.

Tabela 6- Quantificação das amostras de DNA extraídas de coágulo.

Amostra	ng/μL	260/280	Amostra	ng/μL	260/280
CV1 GC	138,95	1,86	CV6 GC	54,19	1,88
CV1 GD	95,44	1,87	CV6 GD	35,83	1,81
CV1 SC	77,47	1,87	CV6 SC	49,68	1,83
CV1 SD	145,40	1,88	CV6 SD	32,55	1,87
CV2 GC	128,64	1,86	CV7 GC	49,43	1,88
CV2 GD	99,82	1,85	CV7 GD	55,20	1,93
CV2 SC	83,24	1,85	CV7 SC	50,71	1,83
CV2 SD	92,24	1,87	CV7 SD	56,38	1,89
CV3 GC	103,25	1,88	CV8 GC	35,61	1,89
CV3 GD	450,48	1,88	CV8 GD	84,54	1,86
CV3 SC	89,27	1,89	CV8 SC	56,82	1,89
CV3 SD	63,53	1,93	CV8 SD	38,24	1,81
CV4 GC	69,97	1,90	CV9 GC	59,14	1,99
CV4 GD	18,73	1,85	CV9 GD	54,11	1,94
CV4 SC	30,82	1,92	CV9 SC	88,04	1,92
CV4 SD	28,28	1,87	CV9 SD	46,74	1,99
CV5 GC	312,22	1,87	CV10 GC	37,48	1,84
CV5 GD	126,63	1,88	CV10 GD	21,60	1,92
CV5 SC	69,10	1,88	CV10 SC	12,74	1,81
CV5 SD	69,49	1,88	CV10 SD	27,18	1,83

CV: Cavalo; GC: tubo com gel centrifugado; GD: tubo com gel decantado; SC: tubo siliconizado centrifugado; SD: tubo siliconizado decantado

Figura 12- Gel de agarose 1,5% para visualização da integridade das amostras de DNA genômico extraídas de coágulo. Números de 1 a 10 indicam a numeração dos animais. Sequência das amostras no gel para cada animal: GC, GD, SC e SD. C: Controle com 50 ng/μL.



Fonte: produção própria.

A média da quantificação do gDNA extraído das amostras de coágulo é de 81 ng/μL. Amostras que apresentaram concentrações superiores a esse intervalo tiveram sua quantificação superestimada devido à degradação do DNA, evidenciada na análise por eletroforese em gel (Figura 12). A extração de DNA em amostras de coágulo já é realizada, no entanto normalmente apresenta um baixo rendimento e qualidade (MARDAN-NIK et al, 2019). O método de extração Salting Out realizado nesse estudo, apesar da presença de fragmentação, resultou em amostras com bom rendimento e valores de OD 260/280 dentro do intervalo de referência.

5.3 Extração de DNA em amostras de soro e coágulo para detecção do provírus

Para a detecção de material genético do VAIE, foi realizada inicialmente a remoção de gDNA a partir de amostras de coágulo de animais soropositivos provenientes dos estados de Sergipe e Pernambuco. A identificação dos animais, bem como sua localização, o resultado do diagnóstico sorológico, a quantificação e qualidade da extração estão apresentados na Tabela 7 e Figura 13.

Tabela 7- Identificação, localização e resultado sorológico das amostras de coágulo para identificação do VAIE, e sua respectiva quantificação pelo espectrofotômetro.

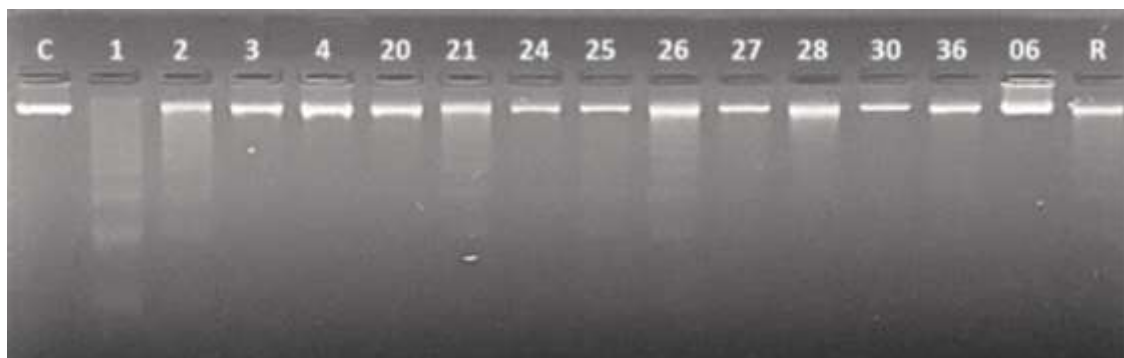
Amostra	Estado	Diagnóstico sorológico AIE*	ng/μL	260/280
Nº1	Sergipe	Positivo (FDAP)	57,56	1,89
Nº2	Sergipe	Positivo	137,45	1,89
Nº3	Sergipe	Negativo em foco	158,71	1,90
Nº4	Sergipe	Negativo em foco	132,77	1,89
Nº20	Sergipe	Positivo	184,43	1,93
Nº21	Sergipe	Positivo (FDAP)	83,07	1,85
Nº24	Sergipe	Positivo	25,11	1,97
Nº25	Sergipe	Positivo	85,55	1,86
Nº26	Sergipe	Positivo	301,37	1,90
Nº27	Sergipe	Positivo	79,49	1,88
Nº28	Sergipe	Positivo	172,46	1,91
Nº30	Sergipe	Negativo	56,32	1,88
JF 36	Pernambuco	Positivo	149,75	1,87
JF 06	Pernambuco	Positivo	45,61	1,86
Ros	Pernambuco	Positivo	75,54	1,96

*Os exames sorológicos foram realizados logo após a coleta em 2022.

FDAP: Filho de animal positivo

Negativo em foco: animais da mesma propriedade testaram positivo.

Figura 13- Gel agarose 1,5% do DNA genômico extraído das amostras de coágulo. C: controle com 50ng/ μ L.



Fonte: produção própria.

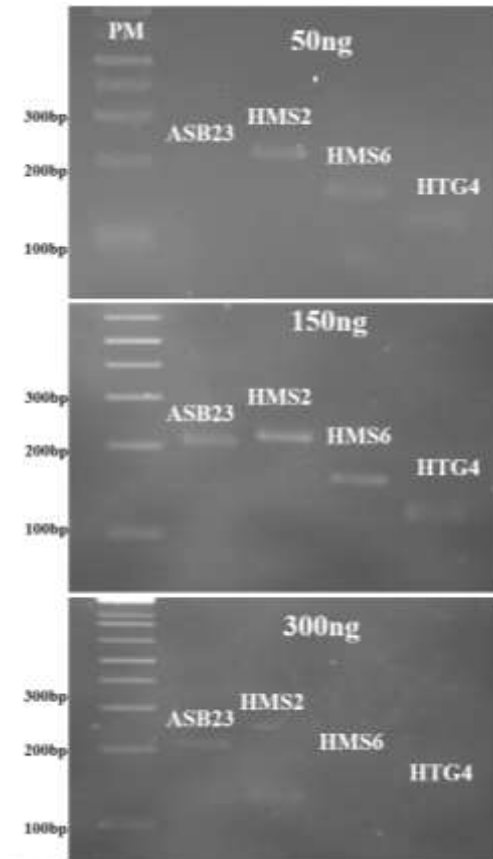
As amostras utilizadas para a extração de DNA e identificação molecular do VAIE em soro foram obtidas de animais soropositivos de diferentes estados. Cinco dessas amostras vieram em tubos de coleta siliconizado contendo tanto o soro quanto o coágulo, permitindo a quantificação do DNA extraído (50-70ng/ μ L). As demais amostras foram enviadas apenas em microtubos contendo diferentes volumes de soro, sem informações fornecidas sobre o método de preparo, como tipo de tubo de coleta utilizado ou processo de separação do soro.

5.4 Otimização da reação de polimerase em cadeia (PCR)

Para avaliar a viabilidade do soro e do coágulo na amplificação do DNA genômico e proviral, foi essencial melhorar o ensaio de PCR, garantindo parâmetros mais adequados, eliminando possíveis interferências dos demais fatores para análise exclusiva da amostra de DNA molde. Estudos destacam a importância da otimização da PCR, especialmente quando as amostras utilizadas não são convencionais e podem apresentar limitações relacionadas à concentração e qualidade do DNA (MCDOWELL et al, 1998; HUBÉ et al, 2005; OBRADOVIC et al, 2013;).

Para otimizar a PCR, foram realizados testes preliminares para determinar a melhor concentração de gDNA de sangue total, com os oligonucleotídeos selecionados, para posteriormente seguir as demais análises nas melhores condições (Figura 14).

Figura 14- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para avaliação da concentração de gDNA com os oligonucleotídeos ASB 23 (175-211 bp), HMS 2 (222-248 bp), HMS 6 (151-169 bp) e HTG4 (127-139 bp). PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).



Fonte: produção própria.

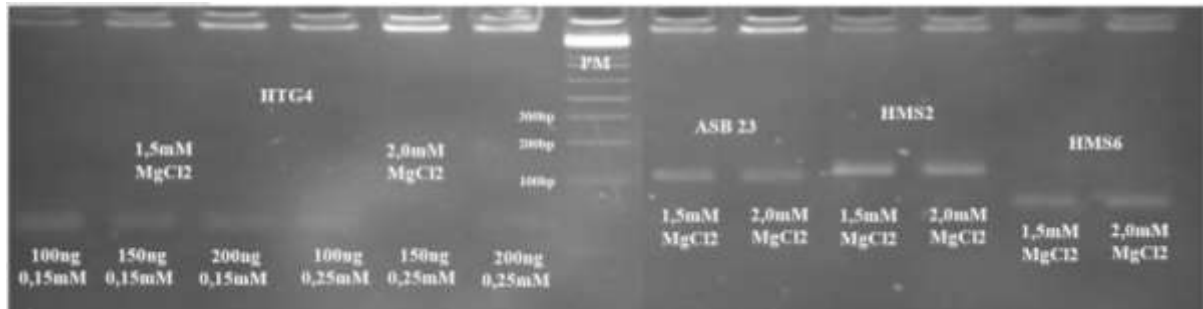
Os resultados mostraram que a concentração de 150 ng proporcionou uma melhor amplificação para todos os oligonucleotídeos testados. Em contrapartida, ao utilizar 300 ng de DNA, não foram observadas bandas nos géis de eletroforese, exceto no primer ASB23, indicando que DNA em excesso pode interferir negativamente na reação, possivelmente a maior presença de inibidores. Além disso, obteve-se a necessidade de otimização da concentração dos reagentes para alguns oligonucleotídeos, uma vez que bandas inespecíficas foram observadas com o primer HMS2 a 300 ng e o primer HTG4 apresentou uma banda mais fraca com os 150 ng de DNA em relação aos demais.

Inicialmente, a influência das concentrações de $MgCl_2$ e oligonucleotídeos foi avaliada utilizando o primer HTG4. Foram testadas duas condições: (I) 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,15 mM de primer com três concentrações de gDNA (100, 150 e 200 ng) e (II) 2,0 mM de $MgCl_2$ e 0,25 mM de primer com as mesmas quantidades de DNA. Em seguida, diferentes concentrações de

MgCl₂ (1,5 mM e 2,0 mM) foram testadas para os demais oligonucleotídeos usando 150ng de gDNA (Figura 15).

Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para análise da concentração de MgCl₂ dos 4 oligonucleotídeos e da concentração de primer e gDNA para HTG4.

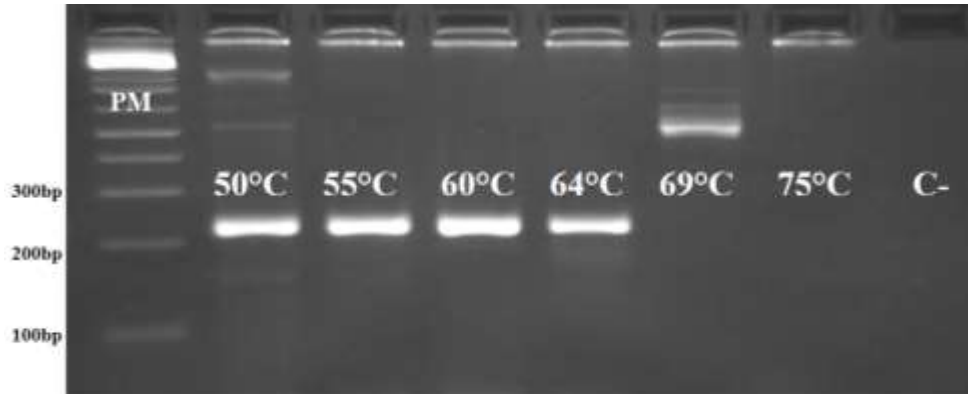
PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).



