

PATRÍCIA FILIPPESEN FAVARO

**Caracterização molecular de vírus da influenza equina  
brasileiros, 2012 e 2015**

São Paulo

2018



PATRÍCIA FILIPPESEN FAVARO

**Caracterização molecular de vírus da influenza equina  
brasileiros, 2012 e 2015**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3563  
FMVZ

Favaro, Patrícia Filippesen  
Caracterização molecular de vírus da influenza equina brasileiros, 2012 e 2015. / Patrícia Filippesen Favaro. -- 2018.  
135 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Influenza equina. 2. H3N8. 3. São Paulo 2012 e 2015. 4. Caracterização genética. 5. Filogenia. I. Título.



## CERTIFIED

We certify that the Research "Molecular characterization of Brazilian equine influenza viruses , 2012 and 2015", protocol number CEUAX 4480120314, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 27, 2014.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Caracterização molecular de vírus da influenza equina brasileiros, 2012 e 2015 ", protocolado sob o CEUAX nº 4480120314, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 27 de agosto de 2014.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FAVARO, Patricia Filippesen

Título: **Caracterização molecular de vírus da influenza equina brasileiros, 2012 e 2015**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_





Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_



## AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, pelo apoio constante e carinho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado (processo 141677/2014-7) e de doutorado sanduíche no exterior (processo 200468/2015-4).

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) pelo Auxílio Pesquisa (processo 2011/03234-7) concedido fazendo possível a realização deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pela oportunidade concedida, pela paciência e ensinamentos.

Ao Dr. Thomas M. Chambers pela orientação e ensinamentos durante o doutorado sanduíche realizado no Maxwell H. Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington-KY, USA.

Agradecimentos aos colegas e funcionários do Maxwell H. Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington-KY, USA pelo auxílio e ensinamentos.

Agradecimentos às pesquisadoras Dra. Eliana M. C. Villalobos, Dra. Elenice M. S. Cunha e Dra. Maria do Carmo C. S. H. Lara, do Instituto Biológico de São Paulo, pela colaboração ao projeto.

Aos professores Dr. Wilson Roberto Fernandes (FMVZ-USP) e Dr. Paulo Eduardo Brandão (FMVZ-USP) pelo auxílio, ensinamentos e colaboração com o projeto.

À Dra. Dilmara Reischak (LANAGRO-MAPA) pelo auxílio, amizade e colaboração com o projeto.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Campinas - SP, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela colaboração com o projeto.

Agradecimentos ao Laboratório BIOVET® (São Paulo, SP, Brasil) pela doação de ovos embrionados e colaboração com o projeto.

Agradecimentos aos residentes e funcionários do Hospital Veterinário da FMVZ-USP pelo auxílio na coleta de dados e materiais durante o projeto.

À Sheila Oliveira de Souza Silva e Sueli A. T. Miyagi pela amizade e pelo auxílio nas práticas laboratoriais e colaboração com o projeto.

Aos professores e funcionários do VPS-FMVZ-São Paulo, pelo auxílio e convívio.

## RESUMO

FAVARO, P. F. **Caracterização molecular de vírus da influenza equina brasileiros, 2012 e 2015** [Molecular characterization of Brazilian equine influenza viruses , 2012 and 2015]. 2018. 135p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A influenza equina (EI) é uma enfermidade respiratória viral aguda que acomete equídeos de todas as idades. A doença é causada pelo vírus da influenza equina (EIV do inglês *Equine Influenza Virus*), que podem ser do subtipo viral H3N8 (antigo Equi-2), mundialmente distribuído, e o H7N7 (antigo Equi-1), considerado extinto desde 1980. Os EIVs pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero Influenza A, possuem genoma RNA fita simples segmentado de senso negativo e são envelopados. A EI tem alta morbidade e baixa mortalidade leva a grandes perdas econômicas no ramo equestre. Os animais acometidos ficam impedidos de serem transportados ou de participarem de eventos equestres no Brasil. A rápida e fácil disseminação do EIV é bastante característico em surtos de EI. Surtos de EI foram descritos em 2012 em diversos países, incluindo o Brasil. Em 2015, um surto de EIV ocorreu em um Hospital Veterinário na cidade de São Paulo-SP. Os objetivos do presente trabalho foram: a) obter isolados do vírus da influenza equina de surtos recentes do estado de São Paulo, Brasil; b) realizar o sequenciamento dos EIVs isolados; c) promover a análise filogenética e evolutiva desses EIVs. Foram isolados 12 EIVs de um surto de EI em um hospital veterinário na cidade de São Paulo em 2015. Promoveu-se o sequenciamento dos oito genes virais dos isolados de 2015 e de uma estirpe de EIV de um surto brasileiro de 2012, e da hemaglutinina de outras duas estirpes do mesmo surto de 2012. Os vírus do surto de 2012 foram cedidos pelo Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico de São Paulo para as análises. O sequenciamento dos genes HA e NA indicaram que os EIVs de 2012 e 2015 brasileiros são do subtipo H3N8 e pertencem à sublinhagem Flórida 1 e tiveram maiores identidades com os vírus de 2012 da América do Sul, Estados Unidos e Dubai de 2012. Os vírus de 2015 formaram um clado separado dos demais EIV Flórida 1, tanto na análise filogenética quanto na

análise de relógio molecular. As análises de mutações de nucleotídeos e aminoácidos, associados à análise de perfil de hidrofobicidade sugerem mudanças em estruturas antigênicas que poderiam acarretar no maior distanciamento em relação à estirpe vacinal A/equine/South Africa/4/03.

Palavras-chave: Influenza equina. H3N8. São Paulo 2012 e 2015.  
Caracterização genética. Filogenia.

## ABSTRACT

FAVARO, P. F. **Molecular characterization of Brazilian equine influenza viruses , 2012 and 2015** [Caracterização molecular de vírus da influenza equina brasileiros, 2012 e 2015]. 2018. 135p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The equine influenza (EI) is a viral acute respiratory disease that can affect equines of any age. The disease is caused by the equine influenza virus (EIV) and has two different subtypes H3N8 (formerly Equi-2) that occurs worldwide and H7N7 (formerly Equi-1), considered extinct since 1980. EIVs belong to the *Orthomyxoviridae* family, Influenza A genus, are enveloped and has negative segmented single strand RNA genome. EI causes high morbidity and low mortality and drives to high economic losses in equestrian industry. In Brazil, the transport and participation in equestrian events are not allowed when horses have EIV. The quickly spread pattern is easily seen in EIV outbreaks. EI outbreaks occurred in 2012 in several countries, including Brazil. In 2015, an outbreak occurred in a Veterinarian Hospital in São Paulo-SP. The objectives of the present study were: a) to obtain isolates of equine influenza virus from recent outbreaks in the State of São Paulo, Brazil; b) to promote the sequencing of these EIVs; c) to perform the phylogenetic and evolutive analysis of these EIVs. Twelve EIVs were isolated from an outbreak in a veterinarian hospital in the State of São Paulo in 2015. The eight viral genes were sequenced from EIVs of 2015 and from one EIV of a Brazilian outbreak, 2012. Also, the HA gene from two other EIVs from the same 2012-outbreak were sequenced. The viruses from the 2012-outbreak were from the Laboratory of Rabies and Viral Encephalitis, Instituto Biológico de São Paulo. Sequencing on HA and NA genes indicates that the Brazilian 2012 and 2015 EIVs are H3N8 subtype, belong to the Florida 1 sublineage and were more identical to the 2012 EIVs from South America, United States and Dubai. In the phylogenetic tree and the molecular clock the EIVs from 2015 grouped in a cluster that was separated from other Florida 1 EIVs. The nucleotide, amino acid and hydrophobicity analysis suggest changes in antigenic

structures that could lead to differences from the vaccine strain A/equine/South Africa/4/03.

Keywords: Equine influenza. H3N8. São Paulo 2012 and 2015. Genetic characterization. Phylogeny.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura viral esquemática dos vírus Influenza A ..... 33
- Figura 2 - Árvores filogenéticas dos subtipos de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) de todos os vírus influenza A ..... 36
- Figura 3 - Esquematização da transmissão do vírus influenza A entre diferentes espécies de mamíferos e aves ..... 38
- Figura 4 - Representação esquemática de *primers* internos (itens b e c) desenhados para os genes PA, PB1 e PB2 do vírus da Influenza equina A/equine/São Paulo/1.19/2012 para sequenciamento nucleotídico..... 54
- Figura 5 - Pônei apresentando secreção nasal resultante de um quadro de influenza equina no Hospital Veterinário da FMVZ em setembro de 2015..... 59
- Figura 6 - Teste rápido Directigen™ EZ Flu A+B (BD™) para detecção da nucleoproteína (NP) do vírus da Influenza A. Teste realizado com amostra de *swab* nasal de equino com sintomatologia respiratória 60
- Figura 7 - Análise dos animais residentes e internados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo durante a suspeita de surto de influenza equina ocorrido em setembro de 2015..... 61
- Figura 8 - Árvore filogenética com base em 78 sequências de nucleotídeos da sub-unidade HA1 de EIVs (H3N8) construída pelo modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições ..... 67
- Figura 9 - Árvore filogenética com base em 68 sequências de nucleotídeos da neuraminidase (NA) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições ..... 68

- Figura 10 - Árvore filogenética com base em 48 sequências de nucleotídeos de matriz (M) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.....69
- Figura 11 - Árvore filogenética com base em 48 sequências de nucleotídeos de nucleoproteína (NP) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.....70
- Figura 12 - Árvore filogenética com base em 47 sequências de nucleotídeos da proteína não estrutural (NS) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.....71
- Figura 13 - Árvore filogenética com base em 51 sequências de nucleotídeos da polimerase ácida (PA) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.....72
- Figura 14 - Árvore filogenética com base em 53 sequências de nucleotídeos da polimerase básica 1 (PB1) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.....73
- Figura 15 - Árvore filogenética com base em 41 sequências de nucleotídeos da polimerase básica 2 (PB2) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.....74
- Figura 16 - Perfil da média de hidrofobicidade pela escala Eisenberg para a proteína HA1 dos isolados São Paulo/2015, São Paulo/2012 e South Africa/4/2003 (representante da sublinhagem Florida 1) .....75

- Figura 17 - Perfil da média de hidrofobicidade pela escala Eisenberg para a proteína NA dos isolados São Paulo/2015, São Paulo/2012 e South Africa/4/2003 (representante da sublinhagem Florida 1) ..... 76
- Figura 18 - Árvore filogenética com base no relógio molecular do gene de HA de EIVs, usando o relógio molecular exponencial, modelo evolutivo HKY e calibração com os anos de coleta de 78 estirpes (nt 1 ao 987) realizado com BEAST v.1.7.5 (DRUMMOND et al., 2012) ..... 82



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de vacinas contra EIV disponíveis no mercado brasileiro ...	44
Tabela 2 - <i>Primers</i> modificados aplicados na amplificação e sequenciamento dos vírus da influenza equina.....	52
Tabela 3 - <i>Primers</i> desenhados para sequenciar fragmentos internos dos genes da polimerase ácida (PA), polimerase ácida 1 (PB1) e polimerase básica 2 (PB2) do vírus da influenza equina com base em sequências obtidas do vírus brasileiro A/equine/São Paulo/1.19/2012 .....	54
Tabela 4 - Descrição dos resultados dos testes diagnósticos, isolamento viral e histórico vacinal dos equídeos com sintomas respiratórios durante uma suspeita de surto de influenza equina no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo no ano de 2015 .....	63
Tabela 5 - Amostras virais obtidas de equídeos com sintomas respiratórios coletados durante uma suspeita de surto de influenza equina na cidade de São Paulo no ano de 2015 que apresentaram duas mutações no gene codificante da parte globular da glicoproteína hemaglutinina .....	65
Tabela 6 - Distância de aminoácidos de 78 EIV HA1 sequências entre os grupos filogenéticos: pré-divergente, Flórida 1 e Flórida 2.....	80
Tabela 7 – Descrição das substituições de aminoácidos em clones de um segmento (nt 1 to 392) da subunidade 1 da hemaglutinina dos isolados de São Paulo, 2015 .....	85



## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Condições aplicadas às reações de amplificação dos genes do EIV por RT-PCR ..... 53
- Quadro 2 - Relação de amostras de EIV obtidas ou isoladas no presente trabalho e os respectivos genes e as sequências parciais ou completas codificadoras de proteínas ..... 65
- Quadro 3 - Substituições de aminoácidos das estirpes virais *A/equine/Sao Paulo/1.19/2012* e *A/equine/São Paulo/8.FMVZ/2015* em comparação com o vírus *A/equine/South Africa/4/2003*, (*A/equine/Ohio/1/2003* no caso de PB1) representante da sublinhagem Florida 1 ..... 77
- Quadro 4 - Identidades nucleotídicas dos isolados brasileiros de 2012/2015 e da estirpe vacinal recomendada pela OIE em relação aos EIVs analisados no presente estudo ..... 79





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ESS	<i>Effective sample size</i>
EI	<i>Equine Influenza</i> - Influenza Equina
EIV	<i>Equine Influenza Virus</i> - Vírus da Influenza Equina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramma
HA	Hemaglutinina
HA01	Subunidade 1 da hemaglutinina
M	Gene de matriz
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
M1	Proteína de matriz
M2	Proteína de canal iônico
MCMC	<i>Bayesian Markov Chain Monte Carlo</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
min	Minuto de hora
mVolts	Milivolts
NA	Neuraminidase

NP	Nucleoproteína
NS	Gene da proteína não estrutural
NS1	Proteína não estrutural 1
NEP	Proteína de exportação nuclear
nm	Nanômetro
OD	<i>Optical density</i>
OIE	<i>World organisation for animal health</i>
PA	Polimerase ácida
pb	Pares de base
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomoles
PNSE	Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
RNA	Ácido ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Transcrição reversa - <i>Reverse Transcription</i>
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TMRCA	<i>The Most Recent Common Ancestor</i>
U	Unidades internacionais
U.V.	Ultravioleta
vPC	Complexo de polimerase viral
µg	Microgramas
µM	Micromolar
µL	Microlitro

°C      Graus Celsius

x g      Força centrífuga relativa

Obs.: Algumas abreviaturas, dada a sua consagração na literatura científica, seguem a sua grafia no idioma inglês.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
2.1	TAXONOMIA DOS VÍRUS INFLUENZA A.....	31
2.2	NOMENCLATURA DOS VÍRUS INFLUENZA A .....	31
2.3	GENOMA E ESTRUTURA DOS VÍRUS INFLUENZA A .....	32
2.4	A INFLUENZA A .....	36
2.5	A INFLUENZA EQUINA .....	39
2.5.1	<b>Epidemiologia da influenza equina</b> .....	<b>41</b>
2.5.2	<b>Diagnóstico da influenza equina</b> .....	<b>42</b>
2.5.3	<b>Controle e profilaxia da influenza equina</b> .....	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
4.1	VÍRUS DA INFLUENZA EQUINA, 2012.....	47
4.2	VÍRUS DA INFLUENZA EQUINA, 2015.....	47
4.2.1	<b>Amostras</b> .....	<b>49</b>
4.2.2	<b>Isolamento viral em ovos embrionados</b> .....	<b>49</b>
4.2.3	<b>Extração do RNA</b> .....	<b>50</b>
4.2.4	<b>Detecção do EIV por RT-PCR</b> .....	<b>50</b>
4.2.5	<b>Amplificação e sequenciamento dos genes do EIV</b> .....	<b>51</b>
4.2.6	<b>Clonagem e sequenciamento do gene parcial da hemaglutinina</b> .....	<b>55</b>
4.2.7	<b>Análise filogenética</b> .....	<b>56</b>
4.2.8	<b>Análise evolutiva</b> .....	<b>57</b>
4.2.9	<b>Anticorpos contra o vírus influenza A</b> .....	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
5.1	DESCRIÇÃO DO SURTO DE INFLUENZA EQUINA .....	59
5.2	DETECÇÃO DO EIV E ISOLAMENTO VIRAL .....	60
5.3	PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS INFLUENZA A .....	62
5.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	64
5.5	ANÁLISE EVOLUTIVA DO GENE HA.....	80
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>87</b>

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A influenza equina (EI - *equine influenza*), conhecida como gripe equina, causa destruição epitelial do trato respiratório superior de equídeos, resultando em febre, tosse, secreção nasal e, por vezes, levando à pneumonia devido à lesão viral e infecções bacterianas secundárias (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2013).

Os vírus da influenza equina (EIV - do inglês *equine influenza virus*) têm o genoma composto por oito segmentos de RNA de cadeia simples, segmentados que agem de forma independente durante a replicação viral (CHEN et al., 2001). codificando 15 proteínas. A classificação dos vírus influenza A é baseada na composição dos dois maiores antígenos de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2013). Pequenas mutações da cadeia de aminoácidos nessas duas proteínas podem levar a diferenças de antigenicidade e conseqüentemente ao escape imune (PARK et al., 2009).