Fonte: produção própria.

Os melhores resultados foram obtidos com a combinação de 1,5 mM de MgCl₂ e 0,15 mM de primer. Ademais, pode-se visualizar que a concentração de 100ng de gDNA foi similar à de 150ng com HTG4. Levando em consideração que todos os testes anteriores foram realizados com temperatura de anelamento de 55°C, realizou-se um ensaio de gradiente térmico para otimização dessa variável (Figura 16). O primer HMS2 foi selecionado para esse teste, variando a temperatura de anelamento de 50°C a 75°C, uma vez que foi o que apresentou melhores resultados na análise supracitada, sendo então, o primer escolhido para seguir com as reações com gDNA de soro. O melhor resultado foi obtido a 60°C, indicando que essa condição é a mais adequada para amplificação.

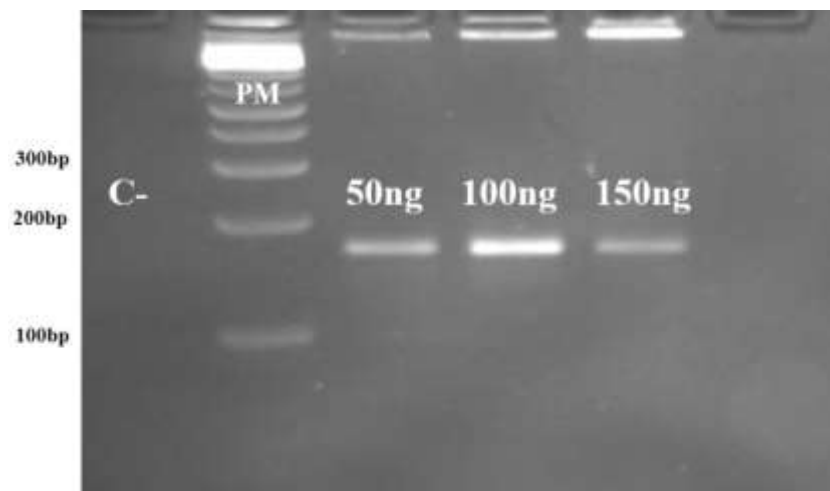
Figura 16- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para gradiente de temperatura de anelamento com o oligonucleotídeos HMS2 (222-248 bp), sendo C- o controle negativo com água MiliQ. PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).



Fonte: produção própria.

Após a definição das concentrações ideais de reagentes e da temperatura de anelamento, foi realizada uma nova análise para determinar a melhor concentração de gDNA. Considerando que, na otimização inicial com o primer HTG4, as concentrações de 100 e 150 não resultaram em diferença significativa na amplificação, novos testes foram conduzidos utilizando as melhores condições. Dessa vez, foram testadas concentrações de 50 ng, 100 ng e 150 ng de gDNA, utilizando o primer HMS6 (Figura 17), previamente identificado como um dos oligonucleotídeos com menor desempenho na primeira análise.

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados HMS 6 (151-169bp) para definição da concentração de gDNA. PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

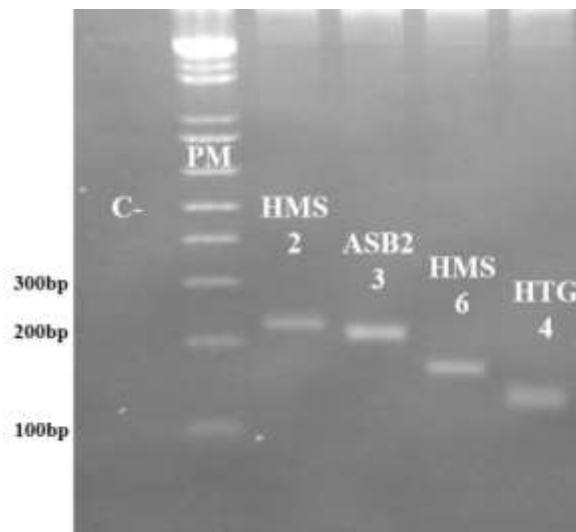


Fonte: produção própria.

Após a realização de todos os testes e análises, foi estabelecido as condições ideais para a amplificação do DNA utilizando os quatro pares de oligonucleotídeos de microssatélites

ASB23, HMS2, HMS6 e HTG4. A melhor amplificação foi obtida com temperatura de anelamento de 60°C, 100 ng/μL de gDNA, 0,15 mM de cada primer e 1,5 mM de MgCl₂, e essas condições foram aplicadas em uma reação usando o gDNA de sangue total com os 4 oligonucleotídeos (Figura 18).

Figura 18- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os 4 oligonucleotídeos após a otimização), sendo C- o controle negativo com água MiliQ. PM= peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

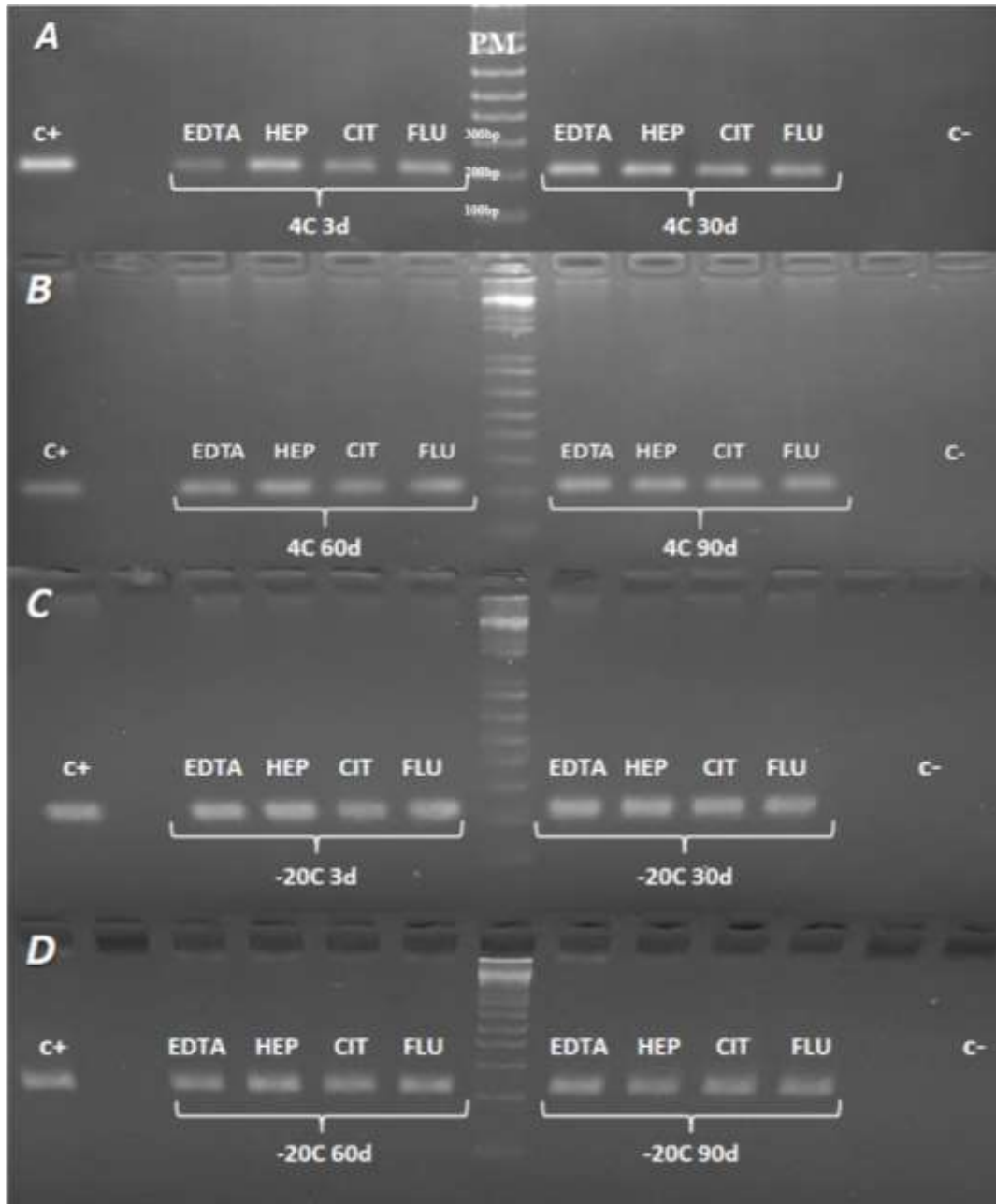


Fonte: produção própria.

5.5 Reação de polimerase em cadeia (PCR) para avaliar os anticoagulantes

O próximo passo foi avaliar a influência dos anticoagulantes no desempenho da amplificação e para isso, foi escolhido o primer que apresentou os melhores resultados na etapa anterior, ASB 23. Nessa nova abordagem, foram analisados os possíveis efeitos inibitórios dos anticoagulantes considerando também o tempo e o modo de armazenamento das amostras (Figura 19).

Figura 19- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com microssatélite ASB 23 (211 pb) produzidos a partir de DNA extraído com anticoagulantes distintos. A) 4C em 3d e 4C em 30d; B) 4C em 60d e 4C em 90d; C) -20C em 3d e -20C em 30d; D) -20 em 60d e -20C em 90d. EDTA; HEP (Heparina); CIT (Citrato); FLU (Fluoreto). MW (1Kb Plus Ladder). Controle positivo C+; controle negativo C- (PCR com água). PM=peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).



Fonte: produção própria.

Nenhuma das variáveis (anticoagulante, tempo e armazenamento) foi capaz de inibir a PCR, para ambos os grupos 4C e -20C. Apesar das variações na concentração de DNA observadas na Figura 10, isso não afetou substancialmente os resultados da PCR, uma vez que todos os fragmentos resultaram em bandas de intensidade semelhante, sem fragmentos

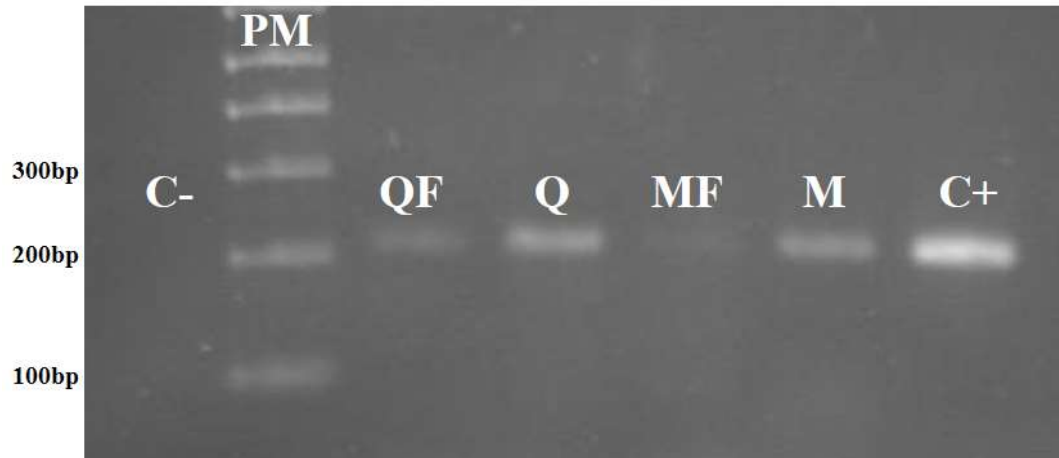
inespecíficos e/ou de produto de degradação. Considerando o efeito anticoagulante, as amostras armazenadas em EDTA obtiveram maiores concentrações que os demais, mas não interferiu na PCR. Esse achado corrobora a literatura, que afirma que o EDTA não modifica significativamente a concentração de DNA (KOTIKALAPUDI & PATEL, 2015), mas há carência de estudos comparando a qualidade e a quantidade de DNA extraído do sangue tratado com diversos anticoagulantes.