Inicialmente, os EIVs (subtipo H3N8) foram definidos em um único grupo filogenético (KAWAOKA; BEAN; WEBSTER, 1989) que depois evoluiu em duas linhagens, Americana e Eurásica, de acordo com a região geográfica (DALY et al., 1996). A linhagem Americana divergiu nas sub-linhagens América do Sul, Kentucky e Flórida (LAI et al., 2001). As estirpes do grupo Flórida tiveram mutações na subunidade 1 da hemaglutinina (HA01), A78V e S159N, havendo uma nova divisão em Flórida 1 e Flórida 2 (LAI et al., 2001; BRYANT et al., 2009), representados por A/equine/South Africa/4/03 and A/equine/Newmarket/5/03, respectivamente (OIE, 2016). As sublinhagens Flórida 1 e Flórida 2 foram identificadas em surtos que ocorreram mundialmente e continuam sendo os EIVs predominantes (BRYANT et al., 2011; VIRMANI et al., 2011; BERA et al., 2013; GILDEA; FITZPATRICK; CULLINANE, 2013; VILLALOBOS et al., 2013; YONDON et al., 2013; KARAMENDIN et al., 2014; WOODWARD et al., 2014; LEGRAND et al., 2015; BEUTTEMÜLLER et al., 2016).

O Brasil experienciou surtos de EIV do subtipo H3N8 em 1963 (ANDREWS; PEREIRA; WILDY, 1978), 1969 (CUNHA, 1970; PEREIRA et al., 1972), 1985



(CUNHA et al., 1986), 1988 (MANCINI et al., 1988), 2001 (LOUREIRO, 2004) e 2012 (VILLALOBOS et al., 2013; BEUTTEMMÜLLER et al., 2016) e surtos do subtipo H7N7 em 1976 (PIEGAS et al., 1976; CUNHA; PASSOS; VALLE, 1978). De acordo com a OIE, surtos brasileiros também ocorreram nos anos de 2008 (OIE, 2009) e 2010 (OIE, 2011). Os EIVs foram isolados porém a linhagem ao qual pretendiam não foi divulgado.

Em 2012, importantes surtos ocorreram nos Estados Unidos, Argentina, Brasil, Urugai e Dubai. Os vírus tiveram grande similaridade e pertenciam ao grupo Flórida 1 (VILLALOBOS et al., 2013; WOODWARD et al., 2014; BEUTTEMMÜLLER et al., 2016; PERGLIONE et al., 2016). Acredita-se que o surto iniciou-se na América do Sul e depois nos EUA e Dubai (PERGLIONE et al., 2016). O Brasil reportou no mesmo ano 129 surtos confirmados de EIV em cavalos com 1382 casos, incluindo 2 mortes, enquanto em 2011 foram reportados 24 surtos com 62 casos [World Animal Health Information Database (WAHID) Interface - [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Reporting](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Reporting)].

Assim, o presente trabalho teve como objetivos a obtenção de isolados de EIV brasileiros recentes, promover o sequenciamento e análises filogenéticas e evolutivas dessas amostras virais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A influenza equina é uma enfermidade do trato respiratório superior dos equinos com características bastante semelhantes aos outros vírus do tipo influenza A. A seguir são descritos a taxonomia, estrutura, organização e epidemiologia dos vírus influenza A e influenza equina.

### 2.1 TAXONOMIA DOS VÍRUS INFLUENZA A

Os vírus influenza A pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus A*, espécie vírus Influenza A. A família abrange outros 4 gêneros: *Influenzavirus B* (espécie vírus Influenza B), *Influenzavirus C* (espécie vírus Influenza C), *Isavirus* (espécie vírus da Anemia Infecciosa do Salmão), *Thogotovirus* (espécies vírus Dhorí e vírus Thogoto). Um quinto gênero está sendo analisado para integrar a mesma família: *Quarantivirus* (espécies vírus Quarantil, vírus Johnston Atoll e vírus Lake Chad) (ICTV, 2017).

Um novo gênero foi proposto em 2014, devido à descoberta do vírus influenza D (HAUSE et al., 2014), descrito em suínos (HAUSE et al., 2014; CHIAPPONI et al., 2016) e em bovinos (HAUSE et al., 2014; DUCATEZ; PELLETIER; MEYER, 2015; FERGUSON et al., 2015; CHIAPPONI et al., 2016; MURAKAMI et al., 2016) que até o momento da escrita deste trabalho ainda não estavam descritos no ICTV.

### 2.2 NOMENCLATURA DOS VÍRUS INFLUENZA A

Os vírus influenza são nomeados da seguinte maneira: tipo antigênico (A, B ou C)/animal que o vírus foi isolado (no caso de humanos, essa informação

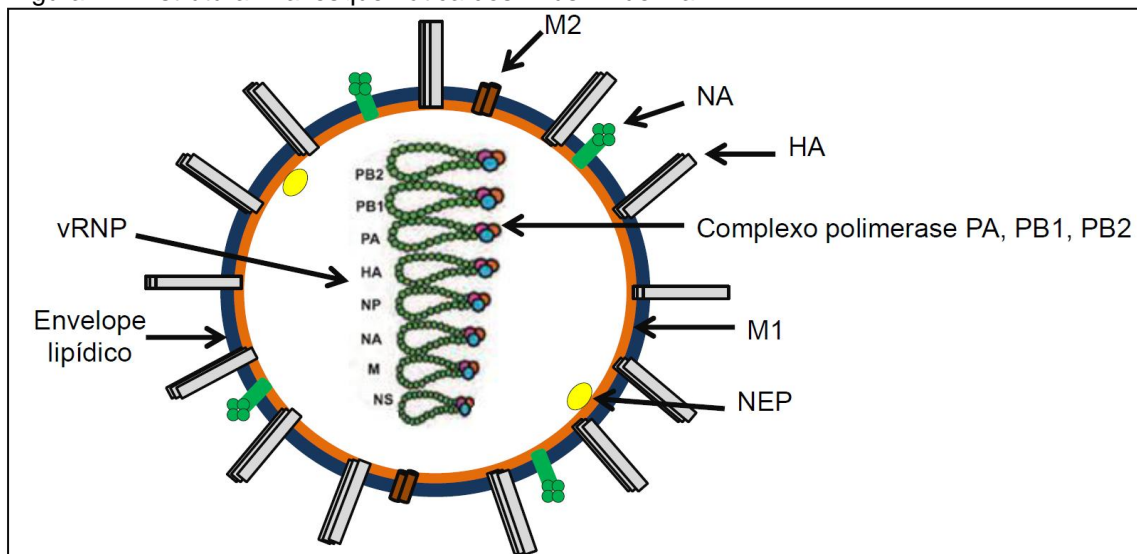
é omitida)/região geográfica que foi isolado/identificação laboratorial do isolado/ano do isolamento viral e em seguida, em parênteses, o subtipo de HA e NA (SUAREZ, 2008). Por exemplo, o vírus isolado de equinos na África do Sul em 2003 é escrito: A/equine/South Africa/4/2003 (H3N8).

### 2.3 GENOMA E ESTRUTURA DOS VÍRUS INFLUENZA A

Os vírus influenza A têm o genoma RNA com 8 segmentos de polaridade negativa. Dentre os oito segmentos, cinco (NS, M, PA, PB1 e PB2) são policistrônicos, contêm mais de uma ORF (*open reading frame*). Os oito segmentos codificam 15 proteínas: duas glicoproteínas de superfície - hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), duas proteínas estruturais - matriz (M1) e canal iônico (M2), oito proteínas não estruturais - NS1 (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2013), PB1-F2 (CHEN et al., 2001), PB1-N40 (WISE 2009) PA-X (JAGGER et al., 2012), PA-N155, PA-N182 (MURAMOTO et al., 2013), a proteína de exportação nuclear (NEP, antigo NS2), a nucleoproteína (NP) e três proteínas que formam o complexo da polimerase viral (vPC - *viral polymerase complex*) (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2013).

Cada virion é composto por um envelope lipídico de origem celular, são pleomórficos com aproximadamente 100nm de diâmetro (FUJIYOSHI et al., 1994). A camada lipídica do envelope contém as proteínas virais transmembrana HA, NA e M2 e sob essa camada há a matriz (M1) que sustenta as vRNPs que têm a forma helicoidal (SCHEIFFELE et al., 1999; ZHANG; PEKOSZ; LAMB, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura viral esquemática dos vírus Influenza A



Fonte: SHAW e PALESE (2013). com adaptações de Favaro, P. F. (2017).

O genoma viral combinado com a NP é chamada ribonucleoproteína (vRNP) (ELTON et al., 2005) e está associada ao vPC durante a formação da partícula viral (WEBSTER; BEAN, 1978). O vRNP é o complexo fundamental para a replicação e transcrição viral. Sítios de ligação na NP para a formação desse complexo são necessárias para a forma e função da vRNP (WANG et al., 2011): interação NP-NP, RNA, PB2 e PA (ELTON et al., 1999; MARKLUND et al., 2012).

A HA é a glicoproteína de envelope que está em maior abundância (~80%), contém sítios receptores de ácido siálico e epítomos que são alvo de anticorpos neutralizantes (SKEHEL; WILEY, 2000; NAYAK et al., 2009). A HA está em forma de trímeros e a quebra da HA0 em HA1 e HA2, por meio de triptases que estão presentes no epitélio bronquiolar (KIDO et al., 1999), expõe sítios de ligação que contêm o peptídeo de fusão, fundamentais para a infectividade viral (HUANG et al., 2003; NAYAK et al., 2009). A ligação da HA com o SA promove a fusão do envelope viral à célula que entra na célula por endocitose (SKEHEL; WILEY, 2000).

A M2 está disposta em tetrâmeros que formam os canais iônicos (PINTO; HOLSINGER; LAMBT, 1992), presentes no envelope viral (ZEBEDEE; LAMB, 1988). Estão presentes em cada partícula viral aproximadamente 16-20 moléculas (LEAR, 2003). A proteína M2 é também relacionada à formação do

vírião através de interações com a proteína M1, controlando a morfologia viral (HUGHEY et al., 1995).

Dentro do endossomo, em pH ácido, ocorre a alteração conformacional da HA2 e ocorre a fusão das membranas virais e endossomais (COLMAN; LAWRENCE, 2003). Os canais iônicos (M2) se abrem com o pH ácido e acidifica o interior da partícula viral, provocando a dissociação das vRNPs da matriz (M1) (TAKEDA et al., 2002; EISFELD; NEUMANN; KAWAOKA, 2014), expondo o NLS (sinalizador de transporte nuclear) e liberando o conteúdo para o citoplasma celular.

Os NLS presentes na NP dos vRNPs são reconhecidos pela célula e permitem o transporte das vRNPs para o núcleo, onde ocorrerá a produção do mRNA e cRNA, dando início à transcrição (síntese de mRNA) e replicação (CROS; PALESE, 2003; LI et al., 2015).

Durante a fase de replicação viral que a proteína NS1 tem papel de regular os mecanismos da célula infectada. Um desses papéis é o de interferir na máquina celular de forma que haja a facilitação da transcrição do RNA viral (ARAGÓN et al., 2000; GEISS et al., 2002; SOLÓRZANO et al., 2005; HALE et al., 2008).

A progênie viral é produzida a partir do cRNA. Os segmentos virais são exportados para o citoplasma onde são organizados perto da membrana celular e então liberados para o espaço extracelular (SMITH; HAY, 1977; RESA-INFANTE et al., 2011). Há duas teorias sobre a forma em que ocorre o empacotamento viral: aleatória e específica. A primeira seria regida pela competição de partículas semelhantes que há na estrutura das vRNPs (ENAMI et al., 1991; BANCROFT; PARSLOW, 2002) e a segunda assume a seleção específica dos segmentos, permitindo selecionar quais partículas serão incorporadas (SMITH; HAY, 1982). A presença de sequências sinalizadoras nas regiões de 3' e 5'UTR específicas para cada segmento (FUJII et al., 2003, 2005; WATANABE et al., 2003; LIANG; HONG; PARSLOW, 2005; MURAMOTO et al., 2006) suporta a teoria do empacotamento específico.

A NA é a segunda mais abundante proteína do envelope viral (~17%) e está disposta em tetrâmeros. Sua reação enzimática promove a quebra dos SA da superfície celular, promovendo a liberação das novas partículas virais e,

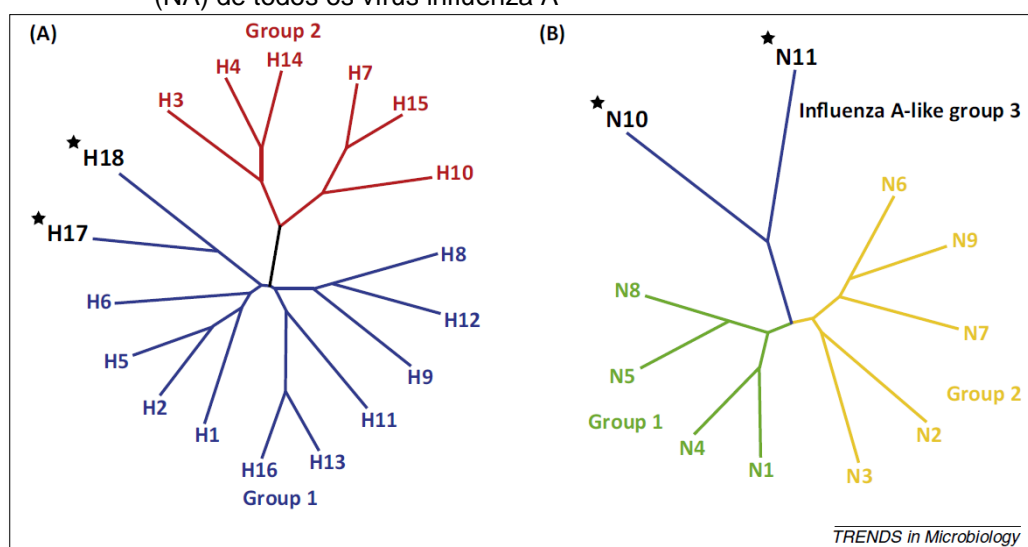
assim, tendo importante participação da disseminação e transmissão viral (NAYAK et al., 2009).

Os vírus influenza A são classificados de acordo com a composição das duas mais importantes proteínas de envelope, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) (SHAW; PALESE, 2013). Foram descritas 18 tipos de HA e 11 de NA. Todos os HA16 e NA9 são encontrados em aves e os recentes subtipos H17N10 e H18N11 foram encontrados em morcegos (TONG et al., 2012, 2013).

A HA do H17N10 tem semelhanças com as outras 16 HAs conhecidas dos vírus influenza A. Porém, a estrutura no N10 (LI et al., 2012; ZHU et al., 2012) descoberto em morcegos tem grandes diferenças no sítio ativo em relação às neuraminidases com características conhecidas (N1-9). Essa diferença previne a atividade de sialidase, não desempenhando a atividade que é característica da NA (GARCIA-SASTRE, 2012). Em 2013, Tong e colaboradores demonstraram que as novas HAs (H17 e H18) e NAs (N10 e N11) não utilizam o ácido siálico para fusão celular e soltura dos vírions das células, sugerindo que um novo mecanismo de ligação e entrada na célula possa existir.

Por classificação filogenética, os subtipos de HA e NA são agrupados em dois grupos cada um, incluindo os recém descobertos H17/18 e N10/11 (GAMBLIN; SKEHEL, 2010; WU et al., 2014) (Figura 2). Os subtipos H17 e H18 pertencem ao grupo 1. A árvore das neuraminidases mostra a formação de dois grupos porém N10 e N11 formam um terceiro grupo, distinto dos demais (WU et al., 2014).

Figura 2 - Árvores filogenéticas dos subtipos de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) de todos os vírus influenza A



Fonte: (WU et al., 2014).

Legenda: estrelas representam os novos subtipos de HA e NA: H17, H18, N10 e N11.

## 2.4 A INFLUENZA A

O vírus da influenza foi descrito em 1931 quando ocorreu a primeira associação do vírus à enfermidade respiratória em suínos, que era similar ao que ocorria em humanos (SHOPE, 1931). Em 1933 o isolamento do vírus de humanos com sintomatologia semelhante ao dos suínos foi descrito (SMITH; ANDREWES; LAIDLAW, 1933) e o vírus isolado foi nomeado Influenza A (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2013).

Nos anos seguintes, em 1940 e 1947, outros dois tipos de vírus influenza foram isolados de humanos: o vírus influenza B (B/Lee/40) e o vírus influenza C (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2013). Ambos acometem somente humanos, raramente afetando animais (PALESE; SHAW, 2007).

O vírus influenza A causa destruição do epitélio do trato respiratório superior, podendo atingir o trato inferior. A ligação a esses tecidos se deve à presença de receptores de ácidos siálicos (SA) na parte globular da hemaglutinina (HIGA; ROGERS; PAULSON, 1985; SUZUKI et al., 2000) e a

ligação de anticorpos a esses receptores promove a inibição e inativação da partícula viral (BOUVIER; PALESE, 2008).

Os ácidos siálicos (SA) são uma família de glicoproteínas presentes na parte terminal de açúcares ancorados na membrana celular que podem ser feitos de diferentes tipos de ácidos neuramínicos. As duas ligações mais comuns são do tipo  $\alpha 2,6$  e  $\alpha 2,3$  (ITO; KAWAOKA, 2000; SUZUKI, 2005). São classificados de acordo com a ligação ao açúcar pelo carbono  $\alpha$ -2. Dois SA são de especial importância na patogenia dos vírus influenza A, o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e o ácido *N*-gliconeuramínico (Neu5Gc) devido à ligação que a HA pode fazer a eles (SUZUKI et al., 2000; SUZUKI, 2005).

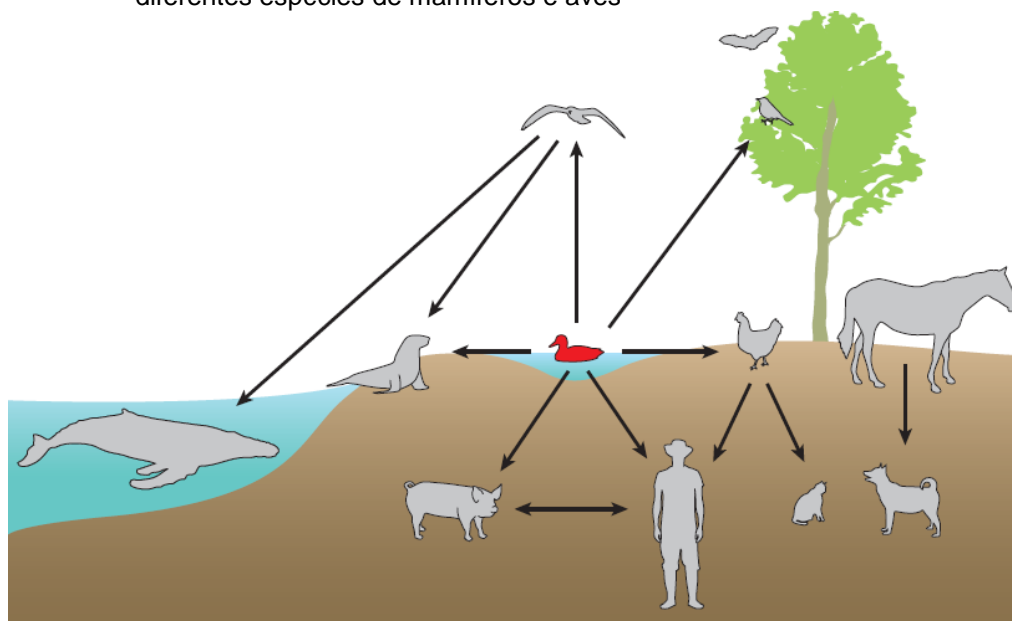
Os vírus influenza A têm diferentes afinidades aos SA considerando-se a espécie animal como por exemplo, o vírus influenza avirário (SA $\alpha 2,3$ Gal), influenza humano (Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal) (ROGERS; PAULSON, 1983; ROGERS; SOUZA, 1989; CONNOR et al., 1994), influenza canino (Neu5Gc $\alpha 2,3$ Gal e Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal) e influenza equino (Neu5Gc $\alpha 2,3$ Gal) (SUZUKI et al., 2000; YAMANAKA et al., 2010; PECORARO et al., 2013). A predominância dos SA tipo  $\alpha 2,3$  nas aves ocorre no trato intestinal, enquanto no equino ocorre no epitélio da traquéia (SUZUKI et al., 2000).

A maneira como as doenças estão dispersas em uma população é classificada pelo CDC como surto, endemia, epidemia, pandemia (REZENDE, 1998) Quando a doença está relacionada aos animais utiliza-se o sufixo zootia (enzootia, epizootia e panzootia) (SLEIGH, 2011).

As aves são reservatórios dos vírus influenza A e há a possibilidade de ocorrerem mutações, principalmente em aves migratórias (LU; LYCETT; BROWN, 2014) e dispersão do vírus para outros hospedeiros (KAWAOKA; KRAUSS; WEBSTER, 1989; WEBSTER et al., 1992; ZHOU et al., 1999) (Figura 3). Assim como as aves, os suínos têm importância na cadeia epidemiológica visto que por possuírem receptores (SA  $\alpha 2,3$  e SA  $\alpha 2,6$ ) nas células que permitem a coinfeção por diferentes vírus Influenza A, com afinidades a diferentes receptores, existe a possibilidade de ocorrerem *reassortments* e posteriormente a disseminação de novas formas virais (ITO et al., 1998; SUZUKI et al., 2000; TREBBIEN; LARSEN; VIUFF, 2011).



Figura 3 - Esquematização da transmissão do vírus influenza A entre diferentes espécies de mamíferos e aves



Fonte: OZAWA; KAWAOKA, 2013.

As mutações que ocorrem nos vírus influenza A podem ser do tipo *drift* antigênico, quando há acumulação de mutações pontuais, ou *shift* antigênico, quando há mudanças abruptas em HA e/ou NA (DOWDLE; SCHILD, 1976).

A capacidade de mutar-se com facilidade e de promover o embaralhamento (*reassortment*) dos segmentos do genoma são características importantes para a evolução dos vírus influenza (MANRUBIA et al., 2005; MURCIA et al., 2010, 2013; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; HUGHES et al., 2012; LU; LYCETT; BROWN, 2014). A coinfeção de estirpes diferentes em um mesmo hospedeiro pode levar à formação de um novo vírus, contendo partes de cada um desses vírus (OZAWA; KAWAOKA, 2013), como pode também haver apenas uma seleção natural do vírus que está predominante no hospedeiro. Essas habilidades adaptativas permitem a formação de quasispecies e variantes que eventualmente levam ao escape imune (PARK et al., 2009; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012) ou surgirem novas formas virais capazes de cruzarem barreiras entre espécies (KIRKLAND et al., 2010; PECORARO et al., 2013).

Os influenza A têm grandes diferenças nas sequências de aminoácidos das glicoproteínas de superfície (HA e NA) (NOBUSAWA et al., 1991). Essas alterações podem resultar em diferença de antigenicidade, assim que os

anticorpos específicos para um subtipo de HA neutralize apenas aquele mesmo subtipo. A diferente antigenicidade dos subtipos de HA implica na escolha das estirpes virais durante a produção de vacinas (LEE; SUAREZ, 2005).

Em um mesmo subtipo de HA também são observadas diferenças de antigenicidade devido aos *drift* antigênicos. É devido a essas diferenças em antigenicidade que a vigilância sobre as estirpes circulantes seja importante para determinar quais estirpes vacinais serão utilizadas (DALY et al., 1996; SMITH, 2003; STRENGELL et al., 2011).

As regiões antigênicas da HA estão localizadas na parte globular da glicoproteína. A ligação de anticorpos a essas regiões pode neutralizar o vírus através do bloqueio ao sítio receptor da HA, prevenindo a ligação da partícula viral e conseqüentemente a infecção da célula. Mutações nas regiões antigênicas podem ocorrer sem causar alterações na antigenicidade ou podem levar à diminuição ou até à perda de reconhecimento do anticorpo e levar ao escape imune (WEBSTER; LAVER, 1980).

## 2.5 A INFLUENZA EQUINA

Em 1956 o vírus da influenza equina (H7N7) foi descrito, e o subtipo H3N8, decorrente do maior *shift* antigênico ocorrido pelo EIV, foi descrito em 1963. O subtipo emergido a partir do *shift* antigênico foi chamado de H3N8 (A/equi/Miami/1/63) (WADDEL; TEIGLAND; SIGEL, 1963). O H7N7 é considerado extinto desde 1980 e o H3N8 permanece até os dias atuais causando surtos mundialmente (WEBSTER, 1993). Acredita-se que os dois subtipos de EIV tenham originados de um vírus influenza aviário (CHAMBERS, 2014).

A rápida dispersão da doença entre os animais, com alta morbidade e baixa mortalidade era relatada desde os tempos pré-virológicos, quando não se sabia o que estava causando a afecção nos animais (FLEMING, 1871; MORENS; TAUBENBERGER, 2010). Muitas dessas epizootias ocorreram em paralelo à doença respiratória sugestiva de influenza em humanos na Europa (FLEMING, 1871; CLEMOW, 1889; MORENS; TAUBENBERGER, 2010).

A possibilidade de infecção humana pelo EIV foi pesquisada em 1969 com a inoculação do vírus equino H3N8 A/equine/Miami/1963 em homens, resultando em sintomatologia (KASEL; COUCH, 1969). Relatos da infecção pelo EIV em diferentes espécies foram feitos em 1969, 2002, 2004, 2005, 2007 e 2014 (KASEL; COUCH, 1969; CRAWFORD et al., 2005; DALY et al., 2008; KIRKLAND et al., 2010; CRISPE et al., 2011; SU et al., 2014).

A maior panzootia equina foi registrada em 1872, iniciando em Toronto e disseminando pela América do Norte e América Central com fatalidade entre 20 e 50% (MORENS; TAUBENBERGER, 2010). A panzootia causou grandes prejuízos nos Estados Unidos devido ao transporte na época ser realizado com animais. A falta de transporte afetou inclusive policiais, médicos e bombeiros, levando ao difícil controle de um grande incêndio que ocorreu em Boston (SAMMARCO, 1997). Diversas epidemias e surtos ocorreram nos 30 anos seguintes (MORENS; TAUBENBERGER, 2010).

O Reino Unido sofreu um grande surto de influenza equina em 1979 e desde então a vacinação é obrigatória para equinos de competição. A maioria dos equinos no Reino Unido continua sem vacinação e casos esporádicos vem ocorrendo (ELTON; BRYANT, 2011). Em 2003 um surto de EI afetou cavalos, em sua maioria com esquema de vacinação atualizado, em no mínimo 12 locais e 21 centros de treinamento equestres (NEWTON et al., 2006).

Mesmo com as vacinações, surtos grandes de EIV ocorreram na África do Sul em 2003 (GUTHRIE, 2006), no Japão em 2007 (YAMANAKA et al., 2008) e na Austrália em 2007 (WATSON et al., 2011a, 2011b).

O rápido diagnóstico da EI no surto australiano de 2007 foi fundamental para o controle da disseminação do vírus pelo país. Ações de restrição de movimentação dos animais foram tomadas de imediato. Em seguida, um plano nacional de restrição de movimentação de equinos foi estabelecida, medidas de biossegurança rígidas e de longo termo, controle das zonas de focos de EIV, vacinação estratégica para criar uma zona de *buffer* e posteriormente para acelerar a proteção de populações equina e a disponibilidade de testes diagnósticos rápidos utilizados em paralelo (ELISA associado ao qRT-PCR) permitiram a erradicação do EIV na Austrália em menos de seis meses (KIRKLAND et al., 2011; READ et al., 2011).

São livres de EIV a Austrália, Hong Kong, Nova Zelândia, Japão e África do Sul. Esses países têm protocolos rígidos de importação de cavalos incluindo testes para EIV baseados em PCR. Países em que o EIV é enzoótico, observa-se que têm vigilância menos intensiva e a vacinação e políticas de importação são menos rigorosas em relação à influenza equina (CHAMBERS, 2014).

Os custos causados por surtos de EI são resultantes do banimento da movimentação animal, cancelamento de eventos de corrida e exposições, custos com médico veterinário, por vezes hospitalização, custos laboratoriais e custos para promover a vigilância e contenção do surto (PERGLIONE et al., 2016).

### **2.5.1 Epidemiologia da influenza equina**

O EIV acomete equídeos de todas as idades, sendo mais incidentes em adultos (NYAGA; WIGGINS; PRIESTER, 1980; PEEK et al., 2004; HAPPOLD; RUBIRA, 2011; PUSTERLA et al., 2015). Os animais apresentam tosse, secreção nasal, letargia, inapetência e febre com pico 48h após a infecção, podendo ocorrer um segundo pico de febre no sétimo dia após a infecção. Em casos não complicados a recuperação dos animais ocorre entre 7 a 14 dias (MORLEY et al., 2000; LANDOLT; TOWNSEND; LUNN, 2007).

A replicação do vírus ocorre em células ciliadas do epitélio respiratório (traquéia e brônquios). Devido à atividade viral, ocorre a destruição do epitélio ciliar (LIN et al., 2002) e conseqüentemente estase do muco (WILLOUGHBY et al., 1992) que pode levar a uma broncopneumonia secundária (PEEK et al., 2004). Há raros casos relatados de encefalite relacionados à ocorrência de EIV (DALY et al., 2006).

A infecção dos animais ocorre pela via respiratória e a transmissão do EIV é por meio de contato direto dos animais, aerossóis, fômites e condições de aglomeração como exposições, vendas, shows e competições (LANDOLT; TOWNSEND; LUNN, 2007; CHAMBERS, 2014). Dependendo das condições de umidade, temperatura e exposição ao sol, o vírus pode se manter infeccioso por dias (BOONE; GERBA, 2005). A dispersão em animais confinados é rápida e em dois a três dias todos os animais suscetíveis podem ser infectados (LANDOLT;

TOWNSEND; LUNN, 2007). Após a infecção, a eliminação viral tem duração de aproximadamente sete dias (MORLEY et al., 2000; LANDOLT; TOWNSEND; LUNN, 2007).

### 2.5.2 Diagnóstico da influenza equina

O diagnóstico presuntivo da influenza equina é baseado nos sinais clínicos: febre (39-41°C), tosse seca frequente e rápida disseminação entre os animais. A transmissão rápida da EI nos equídeos é característica da EI e auxilia na diferenciação do EIV e outras doenças infecciosas do trato respiratório de cavalos como, por exemplo, herpes, arterite e adenite equina (CHAMBERS; REEDY, 2014). Outros sinais clínicos característicos são a secreção nasal serosa a mucopurulenta, anorexia e letargia (LANDOLT; TOWNSEND; LUNN, 2007).

O diagnóstico definitivo é realizado por meio do diagnóstico direto, quando há a detecção do agente, a partir de swabs nasais/nasofaríngeais ou de lavados traqueais, ou pelo diagnóstico indireto através de amostras de soro, em que pesquisa-se o resultado da atividade do agente no organismo.

A identificação do agente é feito pelo isolamento viral em ovos embrionados de galinha ou em células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) (WHO, 2011; OIE, 2016). O agente também pode ser identificado por meio da detecção do ácido nucléico viral, através da RT-PCR (*Reverse Transcription e Polymerase Chain Reaction*), qRT-PCR (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*) (OIE, 2016), ensaio da neuraminidase e teste inibição da neuraminidase, realizado com antisoros específicos para sorotipificação da NA (WHO, 2011; OIE, 2016), imunofluorescência direta (WHO, 2011) ou por meio da detecção da nucleoproteína viral pelo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (WHO, 2011; OIE, 2016). O teste da hemaglutinação viral (HA), seguido do teste da inibição da hemaglutinação (HI) é realizado para sorotipificar a proteína HA do vírus isolado, utilizando um painel de soros específicos contra os subtipos de hemaglutininas (H1-H16) (WHO, 2011; OIE, 2016).

O diagnóstico indireto promove a detecção de anticorpos contra influenza no soro dos equídeos. O principal teste indireto é inibição da hemaglutinação (HI), em que observa-se a soroconversão (aumento mínimo de quatro vezes o título de anticorpos) em soros pareados coletados no dia da detecção dos sintomas e 15 dias após (WHO, 2011; OIE, 2016). Outros dois testes são utilizados para o diagnóstico indireto: a hemólise simples radial (SRH - *Single Radial Haemolysis*) (OIE, 2016) e o ensaio de microneutralização viral (WHO, 2011).

### **2.5.3 Controle e profilaxia da influenza equina**

Em 2001, uma instrução de serviço (DDA n°17, 16 de novembro de 2001) estabeleceu que seja feita a apresentação do certificado de vacinação contra a influenza equina ou certificação sanitária para a emissão de documentação de trânsito de equídeos no país.

Foi instituído no Brasil no ano de 2008 o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) (IN n°17, 8 de maio de 2008) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no intuito de promover ações de vigilância e defesa sanitária de equídeos para a prevenção, vigilância, controle e erradicação de doenças infecciosas de equídeos que possam afetar o complexo agropecuário. Entre as ações do PNSE, constam "I - educação sanitária; II - estudos epidemiológicos; III - controle do trânsito; IV - cadastramento, fiscalização e certificação sanitária; e V - intervenção imediata quando da suspeita ou ocorrência de doença de notificação obrigatória" (MAPA, 2017).

A utilização de vacinas que contenham estirpes epidemiologicamente relevantes deve ser considerada na atualização das vacinas contra EI para que tenha boa reação cruzada com os EIVs circulantes na região/país (OIE, 2009, 2011, 2017). A OIE faz a recomendação da utilização do vírus A/equi/South Africa/4/2003 como representante da sublinhagem Florida 1 (OIE, 2017), porém ainda encontra-se vacinas desatualizadas no Brasil (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de vacinas contra EIV disponíveis no mercado brasileiro

<b>Nome comercial</b>	<b>Estirpes de EIV</b>	<b>Adjuvante</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Fonte</b>
Lexington 8	A/equine/Praga/1/56 A/equine/South Africa/4/03 A/equine/Kentucky/94	hidróxido de alumínio	Vencofarma	Bula
Influenza Horse	A/equine/Praga/1/56 A/equine/South Africa/4/03 A/equine/Kentucky/94	hidróxido de alumínio	Vencofarma	Bula
Influenza H1/4	A/equine/Praga/1/56 A/equine/South Africa/4/03 A/equine/New market/93	hidróxido de alumínio	Vencofarma	Bula
Tri-Equi	*A1 e A2 (inclui A/equine/Kentucky/92)	-	Hertape	Site
Iuvac Innovator EHV 4/1	A/equine/Kentucky/97	MetaStim	Zoetis	Fabricante
Fluvac Innovator EWT	A/equine/Kentucky/97	MetaStim	Zoetis	Fabricante

Fonte: Bula das vacinas, site dos laboratórios produtores e informação direta do fabricante.

Legenda: - : sem dados disponíveis; \* sem dados completos

Ainda que haja vacinação intensiva em algumas populações de equídeos, surtos de EIV continuam a ocorrer, e o transporte global de equinos é um dos fatores responsáveis devido à introdução do EIV em populações isentas daquela estirpe em questão (YAMANAKA et al., 2008; WATSON et al., 2011a).