Na literatura, alguns estudos (YACOTA ET AL., 1999; PARDOE & MICHALAK, 1995; WANG et al., 1992; GARCÍA et al., 2002) relataram o efeito inibitório da heparina e do citrato de sódio na PCR, o que difere dos achados do nosso estudo. Por outro lado, nossos resultados estão de acordo com KOTIKALAPUDI & PATEL (2015) mostrando que a heparina não inibiu a PCR. O número reduzido de amostras e animais testados na análise da influência dos anticoagulantes, devido a limitações técnicas, é uma limitação deste estudo e pode reduzir sua abrangência. No entanto, os dados coletados ainda são uma fonte valiosa de informações a serem aplicadas ao uso clínico do sangue venoso como fonte de DNA de boa qualidade para análise molecular. O número reduzido de amostras e animais testados, devido a limitações técnicas, é uma limitação deste estudo e pode reduzir sua abrangência. No entanto, os dados coletados ainda são uma fonte valiosa de informações a serem aplicadas ao uso clínico do sangue venoso como fonte de DNA de qualidade satisfatória para análise molecular.

5.6 Reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação individual equina com amostras de soro e coágulo

Como a quantificação e a análise em gel do gDNA extraído de soro eram inviáveis devido a sua baixa concentração, a investigação da origem do DNA foi realizada por meio da amplificação por PCR e posterior visualização dos produtos em gel. O resultado da PCR da comparação do soro filtrado e não filtrado com a extração por colunas de sílica QIAGEN e extração magnética MagMAX está apresentado na Figura 20.

Figura 20- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com ASB23 (175-211pb) para avaliar o desempenho do cfDNA. C-: controle negativo (PCR com água); Q: soro não filtrado QIAGEN; M: soro não filtrado MagMAX; QF: soro filtrado QIAGEN; MF: soro filtrado MagMAX (M); C+: gDNA de sangue; MW (1Kb Plus Ladder).

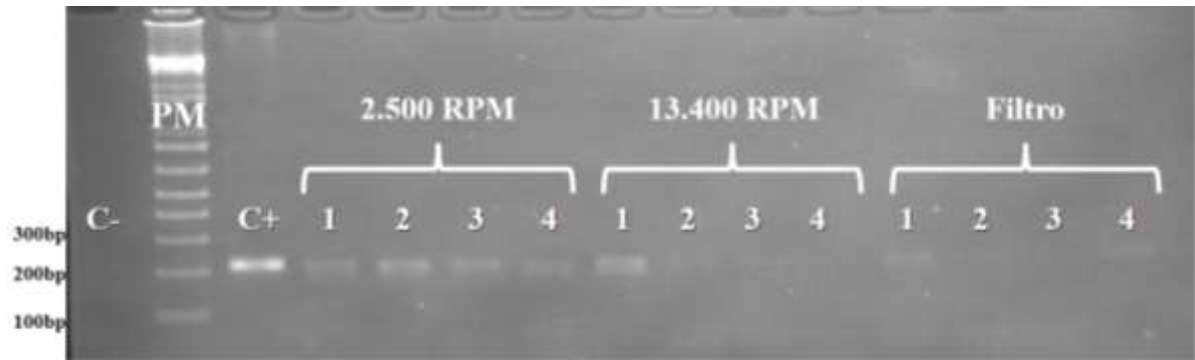


Fonte: produção própria.

O soro filtrado apresentou menor rendimento da amplificação do gDNA em comparação ao soro não filtrado. Além disso, a extração utilizando colunas QIAGEN teve um desempenho ligeiramente superior à extração magnética.

O experimento seguinte incluiu uma etapa de centrifugação em um número maior de amostras, para comprovar que a maior parte do gDNA extraído de soro provinha de células nucleadas (leucócitos) em suspensão (Figura 21). Todos extraídos por colunas QIAGEN.

Figura 21- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com ASB23 (175-211pb) para analisar a origem do DNA extraído. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-4: animais; 2.500 RPM: primeira alíquota do soro obtido por centrifugação para extração; 13.400 RPM: segunda alíquota do soro sobrenadante pós centrifugação; Filtro: terceira alíquota do soro sobrenadante filtrado.

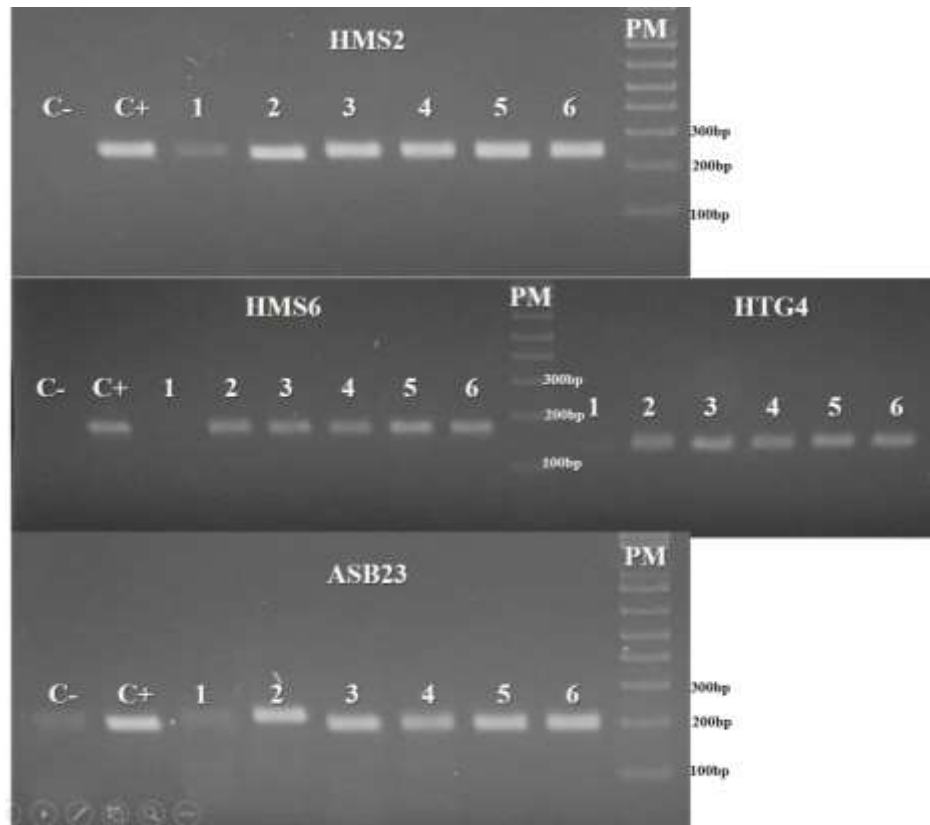


Fonte: produção própria.

Todas as alíquotas do sobrenadante da segunda centrifugação, assim como as amostras filtradas, obtiveram amplificação inferior em comparação com as primeiras alíquotas, confirmando que a maior parte do DNA extraído é provavelmente de origem leucocitária e não cfDNA. Estudos confirmam a presença de células em suspensão em fluidos corporais para maior recuperação de DNA (WIDSCHWENDTER et al, 2017). Considerando que a maior parte do material extraído era proveniente de células em suspensão, foi utilizado um método de concentração do soro. O aumento do volume inicial da amostra poderia resultar em uma maior quantidade de células em suspensão e, conseqüentemente, em um maior rendimento de DNA (ROCCHI et al, 2025). No entanto, os protocolos de extração possuem um limite máximo de volume recomendado, e a concentração do soro se mostrou uma estratégia eficaz para otimizar a recuperação do material genético dentro dessas restrições.

Com base nos resultados anteriores, o método de concentração foi aplicado a amostras de soro obtidas por decantação após 24 horas e 4 dias de separação. O gDNA extraído dessas amostras, bem como o coágulo correspondente, foi submetido à PCR utilizando os quatro oligonucleotídeos descritos na Tabela 1 (Figura 22).

Figura 22- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com HMS2 (222-248pb), HMS6 (151-169pb), HTG4 (127-139Bp) e ASB23 (175-211pb) para comparar o tempo de decantação do soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; MW (1Kb Plus Ladder); 1: soro decantado 4 dias; 2: soro decantado 24 horas QIAGEN; 3: soro decantado 24 horas Salting out, 4: soro decantado 24 horas MagMAX; 5: coágulo 4 dias; 6: coágulo 24 horas

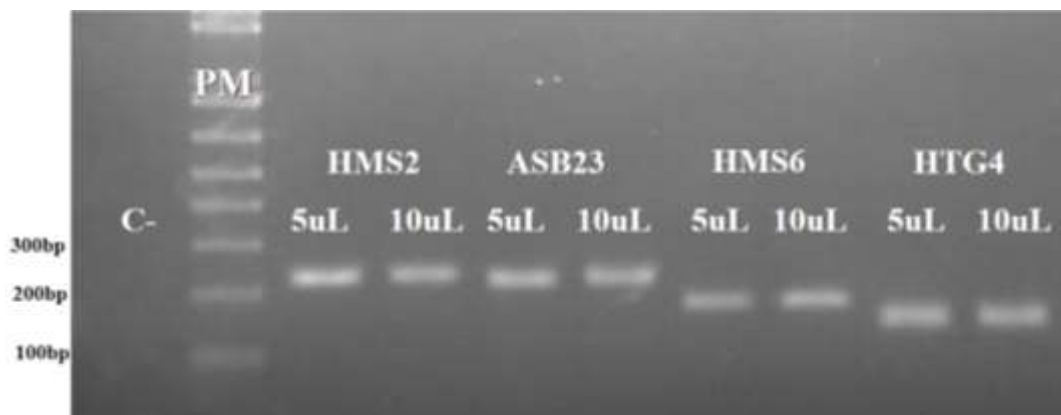


Fonte: produção própria.

Observa-se que apesar de ter sido possível a recuperação de DNA em amostras decantadas por 4 dias, a concentração de DNA resultou em amplificações fracas. Em contrapartida, o soro obtido por decantação em 24 horas, independentemente do método de extração, amplificou de forma similar aos gDNAs extraídos de coágulo e de sangue total, o quais são amostras mais concentradas, demonstrando que o soro é uma amostra viável para extração de DNA e amplificação por PCR. Esses achados estão em concordância com a literatura (CROFT et al, 2008), onde foi avaliado o desempenho do gDNA amplificado do genoma completo derivado de soro e plasma armazenado, utilizando matrizes de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de alta densidade. Ademais outros estudos reforçam a estabilidade do DNA presente no soro para análises genéticas (ROMO-SÁENZ et al, 2021; KO et al, 2024; ROCCHI et al, 2025).

Como as amostras de DNA de soro não puderam ser quantificadas, estava sendo usado o volume de 15µL no ensaio de PCR. Considerando a qualidade dos fragmentos resultantes do teste anterior, foi testado um volume menor de 5 e 10µL de soro com os 4 oligonucleotídeos (Figura 23). Como a amplificação foi semelhante entre os volumes de 5 e 10 µL, optou-se por utilizar o menor volume nas demais reações de PCR.

Figura 23- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados para selecionar a quantidade de gDNA extraído de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder).