### 3 OBJETIVOS

Considerando que 1) há poucos trabalhos desenvolvidos que promoveram a análise molecular-temporal do vírus da influenza equina durante surtos de EIV; e que 2) há poucos trabalhos descrevendo a caracterização molecular de vírus da influenza equina brasileiros recentes; o presente trabalho teve como objetivos os seguintes:

a) Obter isolados do vírus da influenza equina de surtos recentes no estado de São Paulo;

b) Realizar o sequenciamento dos EIVs isolados no estado de São Paulo;

c) Realizar a análise filogenética e evolutiva dos vírus EIV isolados.





## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e metodologia empregados no presente estudo são descritos nos itens seguintes.

### 4.1 VÍRUS DA INFLUENZA EQUINA, 2012

Visando realizar a comparação dos vírus isolados no presente trabalho com EIVs que tenham recentemente afetado cavalos no Brasil, foram utilizados três EIVs de um surto de influenza equina que acometeu cavalos em uma mesma propriedade na cidade de São Paulo em 2012. Os vírus foram cedidos pelo Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico [A/equine/São Paulo/1.19/2012 (H3N8), A/equine/São Paulo/16.19/2012 (H3N8) e A/equine/São Paulo/24.19/2012 (H3N8)] para o sequenciamento e análise e haviam sido previamente isolados em ovos embrionados de galinha. Os três isolados tiveram o gene da hemaglutinina sequenciados e a estirpe A/equine/São Paulo/1.19/2012 teve sequenciadas as regiões codificantes completas dos oito genes do EIV.

### 4.2 VÍRUS DA INFLUENZA EQUINA, 2015

O Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo - SP, experienciou um surto de influenza equina no período de 16 de setembro a 25 de setembro de 2015, acometendo equídeos vacinados e sem vacinação. Vinte e dois dos 32 equídeos que estavam no hospital no período do surto (29 cavalos, dois potros e um pônei) apresentaram ao menos um dos sinais clínicos de influenza equina (MORLEY et al., 2000; MUMFORD et al., 2003; PUSTERLA et

al., 2011) no período de oito dias, que incluíram: secreção nasal, tosse seca, espirros, febre, inapetência e congestão de mucosa.

Foram identificados os dias em que os animais apresentaram os primeiros sinais de febre, tosse e secreção nasal para a provável identificação da entrada do vírus no Hospital Veterinário e a velocidade em que essa transmissão estaria ocorrendo entre os animais.

Dez dos cavalos haviam sido imunizados com vacina comercial contendo a estirpe inativada A/equine/Kentucky/97 e dois cavalos haviam sido imunizados com uma vacina contendo as estirpes inativadas A/equine/South Africa/4/2003 e A/equine/Kentucky/94. Dois pôneis eram provenientes de éguas vacinadas porém não havia histórico completo de vacinação. Os demais animais tinham o histórico de vacinação desconhecido.

A identificação da ocorrência do vírus Influenza A foi realizada após os primeiros sinais clínicos ocorrerem nos animais. Foram coletados *swabs* nasais de 13 equinos que apresentavam sinais clínicos, transportados em meio MEM (*Minimum Essential Medium* - Gibco, Carlsbad, CA, USA) acrescidos de 200U de penicilina e 200µg de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA), transportados em caixa térmica com gelo até o laboratório e realizados os testes: Directigen™ EZ Flu A+B (BD™) e reação de RT-PCR para o gene de matriz de influenza A (descritos nos itens 4.2.3 e 4.2.4).

O teste rápido Directigen™ EZ Flu A+B (BD™) consiste em detectar a nucleoproteína viral, que é conservada entre os *Influenza A virus*, em amostras de *swabs* nasais de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

Os *swabs* nasais com reação positiva em pelo menos um dos testes foram considerados positivos para a presença EIV. Após a confirmação da presença do vírus influenza A nos *swabs* dos 13 primeiros equinos a demonstrarem sinais clínicos compatíveis com EIV. A partir desta triagem, os demais animais que estavam no hospital foram acompanhados, examinados e amostras coletadas.

Os dados da ocorrência de sinais característicos de EI com rápida dispersão associados à detecção do vírus em diversos animais com sintomatologia e ou soroconversão indicaria a ocorrência de um surto de influenza equina no local (MUMFORD et al., 2003).

#### 4.2.1 Amostras

A partir da primo-deteccção da presença de influenza A, todos os animais que estavam em internamento (n=21/32), de experimentação (n=10/32) e que residiam no hospital veterinário (n=1/32) tiveram amostras de soro e *swabs* coletados para análise.

A coleta de sangue foi realizada com seringas de 10mL e agulhas 40 X 12mm com acesso pela veia jugular, para obtenção de soro sérico no primeiro dia da deteccção dos sinais clínicos e 15 dias após a primeira coleta.

Os *swabs* nasais foram coletados em triplicatas, transportados em meio MEM acrescidos de 200U de penicilina e 200µg de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA) e transportados em caixa térmica com gelo até o laboratório, onde foram estocados a -80°C até o processamento.

Em razão de o EIV se replicar com eficiência em células traqueais equinas (SUZUKI et al., 2000), foram encaminhadas pelo Hospital Veterinário lavados trans-traqueais de oito equinos (8/32) que apresentavam secreção nasal, tosse e febre para a tentativa de deteccção de RNA viral por RT-PCR para o gene de matriz (M) dos vírus influenza A (itens 4.2.2 a 4.2.4) e tentativa de isolamento viral em ovos embrionados.

#### 4.2.2 Isolamento viral em ovos embrionados

Os EIVs de 2012 e as amostras de *swabs* nasais e lavados trans-traqueais foram inoculados em cavidade alantóide de ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) de galinha com 10 dias de embrião visando amplificar os vírus de 2012 e isolar o vírus da influenza equina dos cavalos acometidos pelo surto de 2015. Os ovos foram doados pelo Laboratório BIOVET® (São Paulo, SP, Brasil) e o procedimento foi realizado de acordo com o protocolo da WHO (2011) com no máximo duas passagens.

Foram utilizados como inóculos para a amplificação viral em ovos embrionados: a) EIVs 2012: 200µL da solução de vírus cedido pelo Laboratório

de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico; b) 2015: *swabs* - 200µL da solução em que os *swabs* foram transportados; c) 2015: lavados traqueais - 200µL do lavado trans-traqueal.

Após a ovoscopia para demarcar a cavidade alantóide, os ovos foram transportados para uma cabine de biossegurança e higienizados com álcool 70%. Realizou-se dois orifícios na casca do ovo, um na câmara de ar e outro na cavidade alantóide. Como inóculo, utilizou-se o líquido que cada *swab* foi transportado: o frasco contendo o *swab* e o meio de transporte foram homogeneizados e 200µL do sobrenadante foram utilizados. Os sobrenadantes foram inoculados em cavidade alantóide com auxílio de seringas de 1mL e agulhas 0,33 X 12,7mm. Os orifícios da casca foram selados com cola branca e os ovos incubados a 36°C, umidade 60% por 48-72h. Em seguida os ovos foram incubados a 4°C por 12 horas (WHO, 2011; OIE, 2012) para posterior coleta. Os ovos foram higienizados com álcool 70% e o líquido alantóide coletado com auxílio de seringas de 10mL e agulhas 40 X 12mm em cabine de biossegurança. O líquido alantóide coletado foi mantido a -80°C até sua utilização.

#### **4.2.3 Extração do RNA**

O líquido alantóide coletado dos ovos inoculados foi utilizado para a extração de RNA total com o kit Purelink™ RNA Mini (AMBION, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante partindo de um volume de 300µL de amostra. O volume de eluição final do RNA total foi de 30µL. O RNA extraído foi mantido a -80°C até a realização da transcrição reversa.

#### **4.2.4 Detecção do EIV por RT-PCR**

Para a confirmação da amplificação viral nos ovos embrionados, foi aplicada a técnica de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia pela

polimerase (PCR) voltada para o gene de matriz (M) (FOUCHIER et al., 2000), conservado entre os vírus influenza A.

A reação de RT foi conduzida com o *primer* universal para os vírus influenza A, Uni12 (5'-NNAGCRAAAGCAGGNNN-3') (modificado de HOFFMANN et al., 2001), utilizando 1X *First Strand Buffer*, 10mM de DTT, 1mM de dNTP, 2,5 µM do *primer*, 200U de SuperScript™ III (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 6 µL do RNA extraído previamente desnaturado a 95°C por 5 minutos, e H<sub>2</sub>O ultrapura livre de RNase e DNase q.s.p 20 µL, em termociclador com as seguintes condições: 55°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

A reação de PCR foi realizada com 1X PCR Buffer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,023 mM de dNTP, 10 pmol dos *primers* M52C (5'-CTTCTAACCGAGGTTCGAAACG-3') e M253R (5'-AGGGCATTGACAAAG/TCGTCTA-3') (FOUCHIER et al., 2000), 2 U de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2 µL de cDNA obtido na RT, e H<sub>2</sub>O ultrapura livre de RNase e DNase q.s.p.50 µL, em termociclador com o ciclo: 95°C por 4 minutos, 40 vezes de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e como extensão final 72°C por 7 minutos.

O produto de RT-PCR foi aplicado em gel de agarose a 1,5% e submetido à eletroforese em solução TBE 0,5X (ANEXO C) a 100 mVolts. Cinco microlitros de produto de RT-PCR foram misturados a 2 µL de tampão carreador [glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (v/v), xileno cianol 0,25% (v/v)] e padrão de tamanho molecular [1kb *plus DNA ladder* (Invitrogen®)]. Após a migração do produto de RT-PCR pelo gel de agarose, o gel foi corado por imersão em uma solução de brometo de etídeo na concentração de 0,005% em H<sub>2</sub>O (25 µL brometo de etídeo/ 500 mL H<sub>2</sub>O) durante 20 minutos e visualizado sob luz U.V.

#### 4.2.5 Amplificação e sequenciamento dos genes do EIV

A amplificação e sequenciamento dos genes da hemaglutinina (HA) (GILDEA et al., 2012), neuraminidase (NA), matriz (M), polimerase ácida (PA),

polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2), proteína não estrutural (NS) e nucleoproteína (NP) (HOFFMANN et al., 2001) foram realizados no vírus A/equine/São Paulo/1.19/2012 (H3N8) e em isolados do surto de 2015, enquanto os vírus A/equine/São Paulo/16.19/2012 (H3N8) e A/equine/São Paulo/24.19/2012 (H3N8) tiveram o gene HA sequenciados. Modificações em determinados *primers* foram realizadas e estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* modificados aplicados na amplificação e sequenciamento dos vírus da influenza equina

Gene	Referência	<i>Primer</i> (modificado)	<i>Primer</i> (5'- 3', modificado)
HA	Gildea et al., 2012	HAAF	AGCAAAAGCAGGGG
		HACF	ACAGGGAAAAGCTCTG
		HACR	GGCTGCTTGAGTGCTCTT
		HADF	AAGCTGCAGATCTAAAGAGCAC
		HADR	AGTAGAAACAAGGGTCTTTTT
NA	Hoffmann et al., 2001	NAF	AGCAAAAGCAGGAGT
		NAR	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
NS		NSF	AGCAAAAGCAGGGTG

A amplificação dos segmentos foi realizada utilizando 1X *High Fidelity PCR Buffer*, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,28 mM de cada *primer*, 4 µL de cDNA e 1,3 U de *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e H<sub>2</sub>O ultrapura livre de RNase/DNase em volume final de 25 µL por reação. As condições de amplificação dos genes está descrita no quadro 1. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese como descrito no item 4.2.4.

Quadro 1 - Condições aplicadas às reações de amplificação dos genes do EIV por RT-PCR

Gene	Autor dos primers	Ciclo de temperaturas aplicados (Favaro, P. F. 2017)	Tamanho do fragmento (pares de bases)
HA	Gildea et al., 2012	40X { 94°C – 30 seg 94°C – 30 seg 55°C – 20 seg 68°C – 2 min 68°C – 10 min	466pb
			577pb
			343pb
			601pb
NA	Hoffman et al., 2001	20X { 94°C – 30 seg 96°C – 7 seg 53°C – 15 seg 68°C – 2 min e 30 seg	1413pb
20X { 96°C – 7 seg 53°C – 15 seg 68°C – 2 min e 30seg +20 seg por ciclo			
NP		40X { 94°C – 15 seg 96°C - 7 seg 60°C – 15 seg 68°C – 3 min 68°C – 10 min	1565pb
NS		40X { 94°C – 30 seg 94°C – 40 seg 55°C – 30 seg 68°C – 2 min 68°C – 10 min	890pb
M		20X { 94°C – 30 seg 94°C – 20 seg 60°C – 20 seg 68°C – 3 min	1027pb
		20X { 94°C – 20 seg 60°C – 20 seg 68°C – 3 min +20 seg por ciclo	
PA		20X { 94°C – 30 seg 96°C – 7 seg	2233pb
PB1		20X { 63°C – 15 seg 68°C – 3 min	2341pb
PB2	20X { 96°C – 7 seg 63°C – 15 seg 68°C – 3 min +20 seg por ciclo	2341pb	

Os produtos que apresentaram bandas inespecíficas foram purificados a partir do gel de agarose após a eletroforese; os produtos de RT-PCR com bandas únicas foram diretamente purificadas. Em ambos os casos, utilizou-se o kit de purificação Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) de acordo com instruções do fabricante.

As sequências parciais dos oito genes do EIV foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v.3.1 Kit Cycle Sequencing kit (Biosystems, Carlsbad, CA,



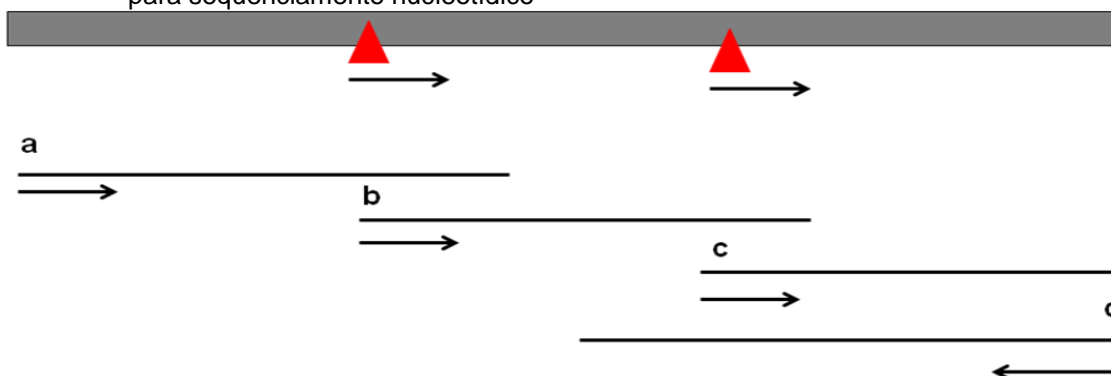
USA) de acordo com instruções do fabricante, utilizando 0,2  $\mu$ M de cada primer em reações separadas. Após a reação, o produto foi precipitado com o seguinte protocolo: adição de 60  $\mu$ L de etanol a 100% e 5  $\mu$ L de EDTA a 125 mM, incubação de 30 minutos em ausência de luz, centrifugação a 16.000 x g a 4°C por 30 minutos, remoção do sobrenadante, acrescentar 60  $\mu$ L de etanol a 70%, centrifugar a 16.000 x g a 4°C por 15 minutos, incubar a placa destampada a 95°C por 5 minutos. Em seguida os produtos foram sequenciados em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante.

*Primers* internos foram desenhados para realizar a reação de sequenciamento visando obter melhores resultados sobre os genes PA, PB1 e PB2 (Tabela 3, Figura 4). A técnica de *primer walking* foi empregada utilizando como sequência-molde os primeiros sequenciamentos obtidos com os *primers* descritos por Hoffmann et al., 2001.

Tabela 3 - *Primers* desenhados para sequenciar fragmentos internos dos genes da polimerase ácida (PA), polimerase ácida 1 (PB1) e polimerase básica 2 (PB2) do vírus da influenza equina com base em sequências obtidas do vírus brasileiro A/equine/São Paulo/1.19/2012

Gene	Primer	Primeiro nucleotídeo no gene	Sequência (5' - 3')
PA (2151 nt)	PAiF	559	CTCTGGGATTCTTTTCGT
	PAiF2	1392	CGTCAACACCGCTCTACT
PB1 (2274 nt)	PB1iF	815	CAGTTGGCGGTAATGAG
	PB1iF2	1406	CTTGCAAACCTGGTCGGG
PB2 (2280 nt)	PB2iF	435	TGATGTAAACCCTGGTCAC
	PB2F2	1230	GATAAAAGCAGTTCGAGGC

Figura 4 - Representação esquemática de *primers* internos (itens b e c) desenhados para os genes PA, PB1 e PB2 do vírus da Influenza equina A/equine/São Paulo/1.19/2012 para sequenciamento nucleotídico



Legenda: PA - a\*: BmPA1; b: PAiF, c: PAiF2, d\*: BmPA2233R.

PB1 - a\*: BmPB1-1, b: PB1iF, c: PB1iF2, d\*: BmPB1-2341R.

PB2 - a\*: BaPB2-1, b: PB2iF, c: PB2F2, d\*: BaPB2-2341R.

\*: HOFFMANN et al., 2001

As sequências obtidas foram alinhadas com auxílio do programa BioEdit® v. 7.1.3.0 (HALL, 1999), com o uso do software ClustalW (LARKIN et al., 2007) e editadas manualmente de acordo com as replicatas do sequenciamento e a confiabilidade inferida com o software FinchTV®.

#### 4.2.6 Clonagem e sequenciamento do gene parcial da hemaglutinina

Quatro isolados de influenza equina do surto de 2015 foram submetidas à amplificação por RT-PCR com os *primers* HA1F e HA466R (GILDEA et al., 2012). Os fragmentos gerados na RT-PCR foram purificados com ExoSAP-It® (USB, Cleveland, OH, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

Os produtos da purificação foram inseridos em vetores pTZ57R/T do Thermo Scientific™ InsTAclone PCR *cloning kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania) e transfectados em *E. coli* (JM109) de acordo com instruções do fabricante. Os clones foram selecionados em meio de cultivo LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio) acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico, 50µg/mL de ampicilina, 40µL de IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside a 100mmol/L) e 40 µL de X-gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactosidade a 50mg/mL).

A confirmação da inserção e amplificação do fragmento do gene da HA foi realizado por meio de PCR com 0,4µM dos *primers* M13/pUC senso (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13/pUC antisenso (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania), 10 µL de DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas) e água livre de DNase e RNase em reação final de 25µL e submetido ao ciclo: 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de [94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos] e extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% e submetidos à eletroforese como descrito no item 4.2.4. Os plasmídeos foram extraídos com o kit Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) e

sequenciados como descrito no item 4.2.5 utilizando os primers M13 senso e antisenso.

#### 4.2.7 Análise Filogenética

As sequências geradas foram aplicadas no *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*) localizado no *Genbank* do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para pesquisar sequências homólogas.

As sequências de M, NP e NS foram alinhadas com ClustalW (LARKIN et al., 2007) no software BioEdit v.7 (HALL, 1999) e as sequências de HA, NA, PA, PB1 e PB2 foram alinhadas com Muscle (EDGAR, 2004), disponível no software MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). As sequências foram alinhadas com sequências homólogas dos diferentes clados disponíveis no *GenBank*.

Os genes HA, NA, M, NP, NS, PA, PB1 e PB2 de diferentes EIVs foram comparados ao *A/equine/São Paulo/1.19/2012*. Sequências representativas das sub-linhagens Flórida 1 (FC1) (*A/equine/South Africa/4/2003* e *A/equine/Ohio/1/2003*), Flórida 2 (FC2) (*A/equine/Richmond/1/2007*; *A/equine/Kentucky/5/2002*, *A/equine/Newmarket/5/2003*), Eurásico (*A/equine/Aboyne/2005*; *A/equine/Berlin/1/1989*; *A/equine/Rome/5/1991*), Americano (*A/equine/Kentucky/1/1994*) e Pré-divergente (PD) (*A/equine/Miami/1/1963*) foram utilizados nas análises (DALY et al., 2011; LEGRAND et al., 2015).

Sequências nucleotídicas de EIVs disponíveis no *EpiFlu™ database of the Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) e no *GenBank* foram inclusos na análise.

A escolha do modelo evolutivo foi realizada com MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), considerando que os melhores modelos tenham menores scores de BIC (*Bayesian Information Criterion*). Para cada modelo, também foram considerados os valores de AICc (*Akaike Information Criterion, corrected*) e lnL (valor de Maximum Likelihood) (NEI; KUMAR, 2000). A não uniformidade das

taxas evolutivas entre sítios foi modelada utilizando distribuição discreta Gama com cinco categorias.

As árvores filogenéticas nucleotídicas foram construídas através do mesmo *software*, com o método de inferência Maximum-likelihood, modelo de substituição Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985) com distribuição discreta Gama e 1000 repetições de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) para testar a confiabilidade dos ramos. A diversidade média evolutiva e distâncias para a HA (representando os códons completos) foram estimados com MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

As sequências de nucleotídeos do gene HA de dez isolados brasileiros de 2015 foram comparados com o intuito de avaliar a variação genética inter-hospedeiro desses EIVs.

A análise de perfil de hidrofobicidade na escala Eisenberg das sequências de HA e NA foi realizada com sequências obtidas no presente estudo, dos anos de 2012 e 2015, comparadas às sequências dos genes correspondentes da estirpe vacinal A/equine/South Africa/4/2003. O perfil de hidrofobicidade foi construído com o software BioEdit v.7.2.5 (HALL, 1999).

#### 4.2.8 Análise Evolutiva

A diversidade e distância médias entre as sequências completas de HA e entre os clones da sequência parcial da HA foram calculadas com MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Um teste de relógio molecular foi realizado para 78 sequências nucleotídicas da subunidade 1 da HA (HA1 - nucleotídeos 1 ao 987) de EIVs deste trabalho e em sequências disponíveis no GenBank e GISAID, representando os cinco clados dos EIVs. O teste foi realizado com o método de Maximum Likelihood, modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985) com distribuição discreta Gama com MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

As taxas de substituição de nucleotídeos e as relações filogenéticas foram acessadas através da análise *Bayesian Markov Chain Monte Carlo* (MCMC)

(DRUMMOND et al., 2002) utilizando o *software* BEAST v.1.7.5 (DRUMMOND et al., 2012) com o modelo HKY, quatro categorias de variação de taxa de distribuição gama (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985). Os relógios moleculares *relaxed* (*lognormal* e *exponential*) foram calibrados utilizando as datas das estirpes virais. O tamanho efetivo amostral (ESS - *effective sample size*) foi calculado por Tracer v.1.6.0 (RAMBAUT et al., 2013) e a árvore de máxima credibilidade (MCC - *Maximum Clade Credibility*) baseada no relógio molecular visualizado com FigTree 1.4.2 (RAMBAUT, 2014).

#### 4.2.9 Anticorpos contra o vírus Influenza A

Um kit comercial de detecção do vírus influenza A foi empregado nos soros séricos dos cavalos (dia 0 e 15 após primeiros sintomas) relacionados ao surto de EI no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em setembro de 2015.

O teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) *FlockChek*® Avian MultiS-Screen Antibody Test Kit - IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, EUA) foi desenvolvido para detectar anticorpos contra a nucleoproteína (NP) viral, altamente conservada entre os vírus Influenza A. O teste consiste em um ELISA competitivo em que quanto maior a concentração de anticorpos específicos, menor será o valor resultante do teste. O valor de S/N é obtido pela razão entre o densidade ótica (OD - *optical density*) da amostra após leitura em filtro 650 nm pela média do controle negativo do kit. Amostras com valor de S/N  $\leq 0,60$  foram consideradas positivas e  $> 0,60$  negativos para a presença de anticorpos contra Influenza A.

O procedimento de ELISA foi realizado no Laboratório de Sanidade Aviária do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Campinas - SP, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo são descritos nos itens seguintes.

### 5.1 DESCRIÇÃO DO SURTO DE INFLUENZA EQUINA

Vinte e seis dos 32 equídeos (29 equinos adultos, dois potros e um pônei) apresentaram ao menos um dos sinais clínicos de EI no período de oito dias. Os sinais clínicos observados nos animais foram: secreção nasal (Figura 5), tosse seca e espirros. Alguns animais apresentaram febre, inapetência e congestão de mucosa.

Figura 5 - Pônei apresentando secreção nasal resultante de um quadro de influenza equina no Hospital Veterinário da FMVZ em setembro de 2015



Fonte: Favaro, P. F.

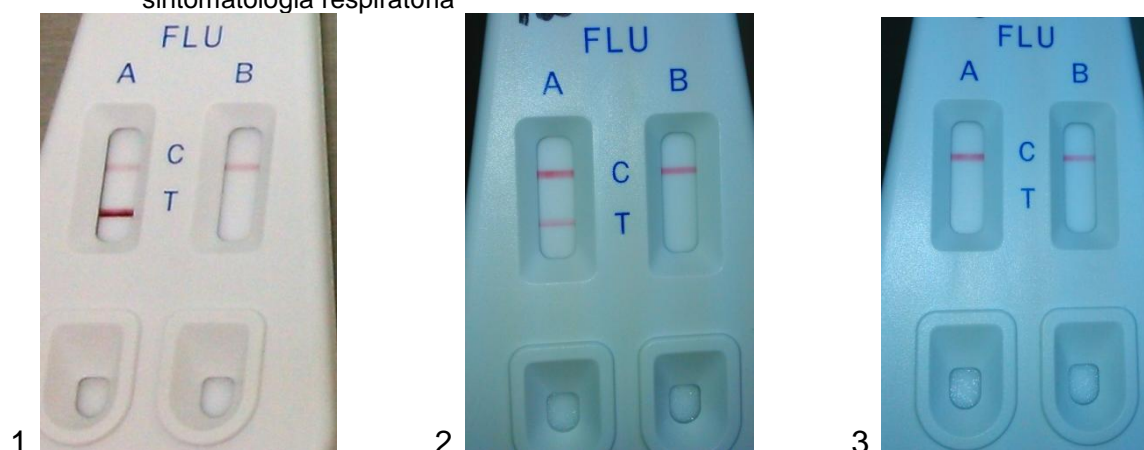
Dentre os 32 animais, dez cavalos haviam sido imunizados com vacina contendo a estirpe A/equine/Kentucky/1997 e dois animais foram imunizados com uma vacina que continha as estirpes A/equine/South Africa/4/2003 e A/equine/Kentucky/1994. Três equinos foram vacinados porém não havia

histórico vacinal completo disponível. Dois pôneis eram de éguas vacinadas porém sem o histórico vacinal completo disponível. Os demais animais tinham o histórico vacinal desconhecido para EIV.

## 5.2 DETECÇÃO DO EIV E ISOLAMENTO VIRAL

A triagem inicial dos treze animais com sintomas respiratórios mediante a utilização do kit de diagnóstico direto Directigen™ EZ FluA & B (BD, Sparks, MD, USA) em amostras de *swabs* nasais resultou em seis animais negativos, um inconclusivo e seis animais positivos para influenza A (Figura 6).

Figura 6 - Teste rápido Directigen™ EZ Flu A+B (BD™) para detecção da nucleoproteína (NP) do vírus da Influenza A. Teste realizado com amostra de *swab* nasal de equino com sintomatologia respiratória



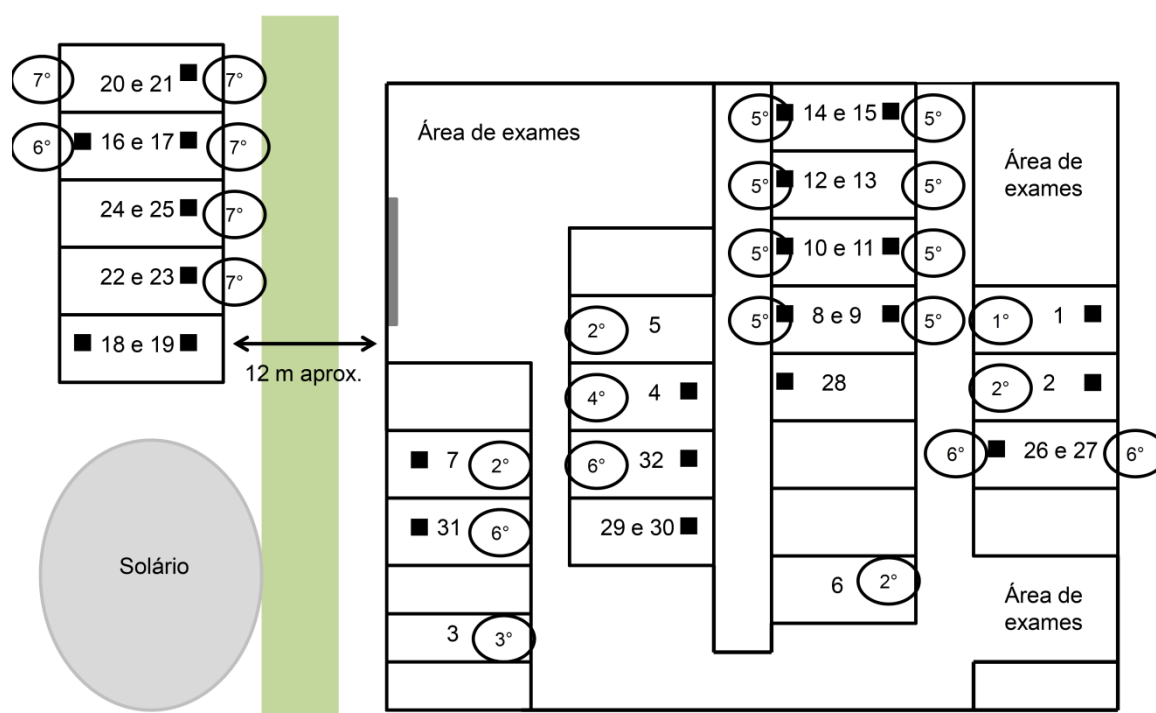
Notas: 1: controle positivo; 2: amostra positiva para influenza A; 3: amostra negativa para influenza A.

Após a confirmação da presença do vírus influenza A nas amostras clínicas, os 32 animais tiveram *swabs* nasais coletados e testados por RT-PCR para o gene de matriz (FOUCHIER et al., 2000; HOFFMANN et al., 2001), resultando em 23 animais positivos para influenza A.

A esquematização do setor de equinos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com a descrição da localização dos animais durante o surto e o respectivo

resultado na triagem para influenza A está disponível na figura 7. Cada corredor de baias possui uma área de exame correspondente. Há uma área de aproximadamente 12 metros de distância entre a edificação e os estábulos que estão próximos ao solário. Os dez animais que estavam estabulados próximo ao solário faziam parte de um estudo da Faculdade que não tinham envolvimento do trato respiratório, eram adultos, sadios e não havia envolvimento de agentes infecciosos.

Figura 7 - Análise dos animais residentes e internados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo durante a suspeita de surto de influenza equina ocorrido em setembro de 2015



Notas: Números indicam os animais estabulados. A indicação de 1° ao 7° refere-se à ordem de aparecimento de sinais clínicos sugestivos de influenza equina.

Legenda: ■ Positivo para influenza A na triagem pelo teste rápido e/ou por RT-PCR.

Oito animais tiveram lavados trans-traqueais coletados juntamente com os *swabs* nasais e ambas as amostras foram testadas por RT-PCR. Dentre estes, sete *swabs* e três lavados foram positivos para influenza A.

A fim de realizar a tentativa de isolamento viral, 23 amostras clínicas positivas na triagem pela RT-PCR foram inoculadas em cavidade alantóide de ovos embrionados de galinha SPF com 10 dias de embrião (WHO, 2011), realizando no máximo duas passagens. As amostras positivas para RT-PCR



foram consideradas como isolamento viral. Doze EIVs foram isolados em ovos embrionados das 23 amostras positivas na RT-PCR; seis dos isolados foram originados de lavados traqueais e seis de *swabs* nasais.

Doze dos 15 equinos vacinados foram infectados com EIV, dois destes haviam recebido a vacina contendo a estirpe recomendada pela OIE (A/equine/South Africa/4/2003) e oito receberam a vacina contendo A/equine/Kentucky/1997.

### 5.3 PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS INFLUENZA A

Soros pareados foram coletados de todos os 32 animais que estavam hospitalizados ou que estavam estabulados no Hospital Veterinário da FMVZ/USP para a realização do teste de ELISA competitivo indireto. O teste foi realizado no Laboratório de Sanidade Aviária, LANAGRO-Campinas, MAPA, que realiza rotineiramente o exame em amostras de aves suspeitas de infecção pelo vírus influenza A.

Os títulos de anticorpos contra influenza A aumentaram entre os animais que foram positivos para EI, sendo S/N 1,0918 (95% CI: 0,8612; 1,3225) no primeiro dia de coleta e S/N 0,2620 (95% CI: 0,1607; 0,3633) na segunda coleta, feita 15 dias após a primeira. Aumentos de anticorpos para influenza A também foram identificados na sorologia pareada dos animais que foram negativos para EI [S/N 0,6626 (0,3437; 0,9815) na primeira coleta e S/N 0,3615 (0,0995; 0,6235) na segunda coleta].