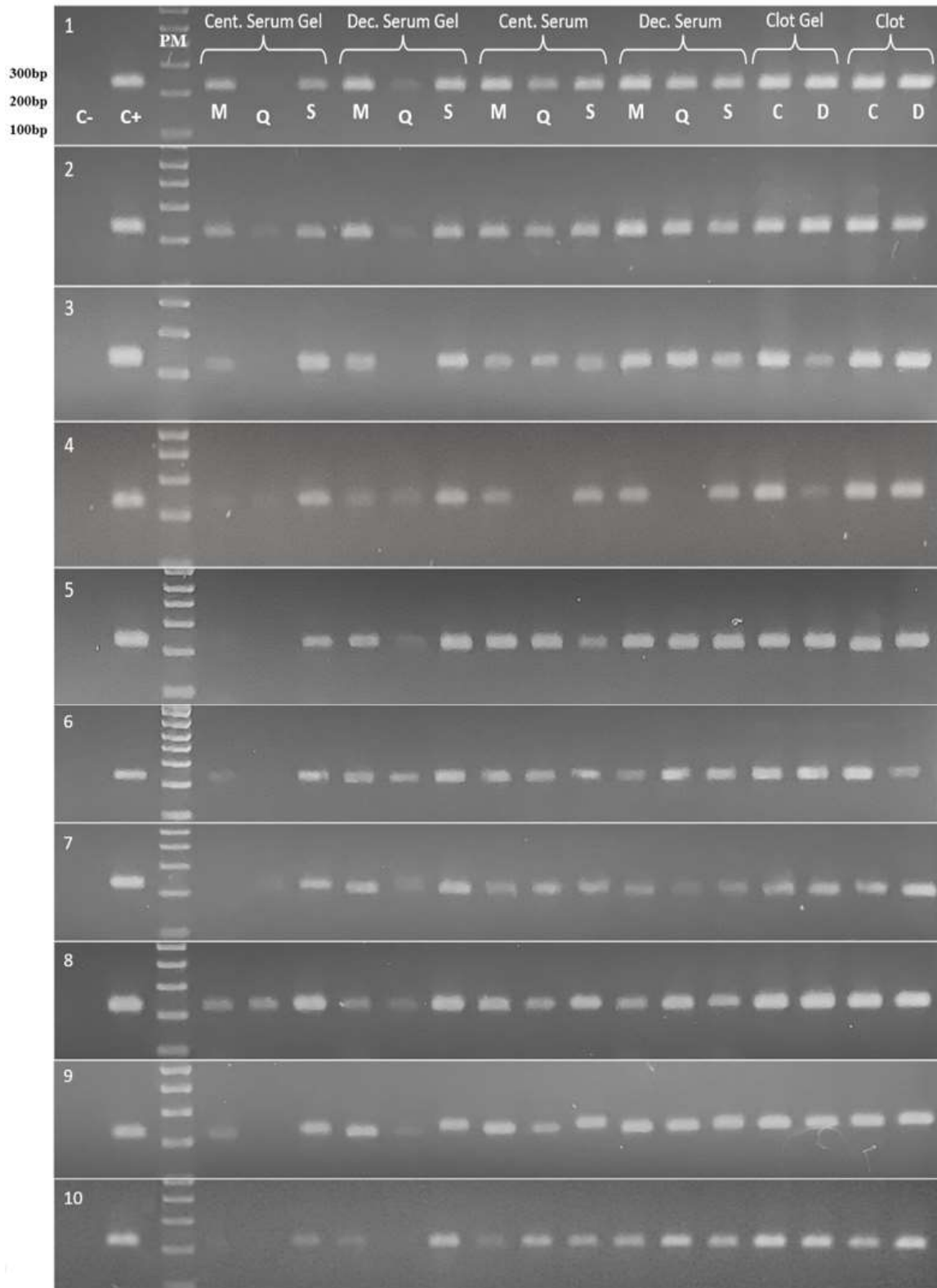


Fonte: produção própria.

Após a padronização das amplificações por PCR, amostras de 10 animais foram utilizadas para validar os protocolos de extração e o uso de soro e coágulo para obtenção de gDNA viável para genotipagem. Para isso, foram avaliadas quatro variações: o tipo de tubo de coleta (siliconizado ou com separador de gel), o método de preparação da amostra (centrifugação ou decantação), o método de extração (colunas de sílica, extração magnética ou salting out) e o tipo de amostra inicial (soro ou coágulo). Como um dos objetivos do trabalho era validar o uso de amostras de soro submetidas a testes oficiais para AIE, para genotipagem, foram testadas essas variações para obtenção da amostra, visto que os laboratórios que realizam os testes sorológicos, não recebem de forma padronizada, podendo ser em diferentes tubos de coleta, ou até mesmo em microtubos em diferentes volumes, e amostras de soro obtidos por separação espontânea ou por centrifugação

Os resultados das reações de PCR dos 10 animais estão na Figura 24 e a taxa de eficiência da amplificação considerando diferentes variáveis, estão dispostas em porcentagem na Tabela 8.

Figura 24- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com HMS2 (222-248pb) para validar o uso de soro e coágulo para genotipagem . C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-10: animais; M: extração MagMAX; Q: extração por colunas QIAGEN; S: Salting Out; C: tubo centrifugado; D: tubo decantado



Fonte: produção própria.

Tabela 8- Dados brutos e porcentagem de eficiência das amplificações por PCR em amostras de soro e coágulo com diferentes condições de preparo de amostra, tubo de coleta e método de extração.

Amostra	Preparo	Tubo de coleta	Extração	Total de amostras	Amostras amplificadas	Taxa de amplificação
Soro	Centrifugado	Gel	MgMAX	10	6	60%
Soro	Decantado	Gel	MgMAX	10	10	100%
Soro	Centrifugado	Siliconizado	MgMAX	10	10	100%
Soro	Decantado	Siliconizado	MgMAX	10	10	100%
Soro	Centrifugado	Gel	QIAGEN	10	2	20%
Soro	Decantado	Gel	QIAGEN	10	7	70%
Soro	Centrifugado	Siliconizado	QIAGEN	10	9	90%
Soro	Decantado	Siliconizado	QIAGEN	10	9	90%
Soro	Centrifugado	Gel	Salt. Out	10	10	100%
Soro	Decantado	Gel	Salt. Out	10	10	100%
Soro	Centrifugado	Siliconizado	Salt. Out	10	10	100%
Soro	Decantado	Siliconizado	Salt. Out	10	10	100%
Coágulo	Centrifugado	Gel	Salt. Out	10	10	100%
Coágulo	Decantado	Gel	Salt. Out	10	10	100%
Coágulo	Centrifugado	Siliconizado	Salt. Out	10	10	100%
Coágulo	Decantado	Siliconizado	Salt. Out	10	10	100%

Para análise estatística esses dados foram condensados de forma que a comparação fosse de acordo com cada variável relacionada ao soro (Centrifugado vs Decantado; Gel vs Siliconizado; MagMAX vs QIAGEN vs Salting Out). A análise estatística pelo teste Qui-quadrado revelou uma associação significativa entre o método de extração e a taxa de amplificação das amostras ($p < 0,001$). O método Salting Out apresentou a maior taxa de amplificação (100%), seguida pelo MagMAX (90%), enquanto o QIAGEN demonstrou o menor rendimento, com apenas 67,5% das amostras amplificadas. Esses resultados indicam que o método de extração de DNA influenciou diretamente o sucesso da amplificação por PCR, e que o método Salting Out, apesar de geralmente apresentar problemas com a pureza da amostra (DABROWSKI et al, 2024) foi o mais eficiente. O método magnético apresentou resultados satisfatórios e superiores aos do método por colunas de sílica, que também está em concordância com a literatura (BERENSEMEIER, 2006; SORBER et al, 2017; DABROWSKI et al, 2024).

Além disso, a comparação entre os tipos de tubos de coleta também demonstrou uma associação significativa com a taxa de amplificação ($p < 0,001$). Amostras coletadas em tubos siliconizados apresentaram uma taxa de amplificação significativamente maior (95%) em comparação às obtidas em tubos com separador de gel (62,5%). Esses achados sugerem que o

uso do tubo siliconizado favorece a preservação do DNA, resultando em maiores taxas de amplificação.

Por fim, uma comparação entre os métodos de preparo do soro revelou uma diferença estatisticamente significativa nas taxas de amplificação ($p = 0,002$). O soro decantado apresentou uma taxa de amplificação superior (96,67%) em relação ao soro centrifugado (78,3%). Esses resultados indicam que a decantação pode ser mais eficiente para a obtenção de gDNA viável para amplificação, possivelmente devido à maior preservação do material genético em suspensão (WIDSCHWENDTER et al, 2017; ROCCHI et al, 2025), enquanto a centrifugação pode levar à perda de gDNA livre ou associado às células.

A verificação da viabilidade do uso dessas amostras para genotipagem foi realizada por dois laboratórios. As amostras enviadas ao Laboratório Allele incluíram: Soro Decantado Siliconizado extraído pelos métodos Salting Out e MagMAX, Coágulo Centrifugado Siliconizado e Decantado Salting Out e sangue total do mesmo animal (Figura 25).

Figura 25 - Resultado da genotipagem do Laboratório Allele.

Locus	Soro Decant. Siliconizado Salting Out		Soro Decant. Siliconizado MagMAX		Coág.Centrif. Siliconizado Salting Out		Coág.Decant. Siliconizado Salting Out		Sangue total	
	Animal [EQ22.ES0050]		Animal [EQ22.ES0050]		Animal [EQ22.ES0050]		Animal [EQ22.ES0050]		Animal [EQ22.ES0050]	
VHL 20	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
HTG4	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
AHT4	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
HMS7	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
HTG6	J	O	J	O	J	O	J	O	J	O
AHT5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
HMS6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ASB23	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L
ASB2	J	N	J	N	J	N	J	N	J	N
HMS5	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
HTG7	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
HTG10	K	O	K	O	K	O	K	O	K	O
HMS2	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
HMS3	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
ASB17	H	Q	H	Q	H	Q	H	Q	H	Q
LEX3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
HMS1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
CA425	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Resultado: Perfil Genético

As opiniões e interpretações expressas abaixo não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório:

Interpretação: O animal é portador do perfil genético acima.
O símbolo * (asterisco) indica regiões onde não houve amplificação.

Esse laudo não tem validade para fins de registro sob o controle do MAPA.

Fonte: produção própria.

Para o Laboratório Raça, foram enviadas apenas as amostras de Soro e Coágulo Decantado Siliconizado Salting Out e sangue total (Figura 26)

Figura 26- Resultado da genotipagem do Laboratório Raça.

Soro Decant. Siliconizado Salting Out

RESULTADO OBTIDO																			
	AHT4	AHT5	ASB2	ASB17	ASB21	CA425	HMS1	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG6	HTG7	HTG10	LEX3	VHL20	TKY287	TKY294
AMOSTRA1	H	O	L	H	K	N	M	L	P	P	O	L	J	O	K	L	N	R	O
	H	O	N	O	L	N	M	R	R	P	O	L	O	O	O	L	S	R	P
	TKY297	TKY301	TKY312	TKY321	TKY325	TKY332	TKY337	TKY341	TKY343	TKY344	TKY374	TKY394							
AMOSTRA1	M	N	I	O	O	J	M	J	M	I	L	J							
	O	N	I	R	O	O	O	K	M	O	O	O							

Coág. Decant. Siliconizado Salting Out

RESULTADO OBTIDO																			
	AHT4	AHT5	ASB2	ASB17	ASB21	CA425	HMS1	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG6	HTG7	HTG10	LEX3	VHL20	TKY287	TKY294
AMOSTRA2	H	O	L	H	K	N	M	L	P	P	O	L	J	O	K	L	N	R	O
	H	O	M	O	L	N	M	R	R	P	O	L	O	O	O	L	S	R	P
	TKY297	TKY301	TKY312	TKY321	TKY325	TKY332	TKY337	TKY341	TKY343	TKY344	TKY374	TKY394							
AMOSTRA2	M	N	I	O	O	J	M	J	M	I	L	J							
	O	N	I	R	O	O	O	K	M	O	O	O							

Sangue total

RESULTADO OBTIDO																			
	AHT4	AHT5	ASB2	ASB17	ASB21	CA425	HMS1	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG6	HTG7	HTG10	LEX3	VHL20	TKY287	TKY294
AMOSTRA4	H	O	L	H	K	N	M	L	P	P	O	L	J	O	K	L	N	R	O
	H	O	N	O	L	N	M	R	R	P	O	L	O	O	O	L	S	R	P
	TKY297	TKY301	TKY312	TKY321	TKY325	TKY332	TKY337	TKY341	TKY343	TKY344	TKY374	TKY394							
AMOSTRA4	M	N	I	O	O	J	M	J	M	I	L	J							
	O	N	I	R	O	O	O	K	M	O	O	O							

Fonte: produção própria.