A descrição dos resultados dos testes diagnósticos realizados nas amostras de *swabs* nasais, lavados traqueais e soro de equídeos do surto de EIV no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Descrição dos resultados dos testes diagnósticos, isolamento viral e histórico vacinal dos equídeos com sintomas respiratórios durante uma suspeita de surto de influenza equina no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo no ano de 2015

Animal	Vacinação	Início dos sinais clínicos (m/dd/aa)	Triagem			Isolamento viral	ELISA (S/N)	
			Teste rápido	RT-PCR			dia 1	dia 15
				Swab	Lavado traqueal			
1	SA/4/03 KY/94	9/14/15	-	+	NR	-	0,109	0,111
2	SA/4/03 KY/94	9/16/15	-	+	NR	-	0,111	0,123
3	*	9/17/15	-	-	NR	NR	0,616	0,12
4	*	9/18/15	I	+	NR	+	1,413	0,498
5	*	9/16/15	-	-	NR	NR	0,186	0,264
6	*	9/16/15	-	-	NR	NR	0,146	0,191
7	*	9/16/15	+	+	NR	-	0,559	0,237
8	*	9/19/15	NR	+	+	+	1,661	0,229
9	*	9/19/15	NR	+	-	-	0,859	0,114
10	*	9/19/15	+	+	+	+	0,962	0,22
11	*	9/19/15	+	+	-	+	0,882	0,091
12	*	9/19/15	+	+	-	+	1,668	0,273
13	*	9/19/15	-	-	-	NR	0,266	0,161
14	*	9/19/15	+	+	-	+	1,473	0,225
15	*	9/19/15	+	+	+	+	1,511	0,123
16	KY/97	9/21/15	NR	+	NR	-	1,663	0,246
17	KY/97	9/22/15	NR	+	NR	-	1,198	0,232
18	KY/97	N	NR	+	NR	+	0,421	0,118
19	KY/97	N	NR	+	NR	-	1,177	0,195
20	KY/97	9/22/15	NR	-	NR	NR	1,121	0,195
21	KY/97	9/22/15	NR	+	NR	-	1,355	0,254
22	KY/97	N	NR	-	NR	NR	1,261	0,198
23	KY/97	9/22/15	NR	+	NR	-	1,498	0,134
24	KY/97	N	NR	-	NR	NR	1,048	0,207
25	KY/97	9/22/15	NR	+	NR	+	1,241	0,104
26	vacinado	9/21/15	NR	+	NR	+	0,461	0,38
27	Potro-26	9/21/15	NR	-	NR	NR	0,718	0,954
28	*	9/22/15	NR	+	NR	-	0,371	0,188
29	vacinado	N	NR	-	NR	NR	0,602	0,964
30	Potro-29	N	NR	+	NR	+	1,454	0,655
31	vacinado	9/21/15	NR	+	NR	-	1,107	1,143
32	*	9/21/15	NR	+	NR	+	1,959	0,134
Total	15	26	6/13	23/32	3/8	12/23		

Nota: S/N: razão entre a densidade óptica do soro em relação ao controle negativo do kit diagnóstico; \*: histórico vacinal não disponível; vacinado: relato de vacinação porém sem descrição das estirpes vacinais utilizadas; N: sem sinais clínicos; NR; não realizado; I: inconclusivo; SA/4/03: A/equi/South Africa/4/2003; KY/94: A/equi/Kentucky/1994; KY/97: A/equi/Kentucky/1997. Potro-26: potro da matriz n°26; Potro-29: potro da matriz n°29.

#### 5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Dentre os doze isolados do surto de 2015, dez tiveram a hemaglutinina sequenciada. Seis sequências de 2015 (A/equine/São Paulo/8.FMVZ/2015, A/equine/São Paulo/10.FMVZ/2015, A/equine/São Paulo/11.FMVZ/2015, A/equine/São Paulo/12.FMVZ/2015, A/equine/São Paulo/15.FMVZ/2015 e A/equine/São Paulo/32.FMVZ/2015) compreenderam os códons completos do gene da HA (1698 nt), que inclui o peptídeo sinalizador (nt 1 - 45), quatro sequências foram segmentos parciais da proteína não clivada: nucleotídeos 1 ao 1016 (A/equine/São Paulo/4.FMVZ/2015), 27 ao 1698 (A/equine/São Paulo/25.FMVZ/2015), 1 ao 1165 (A/equine/São Paulo/30.FMVZ/2015) e 1 ao 437 (A/equine/São Paulo/18.FMVZ/2015), este último por meio de clonagem.

Cinco sequências do gene da neuraminidase foram obtidas (SP/8, SP/10, SP/12, SP/15, SP/25) compreendendo os nucleotídeos 53 a 1366, sem diferença nucleotídica entre estas. Considerando a estirpe A/equine/São Paulo/8.FMVZ/2015 representativa para o gene NA, esta teve o gene NA melhor cobertura de sequenciamento, resultando em uma sequência compreendendo os nucleotídeos 28 a 1395.

A fim de comparar os vírus provenientes do surto de EIV de 2015, três EIVs foram cedidos pelo Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico de São Paulo. Os três isolados cedidos eram provenientes de um surto de EI ocorrido em 2012 em uma propriedade na cidade de São Paulo (A/equine/São Paulo/1.19/2012, A/equine/São Paulo/16.19/2012 e A/equine/São Paulo/24.19/2012) e tiveram o gene da hemaglutinina sequenciados. Em adição, os oito genes (partes codificantes completas) do isolado A/equine/São Paulo/1.19/2012 foram sequenciados.

A relação dos vírus obtidos de 2012 e dos isolados de 2015, associados aos respectivos genes parciais ou completos sequenciados estão descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Relação de amostras de EIV obtidas ou isoladas no presente trabalho e os respectivos genes e as sequências parciais ou completas codificadoras de proteínas

Isolado	Gene parcial ou completo sequenciado							
	HA	NA	NS	M	NP	PA	PB1	PB2
SP/1.19/12	C	C	C	C	C	C	C	C
SP/16.19/12	C	-	-	-	-	-	-	-
SP/24.19/12	C	-	-	-	-	-	-	-
SP/4.FMVZ/15	P	-	C	-	-	-	-	-
SP/8.FMVZ/15	C	P	C	C	P	P	P	P
SP/10.FMVZ/15	C	P	-	-	C	-	-	P
SP/11.FMVZ/15	C	-	C	-	P	P	P	-
SP/12.FMVZ/15	C	P	C	-	-	P	P	P
SP/14.FMVZ/15	-	-	-	-	-	-	-	-
SP/15.FMVZ/15	C	P	-	-	C	P	-	-
SP/18.FMVZ/15	P	-	C	-	-	-	-	-
SP/25.FMVZ/15	P	P	-	-	-	-	-	-
SP/26.FMVZ/15	-	-	-	-	-	-	-	-
SP/30.FMVZ/15	P	-	C	-	-	-	-	-
SP/32.FMVZ/15	C	-	-	-	-	-	-	-

Nota: SP: abreviação para A/equine/São Paulo.

Legenda: P: parcial; C: completa; (-): sem sequência obtida.

As sequências nucleotídicas dos isolados de 2012 e 2015 foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso: (2012) KJ955628, KM032366 a KM032369 e KM190933 a KM190935; (2015) KX954135 a KX954164 e MG002443 a MG002464. Os números de acesso das sequências utilizadas nas análises do presente estudo estão descritos em anexo A.

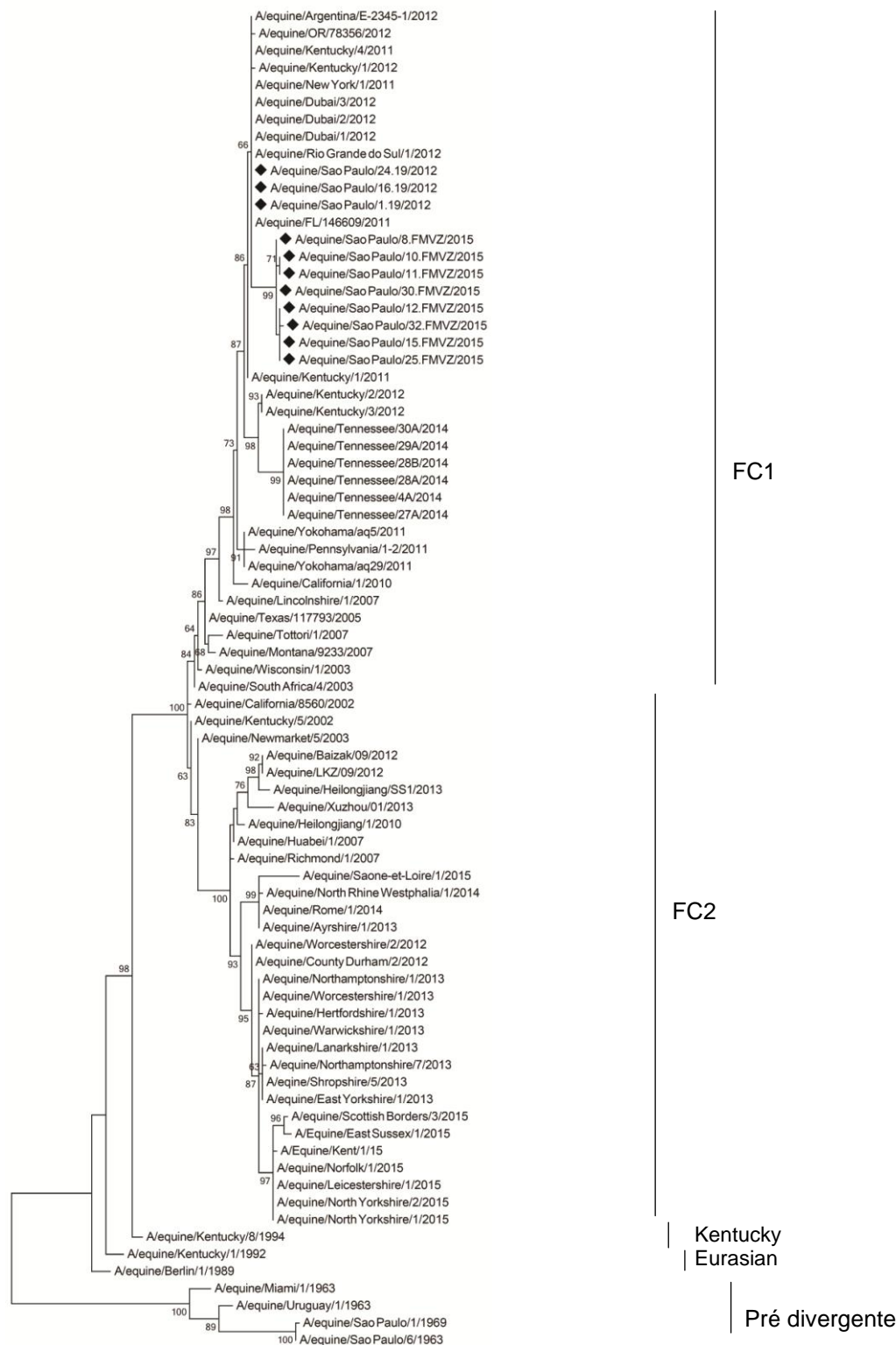
Durante a análise inicial das sequências de aminoácidos foram identificadas duas mutações no gene HA entre as amostras virais. A diferente combinação dessas mutações nos isolados virais indica a existência de três variantes virais (Tabela 5).

Tabela 5 - Amostras virais obtidas de equídeos com sintomas respiratórios coletados durante uma suspeita de surto de influenza equina na cidade de São Paulo no ano de 2015 que apresentaram duas mutações no gene codificante da parte globular da glicoproteína hemaglutinina

Variante	Amostra	Resíduo 121	Códon	Resíduo 304	Códon
V1	8/2015	T	ACA	K	AAA
V2	10/2015	T	ACA	E	GAA
V2	11/2015	T	ACA	E	GAA
V3	12/2015	S	TCA	K	AAA
V3	15/2015	S	TCA	K	AAA
V3	25/2015	S	TCA	K	AAA
V1	30/2015	T	ACA	K	AAA
V3	32/2015	S	TCA	K	AAA

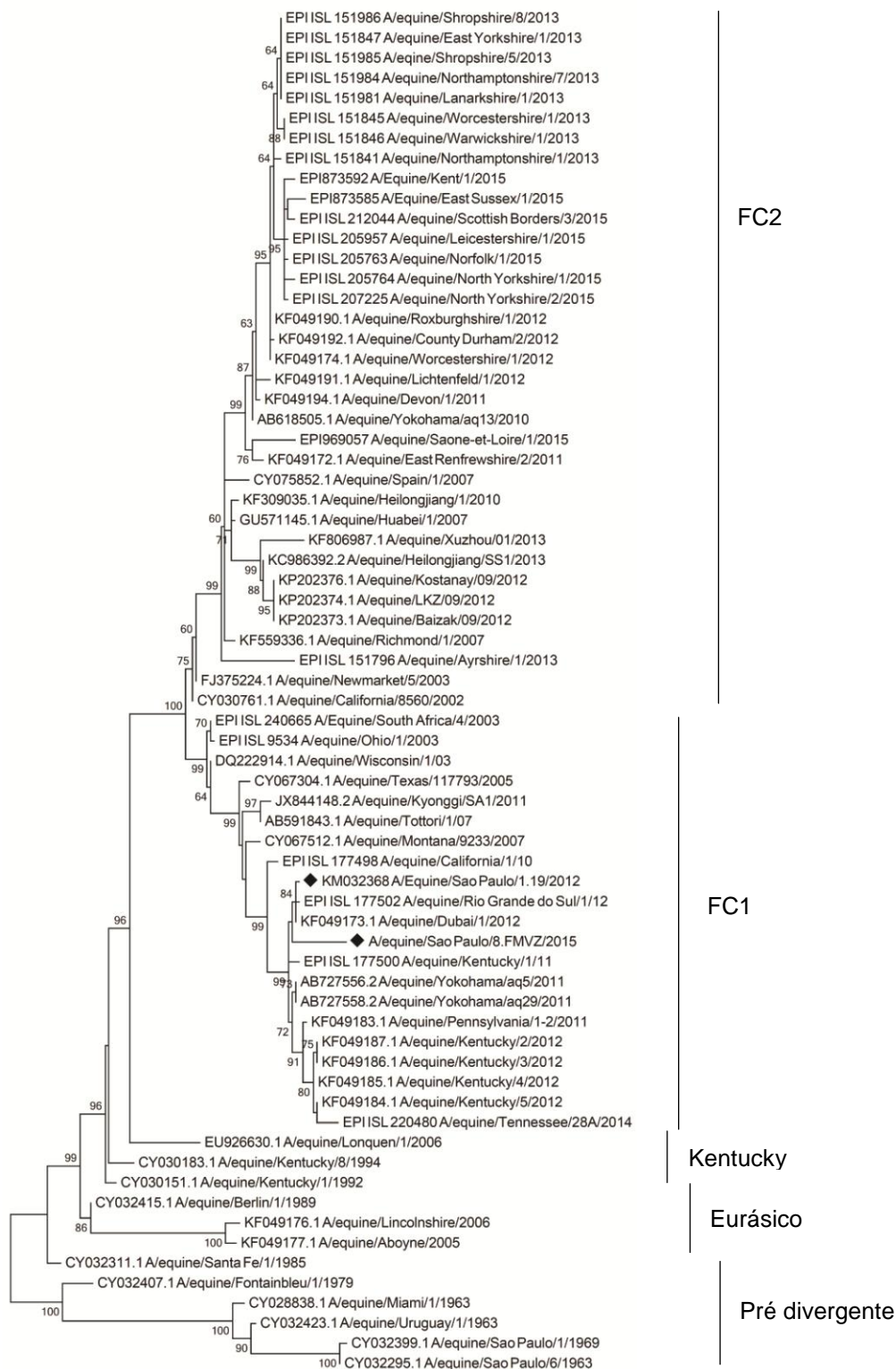
As árvores filogenéticas com base nas sequências parciais de nucleotídeos correspondentes aos genes HA, NA, NP, NS, PA, PB1 e PB2 estão apresentadas nas figuras 8 a 15.

Figura 8 - Árvore filogenética com base em 78 sequências de nucleotídeos da sub-unidade HA1 de EIVs (H3N8) construída pelo modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



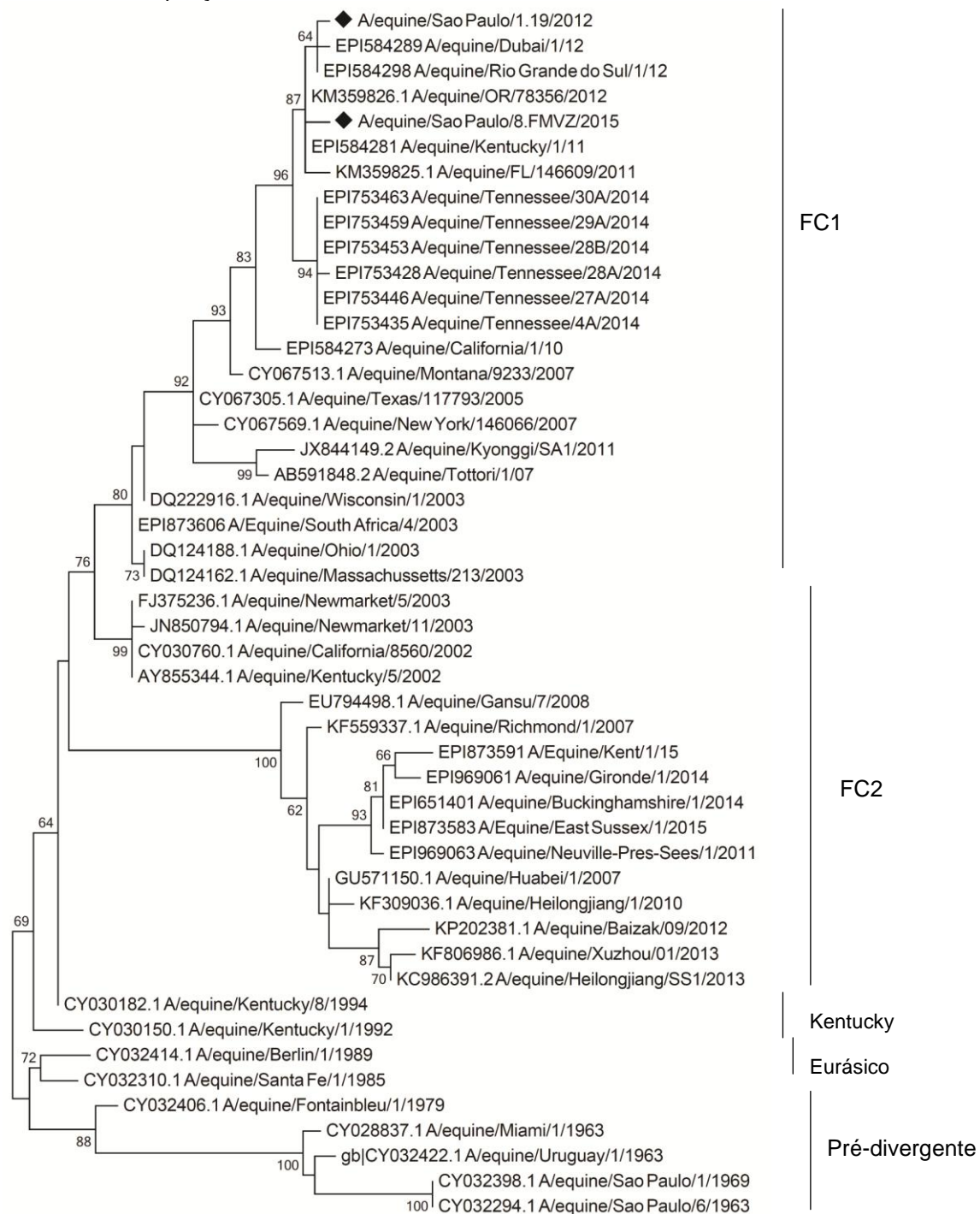
Nota: Foram utilizadas sequências obtidas no presente trabalho e sequências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurasian e Pre-divergence. A análise foi baseada nos nucleotídeos HA1 (1– 987). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