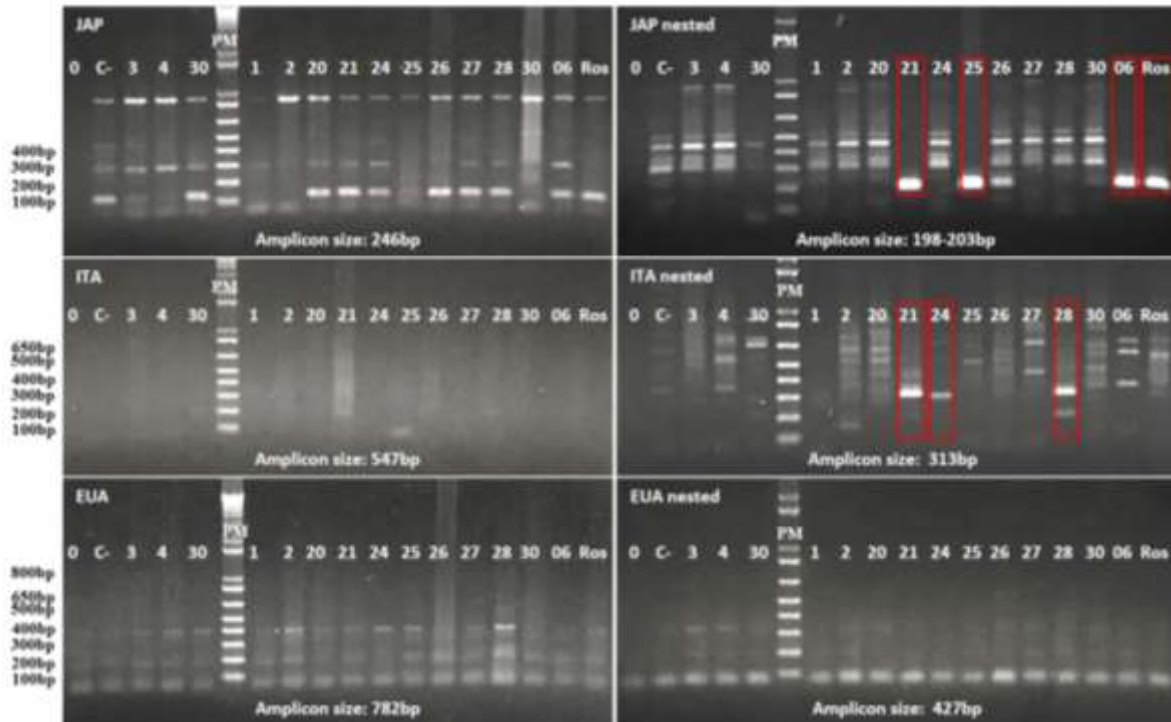
De acordo com os relatórios gerados, todas as amostras foram processadas e lidas da mesma forma que as amostras-controle dos laboratórios e apresentaram qualidade de resultados equivalentes, validando o uso de soro e coágulo como fonte de DNA para identificação individual.

5.7 Reação de polimerase em cadeia nested (nPCR) para detecção do provírus

Para a amplificação do DNA proviral do VAIE foram usadas amostras de gDNA extraídas de coágulo e de soro. Inicialmente, foram testadas amostras de coágulo de animais soropositivos e soronegativos dos estados de Sergipe e Pernambuco, as quais tiveram o DNA quantificado e seguiram para a reação com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2 e estão dispostos na Figura 27.

Figura 27- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos JAP, nJAP, ITA, nITA, EUA e nEUA para validar o uso de coágulo para detecção molecular do VAIE. 0:(PCR com água); C-: controle negativo; 3,4 e 30: animais soronegativos para AIE; 1, 2, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 06, Ros: animais soropositivos para AIE; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder).

Destacado em vermelho os amplicons com PM esperado.



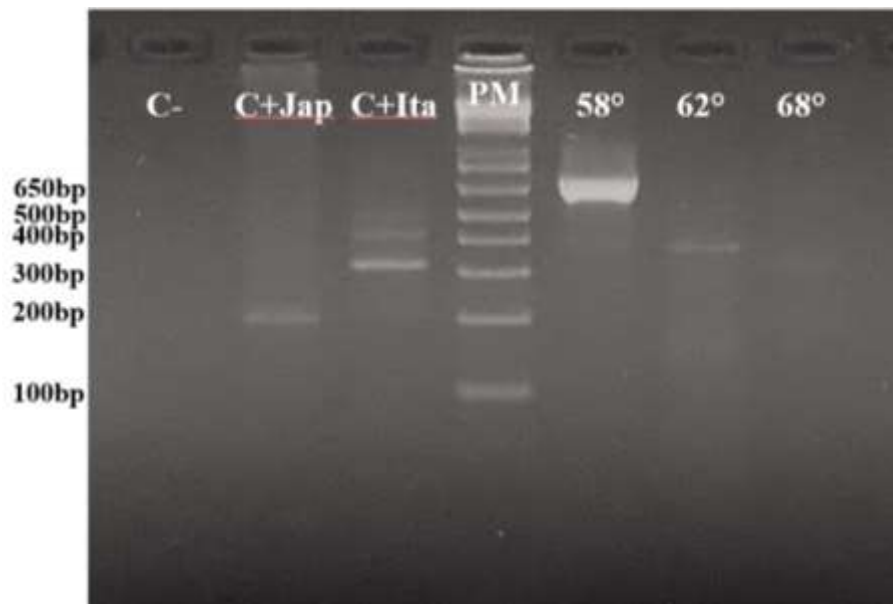
Fonte: produção própria.

Apesar de nenhuma amostra ter amplificado com o fragmento do tamanho esperado na primeira reação, 7 amostras amplificaram na nPCR, sendo 4 com os oligonucleotídeos nJAP (animal 21, 25, 06 e Ros) e 3 com os oligonucleotídeos nITA (Animal 21, 24 e 28). Para a detecção do DNA proviral, a escolha da amostra para extração do DNA não foi o único desafio. Devido à alta variabilidade genética do vírus, não existe um primer universal capaz de amplificar todas as cepas circulantes. Dessa forma, os resultados negativos observados nas reações de PCR poderiam estar relacionados à falta de identidade entre os oligonucleotídeos e as cepas presentes nas amostras, em vez de refletirem uma limitação da amostra utilizada para extração do material genético. Para minimizar esse problema, foram selecionados três conjuntos de oligonucleotídeos previamente utilizados na detecção do provírus em cepas brasileiras, e ainda assim tiveram amostras que não amplificaram (OAKS et al, 1998; CAPELLI et al, 2011; SANTOS et al, 2011; DONG et al, 2012; MALOSSI et al, 2020).

Tendo em vista que a amostra do animal 21 amplificou com os dois conjuntos de primer, foi testado uma combinação do primer forward JAP e nJAP com o reverse ITA e nITA gerando

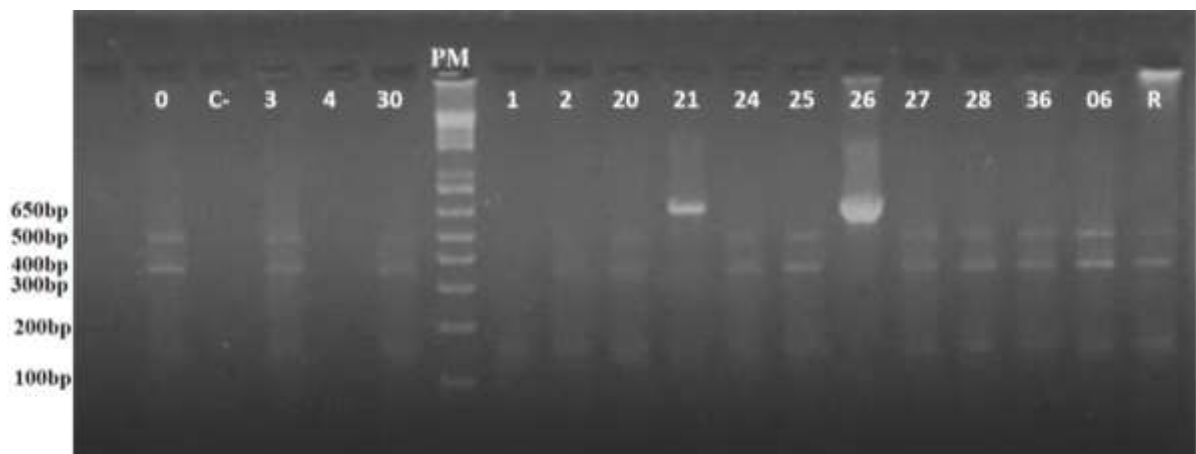
um fragmento de aproximadamente 630pb. A otimização da temperatura de anelamento desses oligonucleotídeos e o resultado da amplificação das 15 amostras estão nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

Figura 28- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos FWD nJAP e REV nITA (630pb) para otimização da temperatura de anelamento. C-: controle negativo (PCR com água); C+ Jap: gDNA n°21 com os oligonucleotídeos nJAP; C- Ita: gDNA 21 com os oligonucleotídeos nITA; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder).



Fonte: produção própria.

Figura 29- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos FWD nJAP e VER nITA (630pb) para validar o uso de coágulo para detecção molecular do VAIE. 0:(PCR com água); C-: controle negativo; 3,4 e 30: animais soronegativos para AIE; 1, 2, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 06, Ros: animais soropositivos para AIE; PM: Peso (1Kb Plus Ladder).



Fonte: produção própria.

A temperatura de anelamento que gerou o fragmento esperado foi de 58°C, a mesma utilizada para os oligonucleotídeos de JAP e nJAP. Entre as 15 amostras testadas, duas foram amplificadas, incluindo a do animal n°26, que não havia amplificado anteriormente. Esse resultado sugere que esse conjunto de oligonucleotídeos pode ser uma alternativa viável, permitindo a detecção de amostras que não foram amplificadas com os oligonucleotídeos anteriores.

Devido à intensa hemólise, o soro das amostras usadas para extração de DNA de coágulo de animais soropositivos e soronegativos de Sergipe e Pernambuco, não pôde ser utilizado. Para a detecção de provírus em amostras de soro, optou-se pela remoção de gDNA utilizando o método Salting Out de amostras frescas de soro de animais soropositivos de outros estados brasileiros., que apresentou maior eficiência. A qualidade da extração foi inicialmente avaliada por meio da amplificação das 35 amostras de gDNA de soro e 5 de coágulo, cedidas pelo laboratório Santé, com os oligonucleotídeos HMS2. Essa amplificação foi utilizada como controle positivo, já que todos os animais possuem uma sequência complementar a esses oligonucleotídeos. Esse teste permitiu verificar a presença de gDNA em quantidade suficiente e com capacidade de amplificação, uma vez que amostras de soro não puderam ser quantificadas por espectrofotometria (Figura 30)

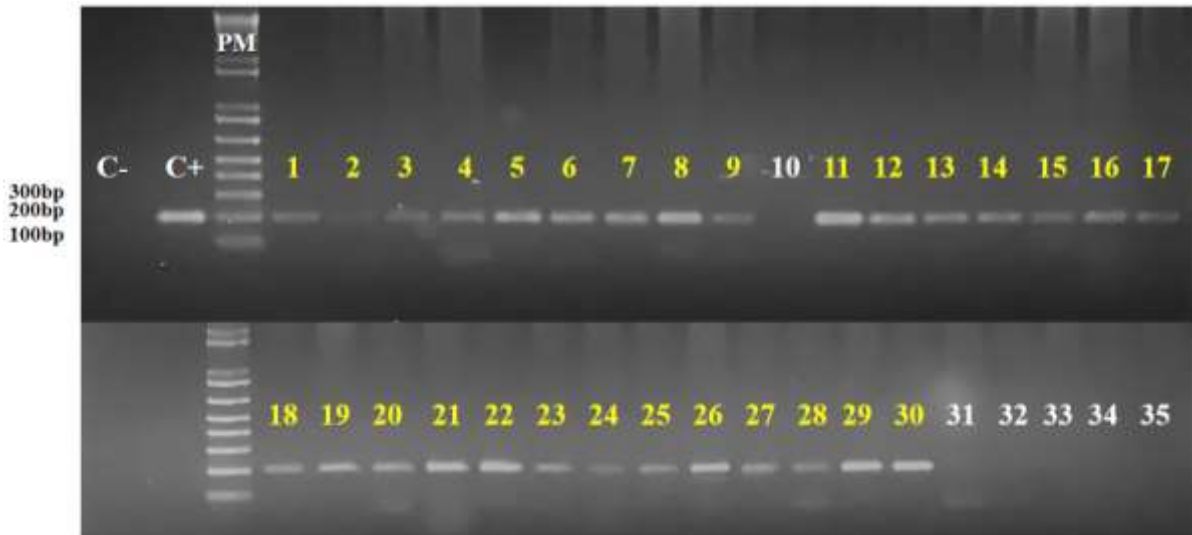
Figura 30- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos HMS2 (222-248 bp) para confirmação de presença de gDNA extraído. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA de sangue; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-35: amostras de soro; 1c, 32c, 33c, 34c e 35c: amostras de coágulo.