Figura 9 - Árvore filogenética com base em 68 seqüências de nucleotídeos da neuraminidase (NA) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



Nota: Foram utilizadas seqüências obtidas no presente trabalho e seqüências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurasian e Pre-divergence. A análise foi baseada nos nucleotídeos NA (23– 1395). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

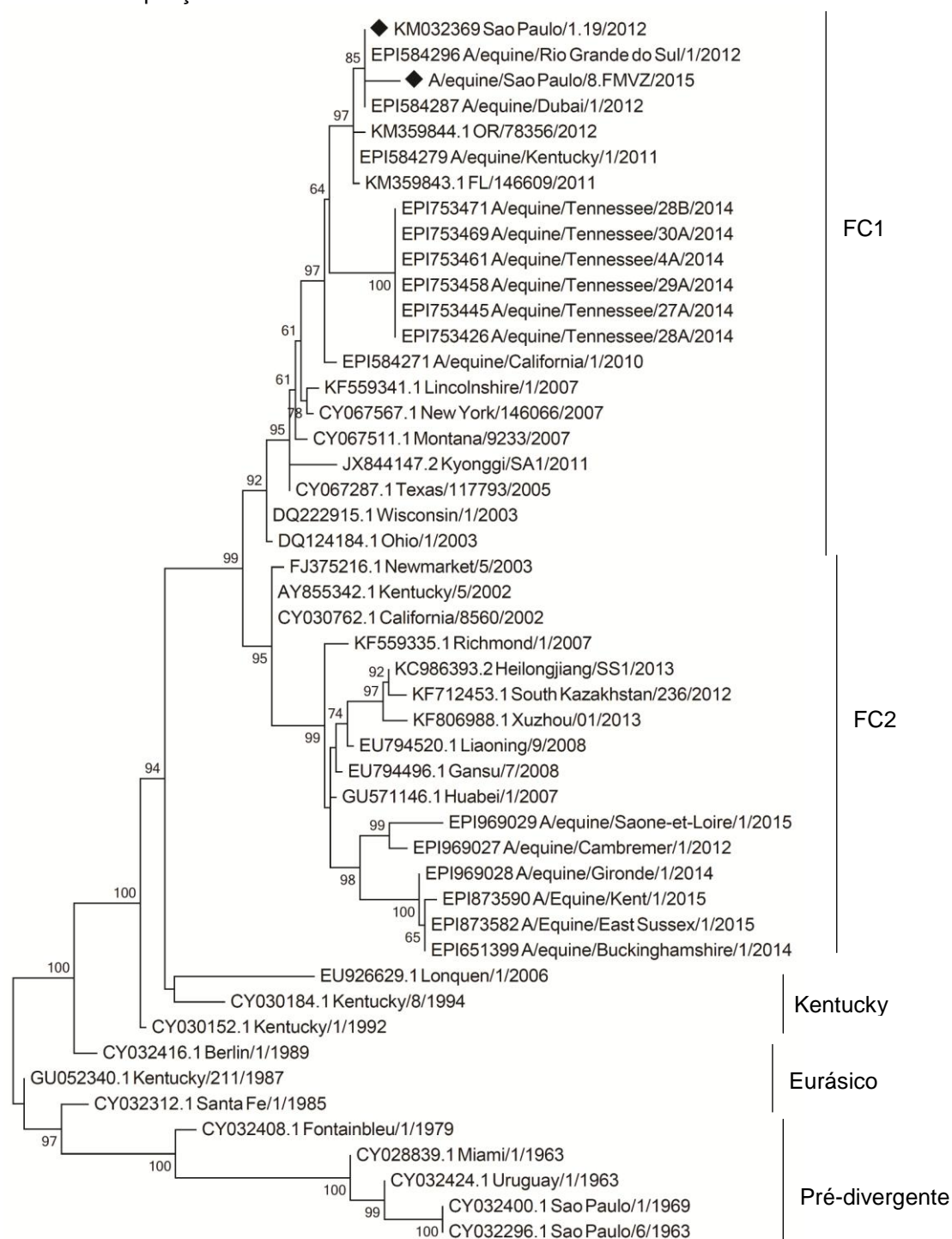
Figura 10 - Árvore filogenética com base em 48 sequências de nucleotídeos de matriz (M) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



Nota: Foram utilizadas sequências obtidas no presente trabalho e sequências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurasian e Pre-divergence. A análise foi baseada nos nucleotídeos M (1 – 982). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

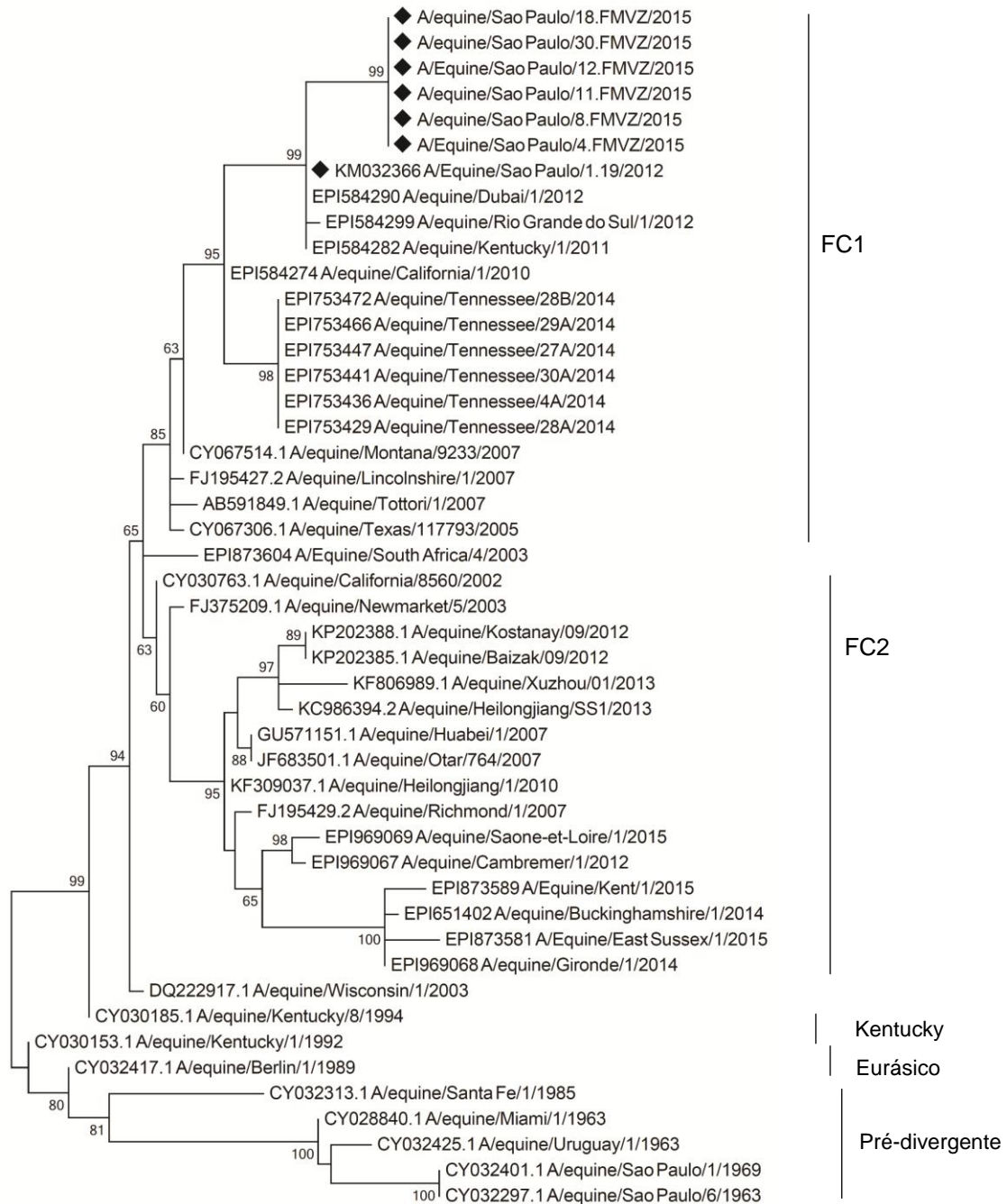


Figura 11 - Árvore filogenética com base em 48 seqüências de nucleotídeos de nucleoproteína (NP) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições.



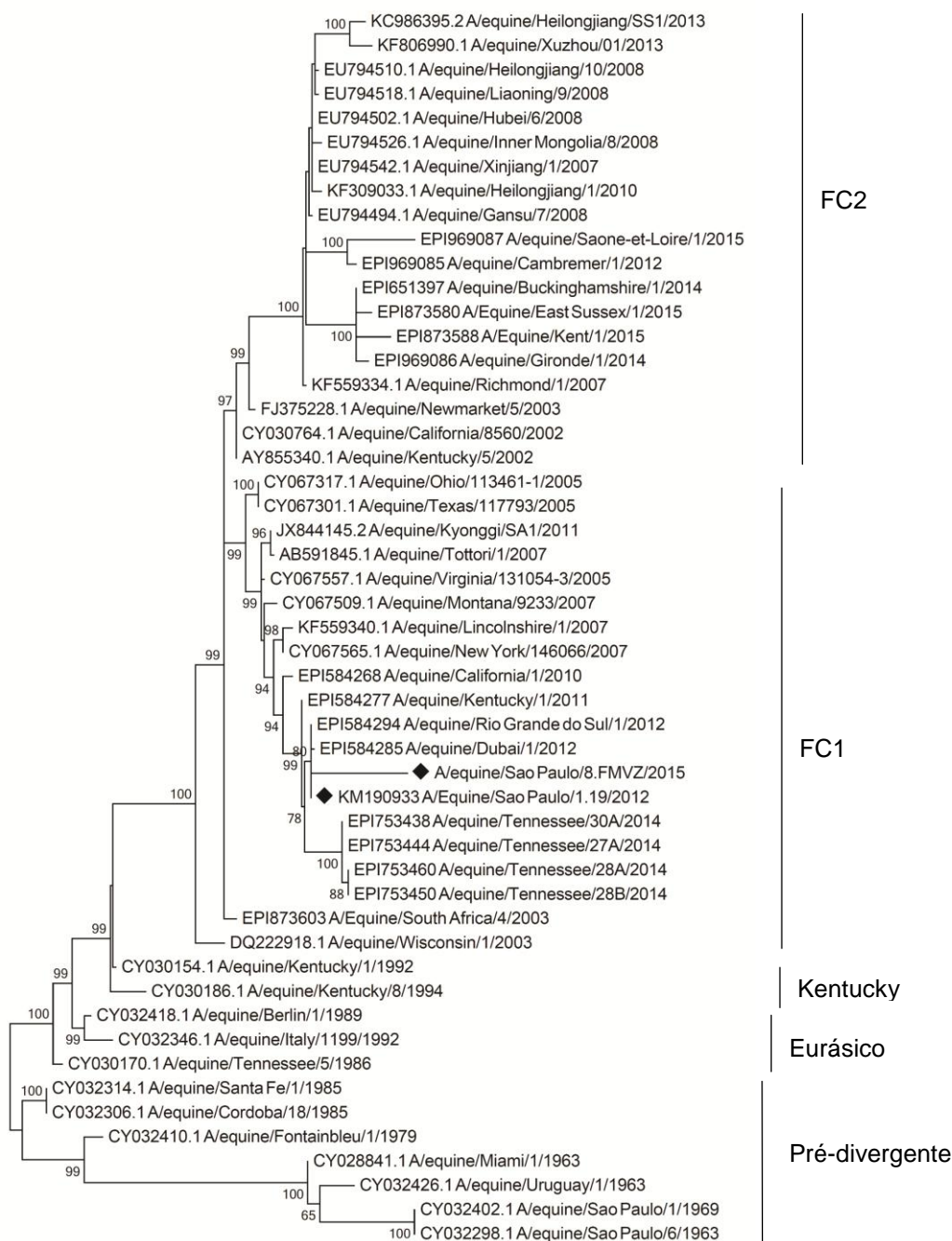
Nota: Foram utilizadas seqüências obtidas no presente trabalho e seqüências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurasian e Pre-divergence. A análise foi baseada nos nucleotídeos NP (1 – 1487). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

Figura 12 - Árvore filogenética com base em 47 seqüências de nucleotídeos da proteína não estrutural (NS) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



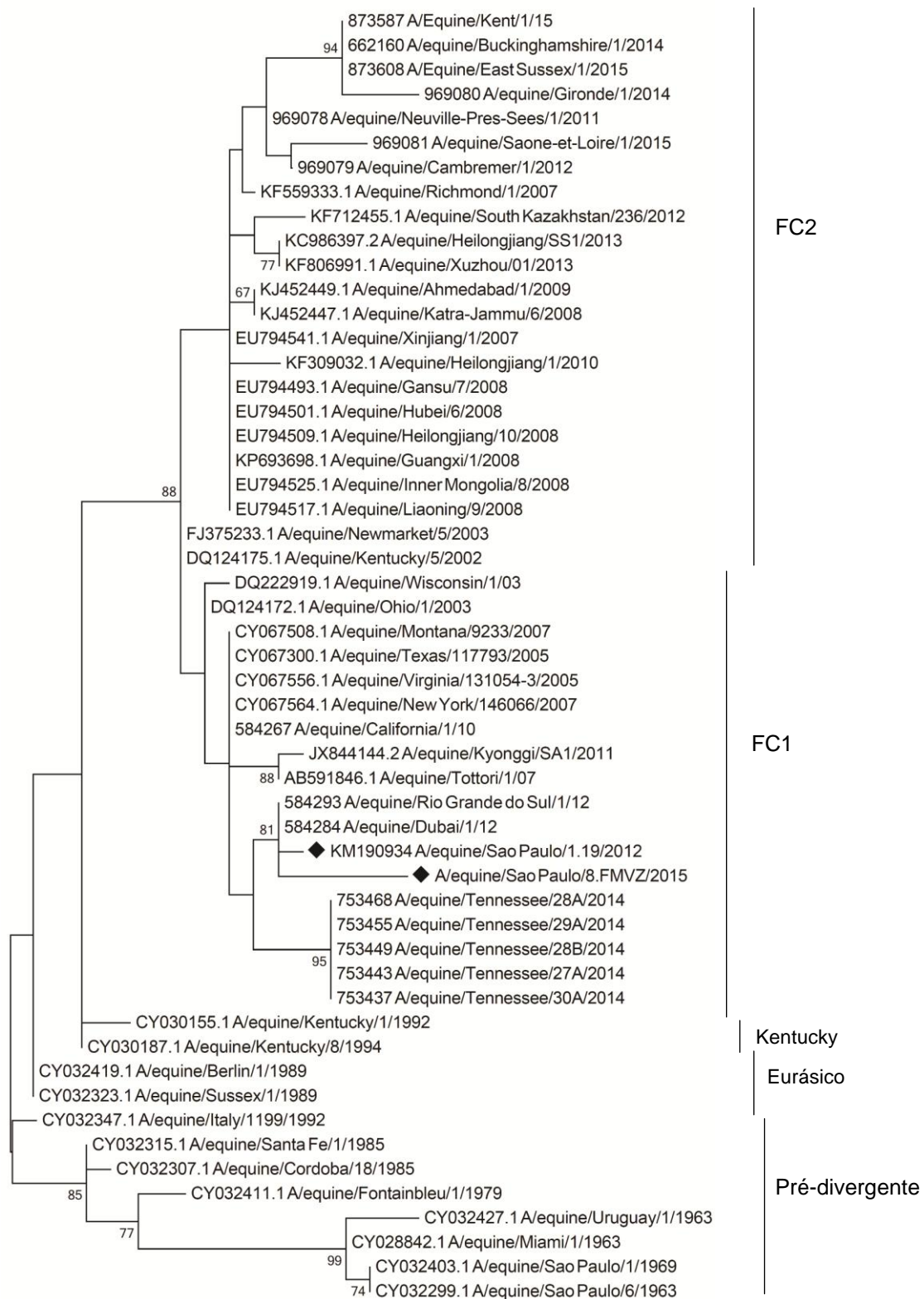
Nota: Foram utilizadas seqüências obtidas no presente trabalho e seqüências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurásico e Pre-divergente. A análise foi baseada nos nucleotídeos NS (1– 838). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