Fonte: produção própria.

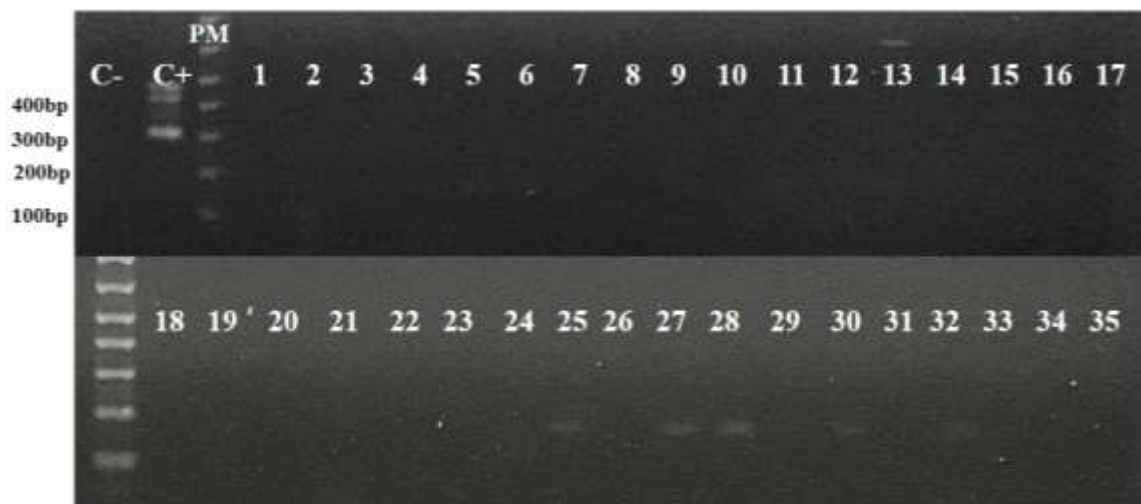
Todas as amostras extraídas de soro amplificaram com o primer controle, podendo assim dar continuidade para amplificação com os oligonucleotídeos direcionados ao provírus nJAP, nITA, nEUA e nLG (Figuras 31, 32, 33 e 34, respectivamente).

Figura 31- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nJAP (203 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal n°21; PM: PESO MOLECULAR (1Kb Plus Ladder);1-35: amostras de animais soropositivos.



Fonte: produção própria.

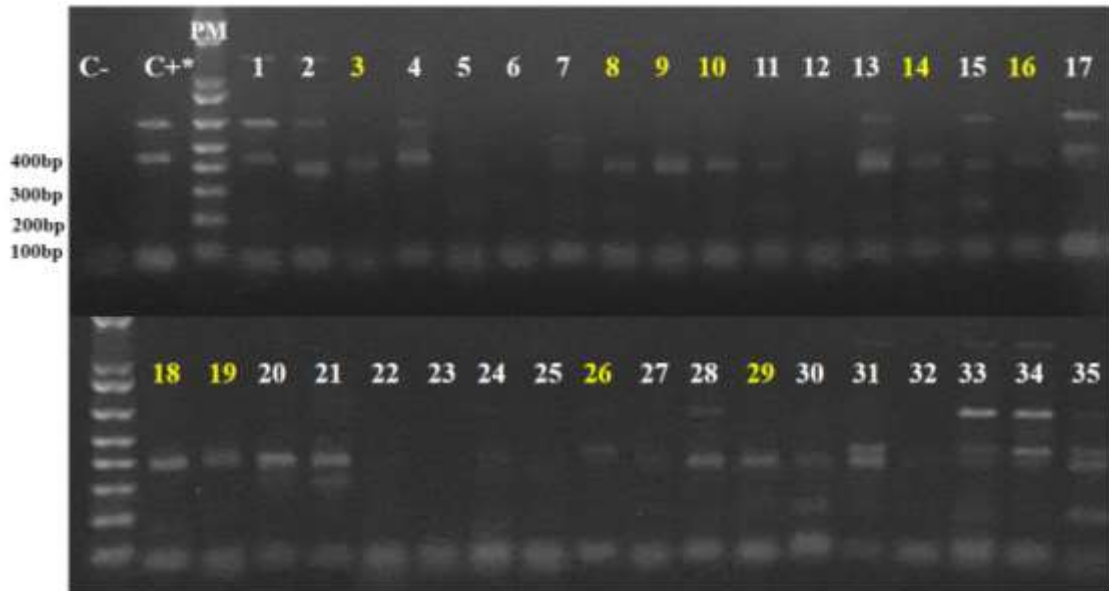
Figura 32- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nITA (313 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal n°21; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder);1-35: amostras de animais soropositivos.



Fonte: produção própria.

Figura 33- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nEUA (427 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro.

C-: controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal n°21; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-35: amostras de animais soropositivos.

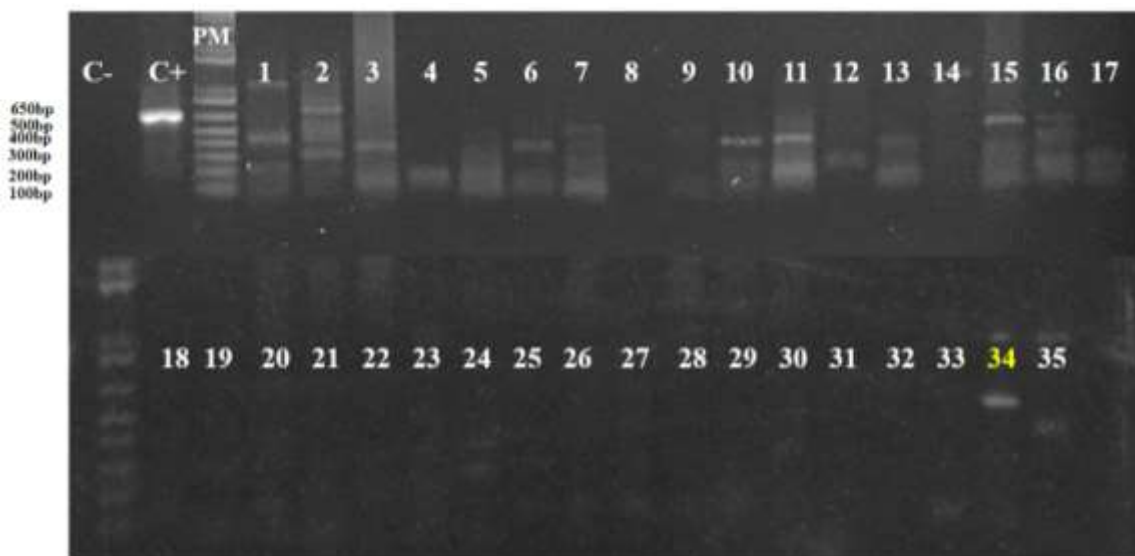


Fonte: produção própria.

C+*: gDNA de animal positivo para outros oligonucleotídeos.

Figura 34- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos nLG (630 bp) para detecção molecular do Vírus da Anemia Infecçiosa Equina em amostras de soro. C-:

controle negativo (PCR com água); C+: gDNA do animal n°21; PM: peso molecular (1Kb Plus Ladder); 1-35: amostras de animais soropositivos.



Fonte: produção própria.

As amostras consideradas positivas foram aquelas que amplificaram apenas o fragmento do tamanho esperado, sem bandas inespecíficas, destacadas nas imagens em amarelo. Os resultados indicaram 28 amostras positivas para o primer nJAP, nenhuma para nITA, 10 para nEUA e 1 positiva para nLG. A análise estatística pelo teste qui-quadrado revelou uma associação significativa entre os diferentes conjuntos de oligonucleotídeos testados (nJAP, nITA, nEUA e nLG) e as taxas de amplificação. O primer nJAP apresentou maior taxa de amplificação (80%), enquanto nITA não amplificou nenhuma amostra (0%). Já os oligonucleotídeos nEUA e nLG resultaram em taxas de amplificação significativamente menores, com 28,57% e 2,88%, respectivamente. Esses resultados indicam que a escolha do primer influencia diretamente a eficiência da amplificação, com nJAP demonstrando o melhor desempenho para detecção de provírus circulante no Brasil nas condições testadas. A identificação, localização dos animais e resultados das amplificações do provírus em amostras de soro estão dispostas na Tabela 9. Os animais da mesma propriedade estão agrupados em destaques da mesma cor.

Tabela 9- Identificação e localização das amostras dos animais soropositivos e os resultados para detecção do DNA proviral. Os estados destacados em diferentes cores indicam animais da mesma propriedade.

Amostra	Estado*	nJAP	nITA	nLG	nEUA
1	Mato Grosso	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
2	Tocantins	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Tocantins	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
4	Tocantins	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
5	Amapá	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
6	Amapá	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
7	Amapá	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
8	Amapá	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
9	Amapá	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
10	Mato Grosso	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
11	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
12	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
13	Tocantins	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
14	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>

Amostra	Estado	nJAP	nITA	nLG	nEUA
15	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
16	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
17	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
18	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
19	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
20	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
21	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
22	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
23	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
24	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
25	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
26	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
27	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
28	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
29	Pará	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>
30	Roraima	<i>Positivo</i>	Negativo	Negativo	Negativo
31	Mato Grosso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32	Mato Grosso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33	Mato Grosso	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34	Brasília	Negativo	Negativo	<i>Positivo</i>	Negativo
35	Pará	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

*Amostras com o destaque do estado da mesma cor são animais da mesma propriedade.

Como esperado, alguns animais soropositivos não apresentaram amplificação, o que pode estar associado à variabilidade genética do vírus e à incompatibilidade com os oligonucleotídeos utilizados. O agrupamento dos animais da mesma propriedade (Tabela 9) é essencial para a interpretação das amplificações entre os animais de uma mesma propriedade e a variação possível da cepa viral, uma vez que a ausência de amplificação foi observada até mesmo em animais da mesma propriedade e de regiões próximas, sugerindo a circulação de diferentes cepas virais dentro de uma mesma área, o que está em concordância com outros estudos (LEROUX et al., 2004; CAPOMACCIO et al., 2012; COOK et al., 2013; WANG et al., 2018b; CURSINO et al., 2020; JARA, FRIAS-DE-DIEGO; MACHADO, 2020; MALOSSI et al., 2020; ZHANG et al., 2024). Esses resultados reforçam a necessidade de uma investigação

mais detalhada sobre a variação genética das cepas de vírus AIE circulantes no Brasil, análise que foge ao escopo desse estudo.

5.8 Clonagem de DNA proviral e sequenciamento

Os fragmentos enviados para sequenciamento incluíram dois clones das amostras extraídas do coágulo dos animais n° 21, 25, 06 e Ros amplificadas com o primer nJAP; dois clones da amostra de coágulo do animal n° 28 amplificada com o primer nITA; e o produto de PCR do animal 21 amplificado com o primer nLG, das amostras de gDNA extraídas de coágulo. As sequências foram comparadas a bancos de dados de referência utilizando a ferramenta BLASTn e a análise revelou alta identidade com sequências anteriormente descritas para o VAIE. Uma análise de similaridade revelou que as sequências amplificadas com o primer nJAP variaram entre 95,02% e 97,51% com a cepa do vírus POCONE-BRA2, publicado em um estudo anterior (MALOSSI, et al., 2020) (Figura 35). A sequência obtida com o primer nITA demonstrou 84,39% de similaridade com o VAIE clone 5, correspondente ao gene da proteína gag (ZHANG et al, 1999) (Figura 36). Já a amostra do animal 21 amplificada com o primer nLG apresentou 89,88% de identidade com a cepa POCONE-BRA1 (MALOSSI et al, 2020) (Figura 37). A amostra n°21, quando amplificada com o primer nJAP, atingiu 97,51% de similaridade com a cepa POCONE-BRA2. Esses resultados evidenciam a alta variabilidade genética do VAIE em diferentes regiões do seu genoma, demonstrando diferentes níveis de conservação genética para cada região do genoma viral. Entretanto, as amostras que amplificaram com o mesmo primer possuem similaridade com a mesma cepa variando em menos de 5% (ZHANG et al, 1999; MALOSSI et al, 2020).

Figura 35- Resultados do BLASTn realizado com os fragmentos amplificados por nJAP.

21J cl.1		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	342	450	100%	9e-90	97.51%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	316	417	100%	5e-82	95.48%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	292	292	99%	9e-75	93.52%	198	MF540756.1
21J cl.2		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	342	450	100%	9e-90	97.51%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	316	417	100%	5e-82	95.48%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	292	292	99%	9e-75	93.52%	198	MF540756.1
25J cl.1		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	337	450	100%	4e-88	97.01%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	316	417	100%	5e-82	95.48%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	287	287	99%	4e-73	93.03%	198	MF540756.1
25J cl.2		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	337	450	100%	4e-88	97.01%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	316	417	100%	5e-82	95.48%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	287	287	99%	4e-73	93.03%	198	MF540756.1
6J cl.1		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	313	426	100%	7e-81	95.02%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	300	406	100%	5e-77	93.97%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	270	270	100%	4e-68	91.22%	202	MF540751.1
6J cl.2		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	313	426	100%	7e-81	95.02%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	300	406	100%	5e-77	93.97%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	270	270	100%	4e-68	91.22%	202	MF540751.1
RosJ cl.1		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	313	426	100%	7e-81	95.02%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	294	395	100%	2e-75	93.47%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	276	276	99%	9e-70	92.04%	198	MF540756.1
RosJ cl.2		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA2_complete genome	Equine infectious...	313	426	100%	7e-81	95.02%	7968	MF060371.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain FOCONE-BRA1_complete genome	Equine infectious...	294	395	100%	2e-75	93.47%	8016	MF060370.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate ID22 lat protein (lat) gene, partial cds	Equine infectious...	276	276	99%	9e-70	92.04%	198	MF540756.1

Fonte: produção própria.

Figura 36- Resultados do BLASTn realizado com os fragmentos amplificados por nITA.

28I cl.1		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus clone 5 gag protein (gag) gene, partial cds	Equine infectious...	303	303	99%	7e-78	84.38%	1077	AF170368.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus clone 2 gag protein (gag) gene, partial cds	Equine infectious...	287	287	99%	7e-73	83.44%	1077	AF170361.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate SLQ-8 gag protein (gag) gene, partial cds	Equine infectious...	241	241	77%	6e-59	84.65%	357	HE977816.1

28I cl.2		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus clone 5 gag protein (gag) gene, partial cds	Equine infectious...	298	298	99%	3e-76	84.08%	1077	AF170364.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus clone 2 gag protein (gag) gene, partial cds	Equine infectious...	281	281	99%	3e-71	83.12%	1077	AF170361.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus clone 2 gag protein (gag) gene, partial cds	Equine infectious...	206	206	73%	2e-46	82.97%	1062	AF172059.1

Fonte: produção própria.

Figura 37- Resultados do BLASTn realizado com o fragmento amplificados por nLG.

21J cl.1		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain POCONE DNA1, complete genome	Equine infectious...	721	721	99%	0.0	88.88%	8016	MG000970.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus strain POCONE DNA2, complete genome	Equine infectious...	701	701	99%	0.0	88.18%	7968	MG000971.1
<input checked="" type="checkbox"/>		Equine infectious anemia virus isolate EqJ Card ca., complete genome	Equine infectious...	612	609	99%	2e-170	86.44%	6737	MG000943.1

Fonte: produção própria.

As análises dos sequenciamentos confirmaram a amplificação específica do alvo investigado, reforçando a viabilidade das amostras de coágulo para identificação genética do vírus. As amostras de gDNA extraídas de soro e amplificadas com oligonucleotídeos para DNA proviral também serão enviadas para sequenciamento para confirmação da identificação molecular do vírus.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o sangue acondicionado em diferentes anticoagulantes, bem como o soro e o coágulo são amostras viáveis para a extração de DNA e amplificação por PCR, permitindo tanto a genotipagem equina quanto a detecção do DNA proviral do vírus da anemia infecciosa equina. Observou-se que os diferentes anticoagulantes testados, assim como as variações de tempo (até 90 dias) e temperatura de armazenamento (4 °C e -20 °C), não interferiram negativamente na amplificação por PCR, o que reforça a aplicabilidade da metodologia.

O soro demonstrou ser uma matriz viável, porém sensível ao método de preparo e de extração, enquanto o coágulo apresentou os melhores resultados, com amplificação consistente em todas as condições testadas. A validação do uso do soro e do coágulo para a identificação individual equina foi essencial, pois o protocolo proposto para aumentar a segurança no diagnóstico da AIE depende diretamente do sucesso dessa abordagem. Dessa forma, a genotipagem do animal pode ser realizada a partir da mesma amostra utilizada no teste diagnóstico, sem a necessidade de coletas adicionais e aumentando a confiabilidade e segurança do diagnóstico da AIE.

Além disso, a constatação de que as mesmas amostras podem ser utilizadas para a detecção molecular do vírus abre novas perspectivas para a aplicação dessa metodologia em estudos futuros sobre a variabilidade genética e a epidemiologia da AIE. Entretanto, a alta taxa de mutação genética do vírus continua sendo um desafio para a amplificação do DNA proviral, ressaltando a necessidade de se desenvolver oligonucleotídeos mais abrangentes que detectem com confiabilidade uma maior gama de sorotipos do VAIE.

A implementação dessas metodologias pode contribuir significativamente para o aprimoramento da segurança do diagnóstico e para o avanço no monitoramento e controle da AIE no Brasil e em outros países.

REFERÊNCIAS

- AN, Q. et al. Spatiotemporal analysis of equine infectious anemia and prediction of risk areas in Europe. **Preventive veterinary medicine**, v. 230, n. 106281, p. 106281, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106281>.
- ANDRADE, VARIAD. R. de F., Rezende, A. S. C., Santos, S. A., Nogueira, M. F., Santiago, J. M., Lage, J., Melo, M. M., Reis, J. K. P., & Trigo, P. (2018). Equine infectious anemia affects the athletic performance of equines from the Brazilian Pantanal region. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53(10), 1184–1188. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018001000012>
- BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495–504, 2006. Doi [10.1007/s00253-006-0675-0](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0)
- BOLDBAATAR, B. et al. Amplification of complete gag gene sequences from geographically distinct equine infectious anemia virus isolates. **Journal of virological methods**, v. 189, n. 1, p. 41–46, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.12.010>
- BORGES, A. M. C. M. et al. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 76–81, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.011>
- BRANGAN, P. et al. Management of the national programme to eradicate equine infectious anaemia from Ireland during 2006: a review. **Equine veterinary journal**, v. 40, n. 7, p. 702–704, 2008. <https://doi.org/10.2746/042516408x363314>
- BRINDLEY, M. A.; MAURY, W. Equine infectious anemia virus entry occurs through clathrin-mediated endocytosis. **Journal of virology**, v. 82, n. 4, p. 1628–1637, 2008. <https://doi.org/10.1128/JVI.01754-07>
- CÂMARA, R. J. F. et al. Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 10, n. 12, p. 2203, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10122203>
- CAPOMACCIO, S. et al. 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, n. 3–4, p. 320–332, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.015>.
- CAPPELLI, K. et al. Deep sequencing and variant analysis of an Italian pathogenic field strain of equine infectious anaemia virus. **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, n. 6, p. 2104–2112, 2017. <https://doi.org/10.1111/tbed.12631>
- CAPPELLI, K. et al. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 1, p. 27–33, 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.01311-10>

- CARVELLI, A. et al. Equine infectious anaemia: The active surveillance of an entire Equid population reduces the occurrence of the infection. **Transboundary and emerging diseases**, v. 2024, p. 1–13, 2024. <https://doi.org/10.1155/2024/3439871>
- CERÓN, JJ. et al. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, v. 167, n. 3, p. 294–301, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.009>
- CHEN, C.; LI, F.; MONTELARO, R. C. Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in viral budding and infection. **Journal of virology**, v. 75, n. 20, p. 9762–9770, 2001 <https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9762-9770.2001>)
- COOK, R. F. et al. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. **Virology**, v. 313, n. 2, p. 588–603, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00351-9](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00351-9)
- COOK, R. F. et al. Rapid detection of equine infectious anaemia virus nucleic acid by insulated isothermal RT-PCR assay to aid diagnosis under field conditions. **Equine veterinary journal**, v. 51, n. 4, p. 489–494, 2019. <https://doi.org/10.1111/evj.13032>
- COOK, R. F.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. **Veterinary microbiology**, v. 167, n. 1–2, p. 181–204, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.031>
- COOK, S. J. et al. Differential responses of Equus caballus and Equus asinus to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. **Veterinary microbiology**, v. 79, n. 2, p. 93–109, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00348-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00348-5)
- COOK, S. J. et al. Molecular characterization of the major open reading frames (ORFs) and enhancer elements from four geographically distinct North American equine infectious anemia virus (EIAV) isolates. **Journal of equine veterinary science**, v. 85, n. 102852, p. 102852, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102852>
- COSTA, V. M. D. et al. Equine infectious anemia virus (EIAV): Evidence of circulation in donkeys from the Brazilian Northeast region. **Journal of equine veterinary science**, v. 108, n. 103795, p. 103795, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103795>
- CRAIGO, J. K. et al. Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 38, p. 15105–15110, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706449104>
- CROFT, D. T., Jr et al. Performance of whole-genome amplified DNA isolated from serum and plasma on high-density single nucleotide polymorphism arrays. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 10, n. 3, p. 249–257, 2008. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.070155>
- CURSINO, A. E. et al. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. **Archives of virology**, v. 163, n. 9, p. 2385–2394, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3877-8>

DABROWSKI, P. et al. A comparison of five methods to maximize RNA and DNA isolation yield from adipose tissue. **PeerJ**, v. 12, n. e17071, p. e17071, 2024. <https://doi.org/10.7717/peerj.17071>

DONG, J.; COOK, F. R.; ZHU, W. Equine infectious anemia virus in Japan: viral isolates V70 and V26 are of North American not Japanese origin. **Veterinary microbiology**, v. 174, n. 1–2, p. 276–278, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.004>

DONG, J.-B. et al. 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, n. 11, p. 2105–2111, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1406-8>

GARCIA, ME. et al. Anticoagulants Interfere with PCR Used To Diagnose Invasive Aspergillosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1567-1568, 2002. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1567-1568.2002>.

GAUDAIRE, D. et al. Molecular characterization of equine infectious anaemia virus from a major outbreak in southeastern France. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 1, p. e7–e13, 2018. <https://doi.org/10.1111/tbed.12657>

GOOSSENS, W. et al. K2- or K3-EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology? **Clin Lab Haematol**, v. 13, n. 3, p. 291-295, 1991. doi: 10.1111/j.1365-2257.1991.tb00284.x. PMID: 1794231.

GUHA, P. et al. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1002/jcla.22181>.

HARROLD, S. M. et al. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3112–3121, 2000. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3112-3121.2000>

HENDERSON, L. E. et al. Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. **Journal of virology**, v. 61, n. 4, p. 1116–1124, 1987. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.4.1116-1124.1987>

HOLLAND, N. et al. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 217-234, 2003

HU, Z. et al. Development and evaluation of a blocking ELISA for serological diagnosis of equine infectious anemia. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 107, n. 10, p. 3305–3317, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12504-5>

HUBÉ, F. et al. Improved PCR method for amplification of GC-rich DNA sequences. **Molecular biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 81–84, 2005. <https://doi.org/10.1385/MB:31:1:081>

HULL-NYE, D. et al. Key factors and parameter ranges for immune control of equine Infectious Anemia Virus infection. **Viruses**, v. 15, n. 3, 2023.

<https://doi.org/10.3390/v15030691>

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1990. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)

ISSEL, C. J. et al. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. **Veterinary microbiology**, v. 17, n. 3, p. 251–286, 1988. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90069-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90069-7)

ISSEL, C. J. et al. Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it? **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 30, n. 3, p. 561–577, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.002>

ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V., Jr; FOIL, L. D. Prospective study of progeny of inapparent equine carriers of equine infectious anemia virus. **American journal of veterinary research**, v. 46, n. 5, p. 1114–1116, 1985.

JARA, M.; FRIAS-DE-DIEGO, A.; MACHADO, G. Phylogeography of equine infectious anemia virus. **Frontiers in ecology and evolution**, v. 8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00127>

JIN, S.; CHEN, C.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus Gag p9 function in early steps of virus infection and provirus production. **Journal of virology**, v. 79, n. 14, p. 8793–8801, 2005. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.8793-8801.2005>

KEMEN, M. J., Jr; COGGINS, L. Equine infectious anemia: transmission from infected mares to foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 161, n. 5, p. 496–499, 1972.

KO, K. et al. A comparative study of extraction free detection of HBV DNA using sodium dodecyl sulfate, N-lauroylsarcosine sodium salt, and sodium dodecyl benzene sulfonate. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, p. 25442, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75944-7>

KOTIKALAPUDI, R.; PATEL, RK. Comparative study of the influence of EDTA and sodium heparin on long term storage of cattle DNA. **Cell journal**, v. 17, n. 1, p. 181–186, 2015. <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.526>.

KUHAR, U.; MALOVRH, T. High genetic diversity of equine infectious anaemia virus strains from Slovenia revealed upon phylogenetic analysis of the p15 gag gene region: Equine infectious anaemia. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 2, p. 205–210, 2016. <https://doi.org/10.1111/evj.12404>

LAZAU, A.; OLARIUJURCA, I.; URO, M.; DÉGI, J. Equine infectious anemia evolution in western area of Romania during period 2007 and 2011. **Lucrări Științifice Medicină Veterinară**, Timișoara, v. 45, n. 3, 2012.

- LEROUX, C. et al. EIAV (equine infectious anemia virus): to better understand the lentiviral pathogenesis. **Virologie**, v. 9, n. 4, p. 289–300, 2005. <https://doi.org/10.1684/vir.2011.2119>
- 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, n. 4, p. 485–512, 2004. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004020>
- LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 9627–9639, 1997. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9627-9639.1997>
- LIMA, T. S. et al. Aspectos gerais da Anemia Infecciosa Equina (AIE). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e51011528508, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28508>
- LOHMANN, K. L. et al. Disease investigations for equine infectious anemia in Canada (2009-2012) - Retrospective evaluation and risk factor analysis. **The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne**, v. 60, n. 11, p. 1199–1206, 2019.
- LUCENA-AGUILAR, G. et al. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. **Biopreservation and biobanking**, v. 14, n. 4, p. 264–270, 2016. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>.
- LUPULOVIC, D. et al. Identification and genetic characterization of equine infectious anemia virus in Western Balkans. **BMC veterinary research**, v. 17, n. 1, p. 168, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02849-2>
- MALOSSO, C. D. et al. High genomic variability in equine infectious anemia virus obtained from naturally infected horses in Pantanal, Brazil: An endemic region case. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 207, 2020. <https://doi.org/10.3390/v12020207>
- MARDAN-NIK, M. et al. A method for improving the efficiency of DNA extraction from clotted blood samples. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 33, n. 6, p. e22892, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcla.22892>
- MAURY, W. J. et al. Cellular and viral specificity of equine infectious anemia virus Tat transactivation. **Virology**, v. 200, n. 2, p. 632–642, 1994: <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1226>.
- MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. **Journal of virology**, v. 68, n. 10, p. 6270–6279, 1994. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.10.6270-6279.1994>
- MCDOWELL, D. G.; BURNS, N. A.; PARKES, H. C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. **Nucleic acids research**, v. 26, n. 14, p. 3340–3347, 1998. <https://doi.org/10.1093/nar/26.14.3340>

MØLLER, P. et al. Collection and storage of human white blood cells for analysis of DNA damage and repair activity using the comet assay in molecular epidemiology studies. **Mutagenesis**, v. 36, n. 3, p. 193-212, 2021. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab012>.

MONTAGNIER, L. et al. A new type of retrovirus isolated from patients presenting with lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndrome: Structural and antigenic relatedness with equine infectious anaemia virus. **Annales de l'Institut Pasteur. Virology**, v. 135, n. 1, p. 119–134, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0769-2617\(84\)80046-5](https://doi.org/10.1016/S0769-2617(84)80046-5)

NAGARAJAN, M. M.; SIMARD, C. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. **Virus research**, v. 129, n. 2, p. 228–235, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.07.013>

NOGUEIRA, M. F. et al. Ocorrência de Anemia Infecciosa Equina em potros de éguas soropositivas no Pantanal do Mato Grosso do Sul. 2012. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/916037/1/COT87.pdf>

OAKS, J. L. et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7263–7269, 1998. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7263-7269.1998>

OBRADOVIC, J. et al. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence: Optimization of PCR conditions. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 27, n. 6, p. 487–493, 2013. <https://doi.org/10.1002/jcla.21632>

OLIVEIRA, F. G. et al. Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v. 140, p. 30–37, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.015>

PARDOE, NU.; MICHALAK, TI. Detection of hepatitis B and woodchuck hepatitis viral DNA in plasma and mononuclear cells from heparinized blood by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 51, n. 2-3, p. 277-288, 1995

PERMENTER, J. et al. Quantitative analysis of genomic DNA degradation in whole blood under various storage conditions for molecular diagnostic testing. **Molecular and cellular probes**, v. 29, n. 6, p. 449–453, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.07.002>

RESENDE, C. F. et al. Low transmission rates of Equine infectious anemia virus (EIAV) in foals born to seropositive feral mares inhabiting the Amazon delta region despite climatic conditions supporting high insect vector populations. **BMC veterinary research**, v. 18, n. 1, p. 286, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03384-4>

REZENDE, A. S. C. et al.. A Anemia Infecciosa Equina afeta o desempenho funcional dos equinos no Pantanal Matogrossense? p. 150-157. Artigo em anais de congresso (ALICE) Embrapa Pantanal, 2016. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1067771>

RICOTTI, S. et al. Serologically silent, occult equine infectious anemia virus (EIAV) infections in horses. **Veterinary microbiology**, v. 187, p. 41–49, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.007>.

ROBERTS, H. Equine infectious anaemia in Europe: an ongoing threat to the UK. **The veterinary record**, v. 181, n. 17, p. 442–446, 2017. <https://doi.org/10.1136/vr.j4721>

ROCCHI, S. et al. Interlaboratory assays from the fungal PCR Initiative and the Modimucor Study Group to improve qPCR detection of Mucorales DNA in serum: one more step toward standardization. **Journal of clinical microbiology**, v. 63, n. 2, p. e0152524, 2025. <https://doi.org/10.1128/jcm.01525-24>

ROMO-SÁENZ, C. I. et al. Molecular detection of equine infectious anemia virus in clinically normal, seronegative horses in an endemic area of Mexico. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 33, n. 4, p. 758–761, 2021. <https://doi.org/10.1177/10406387211006195>

SANTOS, E. M. et al. Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 296–301, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000200004>

SELLON, D. C. Equine infectious anemia. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 9, n. 2, p. 321–336, 1993. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30399-1](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30399-1)

SORBER, L. et al. A comparison of cell-free DNA isolation kits: Isolation and quantification of cell-free DNA in plasma. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 19, n. 1, p. 162–168, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.09.009>

SOTOUDEH ANVARI, M. et al. Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise Review. **Iranian journal of pathology**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2021. <https://doi.org/10.30699/ijp.2020.124315.2357>.

TASHJIAN, R. J.; KITTLESON, S. L. A study of foals resulting from the mating of stallions and mares known to be positive to the agar immunodiffusion test for equine infectious anemia. **Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC**, v. 71, n. 3, p. 333–335, 1976.

TORRES, A. DA S. et al. Avaliação epidemiológica da anemia infecciosa equina nas Américas. **Multitemas**, p. 117–130, 2024 <https://doi.org/10.20435/multi.v29i71.4128>

VILLA-MANCERA, A. et al. Prevalence of equine infectious anemia virus in horses and donkeys determined by comparison of ELISA and AGID in Mexico. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 76, n. 2, p. 180–186, 2024. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-13142>

WAHIS - World Animal Health Information System. **WOAH** - World Organisation for Animal Health. <https://www.woah.org/en/home/>>.

WANG, H.-N. et al. Equine infectious anemia virus in China. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, p. 1356–1364, 2018a. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20381>

WANG, JT. et al. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 750-753, 1992. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.750-753.1992>.

WANG, X.-F. et al. Characterization of equine infectious anemia virus long terminal repeat quasispecies in vitro and in vivo. **Journal of virology**, v. 92, n. 8, 2018. <https://doi.org/10.1128/jvi.02150-17>

WANG, X.-F. et al. Genetic Evolution during the development of an attenuated EIAV vaccine. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 9, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0240-6>

WIDSCHWENDTER, M. et al. The potential of circulating tumor DNA methylation analysis for the early detection and management of ovarian cancer. **Genome medicine**, v. 9, n. 1, p. 116, 2017. doi:10.1186/s13073-017-0500-7

YOKOTA, M. et al. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 13, n. 3, p. 133-140, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2825\(1999\)13:3<133::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1999)13:3<133::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0).

ZAHRANI, H. et al. Comparison of K2 and K3 EDTA Anticoagulant on Complete Blood Count and Erythrocyte Sedimentation Rate. **Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory**, v. 28, n. 1, p. 75–79, 2021. <https://doi.org/10.24293/ijcpml.v28i1.1735>.

ZHANG, W. et al. Natural variation of equine infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. **Virology**, v. 261, n. 2, p. 242–252, 1999. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9862>

ZHANG, Z. et al. Development and evaluation of a test strip for the rapid detection of antibody against equine infectious anemia virus. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 85, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12980-9>

ZIMMERLI, U.; THÜR, B. Equine Infectious Anaemia - a review from an official veterinary perspective. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 161, n. 11, p. 725–738, 2019. <https://doi.org/10.17236/sat00232>

ANEXO 1

Protocolo para extração de DNA (Salting Out)

Amostra	Tampão de Lise Celular	Tampão de Lise nuclear	6M NaCl	Isopropanol	TE
300 µL de soro	900 µL	300 µL	100 µL	300 µL	80 µL
150-300mg coágulo	1000 µL	600 µL	200 µL	600 µL	80 µL

Preparo de amostra

Soro: Acondicionar o soro em um microtubo de 2,0mL centrifugar a 13.400rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante até ficar 300 µL de soro ara realizar da extração.

Coágulo: Fragmentar o coágulo em 150-300mg descartando a parte superior do coágulo que fica em contato com o gel/soro para realizar a extração.

Lise celular

1. Adicionar no tubo o volume indicado da solução de lise celular e misturar por inversão.
2. Incubar em temperatura ambiente (RT) por 5 minutos.
3. Centrifugar 10.000 RPM por 30s.
4. Descartar o sobrenadante e suspender o pellet com o mesmo volume de solução de lise celular por vortex/pipetagem.
5. Repetir o procedimento com a solução de lise celular até o pellet ficar branco e livre de hemoglobina (em soro repetir 2 vezes).
6. Antes de adicionar a solução de lise nuclear, suspender os leucócitos do pellet com o restante do tampão de lise celular por vortex/pipetagem.

Lise nuclear e precipitação de proteínas (NaCl)

7. Adicionar no tubo o volume indicado de solução de lise nuclear, misturar por inversão 10 vezes e incubar em banho-maria (55°C) por 2 horas.
8. Adicionar o volume indicado da solução de precipitação de proteína (6M NaCl) e vortexar por 30s.
9. Incubar no gelo por 5 minutos.
10. Centrifugar as amostras a 4°C/RT por 10 min em velocidade máxima.
11. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e descartar o pellet.

Precipitação de DNA

12. Adicionar o volume indicado de isopropanol gelado no sobrenadante da etapa 11 e misturar por inversão até visualizar a precipitação do DNA.
13. Incubar à -20°C por 1 hora ou OverNight.
14. Centrifugar (max RPM) por 30 minutos (4°C/RT)
15. Descartar o sobrenadante por inversão e lavar o pellet com etanol 70% (2x volume de isopropanol).
16. Centrifugar (max RPM) por 10 minutos a 4°C/RT, descartar o etanol por inversão e sobrenadante e repetir etapa de lavagem.
17. Dar um spin, remover o excesso do etanol cuidadosamente e deixar o pellet secar.
18. Reidratar o DNA com o volume desejável de TE, deixar durante 30 min em banho-maria a 55°C ou overnight a 4°C e armazenar a -20°C.

Soluções:

Tampão de lise celular: 10 mM Tris pH 7,8; 10 mM KCl; 10 mM de MgCl₂; 1,5% de NP-40 ou Triton X-100

Tampão de lise nuclear: 50 mM Tris pH 7,8; 25 mM EDTA; 400 mM NaCl; 1% SDS

Solução de precipitação de proteínas: 6M NaCl

Tampão TE: 10mM Tris; 1mM EDTA