Figura 13 - Árvore filogenética com base em 51 seqüências de nucleotídeos da polimerase ácida (PA) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



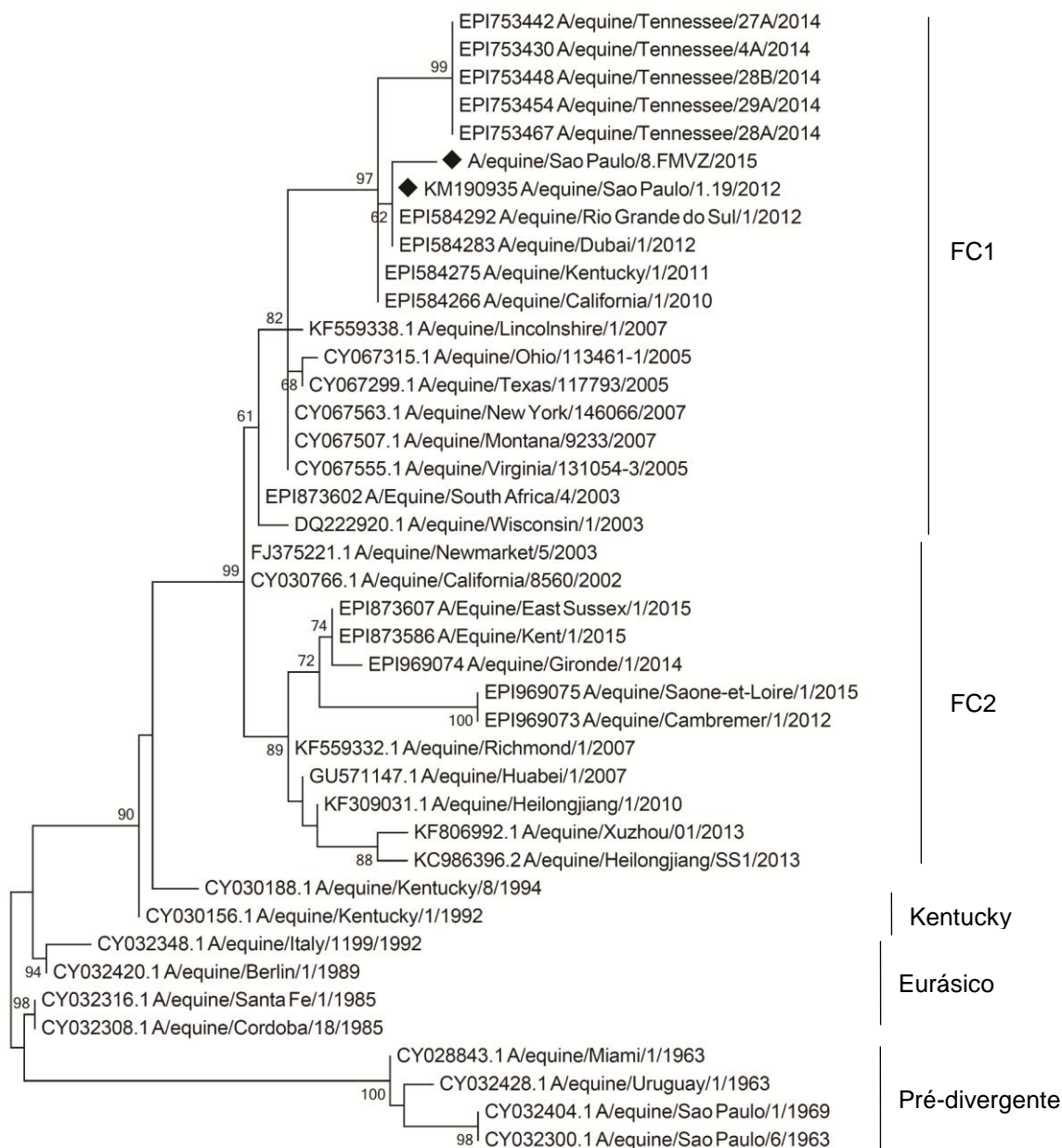
Nota: Foram utilizadas seqüências obtidas no presente trabalho e seqüências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurásico e Pré-divergente. A análise foi baseada nos nucleotídeos PA (7 – 2151). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

Figura 14 - Árvore filogenética com base em 53 sequências de nucleotídeos da polimerase básica 1 (PB1) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



Nota: Foram utilizadas sequências obtidas no presente trabalho e sequências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurásico e Pré-divergente. A análise foi baseada nos nucleotídeos PB1 (1 – 346). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

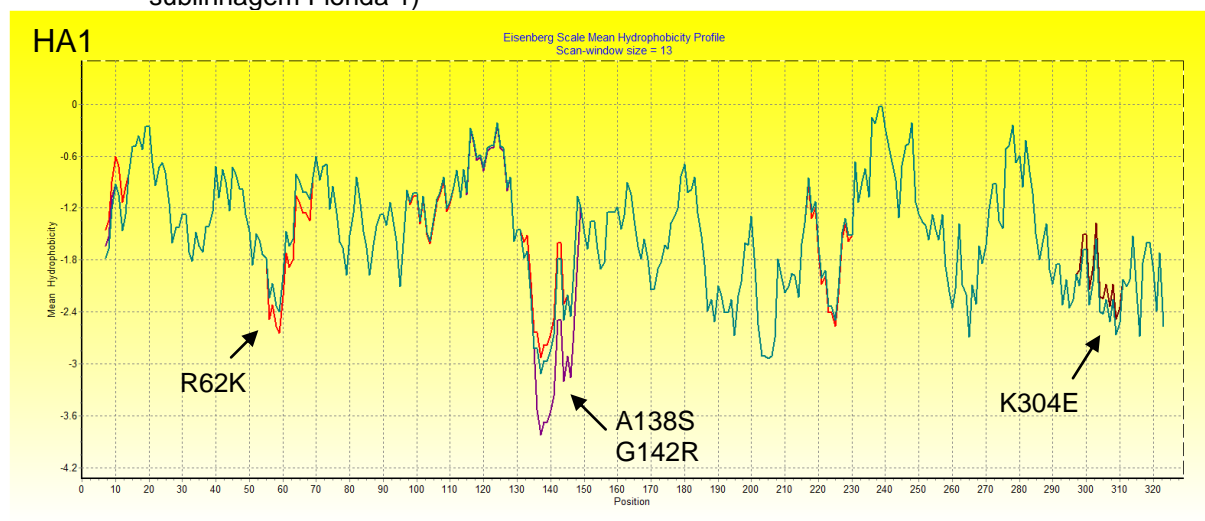
Figura 15 - Árvore filogenética com base em 41 seqüências de nucleotídeos da polimerase básica 2 (PB2) de EIVs (H3N8) construída pelo modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), cinco categorias de distribuição gama, método Maximum Composite Likelihood e bootstrap de 1000 repetições



Nota: Foram utilizadas seqüências obtidas no presente trabalho e seqüências disponíveis no GenBank e GISAID EpiFlu database. FC1 - Florida Clade 1, FC2 - Florida Clade 2, Kentucky, Eurásico e Pré-divergente. A análise foi baseada nos nucleotídeos PB2 (1695 – 2280). Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

A hidrofobicidade da HA1 mudou nos resíduos 62, 138 e 142 nas variantes V1, V2 e V3 e no resíduo 304 na variante V2, em comparação com a estirpe A/equine/South Africa/4/2003 (Figura 16). As substituições dos resíduos 142 e 304, encontradas nos isolados São Paulo-2015, não estavam presentes na estirpe São Paulo-2012.

Figura 16 - Perfil da média de hidrofobicidade pela escala Eisenberg para a proteína HA1 dos isolados São Paulo/2015, São Paulo/2012 e South Africa/4/2003 (representante da sublinhagem Florida 1)



Nota: Os perfis foram construídos utilizando o software BioEdit v.7.2.5 (HALL, 1999). Foram utilizadas sequências de aminoácidos da proteína HA1 completa.

Red	A/equine/South_Africa/4/2003
Blue	A/equine/Sao_Paulo/8.FMVZ/2015
Green	A/equine/Sao_Paulo/10.FMVZ/2015
Brown	A/equine/Sao_Paulo/11.FMVZ/2015
Black	A/equine/Sao_Paulo/12.FMVZ/2015
Dark Blue	A/equine/Sao_Paulo/15.FMVZ/2015
Pink	A/equine/Sao_Paulo/25.FMVZ/2015
Cyan	A/equine/Sao_Paulo/30.FMVZ/2015
Purple	A/equine/Sao_Paulo/32.FMVZ/2015
Teal	A/equine/Sao_Paulo/1.19/2012

Legenda:

As substituições ocorridas na NA também causaram mudança no perfil de hidrofobicidade para essa proteína (Figura 17). Os isolados São Paulo/2015 tiveram 38 (nt) e 10 (aa) substituições em relação a A/equine/South Africa/4/2003: o resíduo V35A na hélice transmembrana e nove outras mutações no domínio globular da proteína NA. As numerações dos sítios ativos da NA (H3N8) seguiram o padrão de contagem da N2<sup>9</sup>.

Figura 17 - Perfil da média de hidrofobicidade pela escala Eisenberg para a proteína NA dos isolados São Paulo/2015, São Paulo/2012 e South Africa/4/2003 (representante da sublinhagem Florida 1)



Nota: Os perfis foram construídos utilizando o software BioEdit v.7.2.5 (HALL, 1999). Foram utilizadas seqüências parciais de aminoácidos (resíduos de aminoácidos 10 ao 465) da proteína NA.

■ A/Equine/South\_Africa/4/2003  
■ A/equine/Sao\_Paulo/8.FMVZ/2015  
■ A/Equine/Sao Paulo/1.19/2012

Legenda:

Cinco novas substituições de resíduos ocorreram na NA dos EIVs São Paulo/2015 que não foram encontradas nas estirpes anteriores brasileiras de 2012, A/equine/São Paulo/1.19/2012 e A/equine/Rio Grande do Sul/1/2012: L36P, R40G, R171K, E411G e H450Y. Os vírus brasileiros de 2012 e 2015 têm em comum as substituições V35A, N205S, R260K, S337N e G416E quando comparados a A/equine/South Africa/4/2003.

As substituições de aminoácidos nas predições das proteínas dos vírus brasileiros de São Paulo, 2012 e 2015, em relação aos EIVs representantes da sublinhagem Florida 1, A/equine/South Africa/4/2003, A/equine/Ohio/1/2003 no caso da PB1, são descritas no quadro 3.

Quadro 3 - Substituições de aminoácidos das estirpes virais A/equine/Sao Paulo/1.19/2012 e A/equine/São Paulo/8.FMVZ/2015 em comparação com o vírus A/equine/South Africa/4/2003, (A/equine/Ohio/1/2003 no caso de PB1) representante da sublinhagem Florida 1

Segmento	Proteína	A/equine/Sao Paulo/1.19/2012	A/equine/São Paulo/8.FMVZ/2015
1	PB2 nt 1-2280 759aa	I63V, T377A <sup>b</sup> , I398V, K660R, V667I, A684T <sup>a</sup> , V686I	<b>T598A<sup>b</sup></b> , K660R, V667I, A684T <sup>a</sup> , V686I (Resíduos 566-760)
2	PB1 nt 1-2274 257aa  PB1-F2 nt 95-246 81aa  PB1-N40 nt 118-2274 718aa	F94L, P100S <sup>a</sup> , V200I, G371E <sup>f</sup> , P384S <sup>a</sup> , R584Q <sup>c</sup> , K621R, V644I  G50D <sup>f</sup> , S63Y  F55L, P61S <sup>a</sup> , V161I, R545Q <sup>c</sup> , K582R, V605I	F94L, <b>E97D, F103S<sup>a</sup></b> (Resíduos 1-115) R584Q <sup>c</sup> , K621R, V644I, <b>M688I, R754G<sup>c</sup></b> (Resíduos 518-758)  G50D <sup>f</sup> , S63Y, <b>N66T, V76A</b>  F55L, <b>E58D, F64S<sup>a</sup></b> (Resíduos 1-76) R545Q <sup>c</sup> , K582R, V605I, <b>M649I, R715G<sup>c</sup></b> (Resíduos 479-718)
3	PA nt 1-2151 716aa  PA-X nt 1-760 252aa  PA-N155 nt 463-2151 562aa  PA-N182 nt 544-2151 535aa	E59K <sup>d</sup> , P259S <sup>a</sup> , L348I, D354I <sup>b</sup> , S409N, I465V, I505V,  E59K <sup>d</sup> , K227R, A240D <sup>a</sup>  P105S <sup>a</sup> , L194I, T200I <sup>b</sup> , S255N, I311V, I351V  P78S <sup>a</sup> , L167I, T173I <sup>b</sup> , S228N, I284V, I324V	<b>K19R, K29R, E59K<sup>d</sup>, V62I, K142N<sup>c</sup>, E237K<sup>d</sup>,</b> P259S <sup>a</sup> , <b>G272D<sup>f</sup></b> , L348I, D354I <sup>b</sup> , S409N, I465V, <b>A476V, I505V, L549F, Q556H<sup>g</sup></b>  <b>K29R, E59K<sup>d</sup>, V62I, K142N<sup>c</sup>, E237K<sup>d</sup></b>  <b>E83K<sup>d</sup>, P105S<sup>a</sup>, G118D<sup>f</sup>, L194I, T200I<sup>b</sup>, S255N,</b> I311V, I351V, <b>L395V, Q402H<sup>g</sup></b>  <b>E56K<sup>d</sup>, P78S<sup>a</sup>, G91D<sup>f</sup>, L167I, T173I<sup>b</sup>, S228N,</b> I284V, <b>A295V, I324V, L368F, Q375H<sup>g</sup>, K535N<sup>c</sup></b>
4	HA1 (328aa)  HA2 (221aa)	G7D <sup>a</sup> , R62K, D104N <sup>e</sup> , A138S <sup>a</sup> , V223I  R163K, I198V	<b>N3S, G7D<sup>f</sup>, R62K, D104N<sup>e</sup>, A138S<sup>a</sup>, G142R<sup>g</sup>,</b> V223I  R163K, I198V
5	NP (498aa)	K214R	K214R
6	NA (470aa)	I8M, V35A, N205S, R260K, S337N, G416E <sup>f</sup>	V35A, <b>L36P, R40G<sup>c</sup>, R171K,</b> N205S, R260K, S337N, <b>E411G<sup>e</sup>, G416E<sup>f</sup>, H450Y<sup>c</sup></b> (Resíduos 10- 465)
7	M1 nt 1-759 252aa  M2 nt 1-26;715- 982 97aa	V15I  L59M, Y76F <sup>b</sup> , E95D	V15I  L59M, Y76F <sup>b</sup>
8	NS1 1-660 219aa  NEP 1-30/503-838 121aa	V22F, E66K <sup>d</sup> , T129I <sup>b</sup> , I156V, N209I <sup>b</sup> , N219I <sup>b</sup>  M52L, K64R, R86K	V22F, <b>G47S, T56K<sup>g</sup>,</b> E66K <sup>d</sup> , T129I <sup>b</sup> , I156V, <b>V180I, P215T<sup>a</sup>, N219I<sup>b</sup></b>  M52L, K64R, R86K

Notas: Numeração da HA sem o peptídeo sinalizador; numeração da NA a partir do *start codon*. a: Hidrofóbico para hidrofílico; b: hidrofílico para hidrofóbico; c: Básico para neutro; d: Ácido para básico; e: Ácido para neutro; f: neutro para ácido; g: neutro para básico.



O gene NS possui uma sequência de 838 nucleotídeos e é traduzido em duas regiões abertas de leitura (ORF - *open reading frame*): NS1 (693 nt / 230 aa ou 660 nt / 219 aa) e NEP (posições nucleotídicas: 1 ao 30 com junção em 503 a 838, traduzindo em 121 aa). A predição da proteína NS1 nos isolados São Paulo-2015 e São Paulo/1.19/2012 é de 219 aa. Os vírus São Paulo/2015 têm quatro mutações de aa que não foram encontradas no São Paulo/2012 em NS1 e as três mutações de aa em NEP foi comum a ambos os vírus.

O gene da nucleoproteína mostrou-se conservada entre os isolados brasileiros de 2015 e 2012. A mutação K214R, presente na estirpe São Paulo-2012 também foi encontrada nas estirpes São Paulo-2015 e na grande maioria dos EIVs analisados. A mutação H334N estava presente somente no isolado A/equine/São Paulo/15.FMVZ/2015.

As sequências das predições das proteínas M1 e M2 tiveram 252 aa e 97 aa respectivamente e estavam conservadas. A mutação Y76F, encontrada em poucas sequências (A/equine/OR/78356/2012, A/equine/Rio Grande do Sul/1/12, A/equine/Dubai/1/12, A/equine/FL/146609/2011 e A/equine/Kentucky/1/11), estava presente nos EIVs brasileiros, São Paulo-2012 e São Paulo-2015.

Os genes das polimerases (PA, PB1 e PB2) tiveram diversas mutações quando comparados às estirpes representantes da sublinhagem Florida 1 e ao São Paulo/2012 (Quadro 2). PB1 teve substituições únicas ao vírus brasileiro de 2015. Uma exceção é a mutação R741G (PB1-N40) que também foi encontrada nas estirpes Tennessee/2014. Alguns EIVs têm uma mutação em PB1 levando a um encurtamento da proteína devido ao *stop codon* estar antecipado, gerando 81 aminoácidos (nt 95 ao 246) ao invés de 90 aminoácidos (nt 95 ao 367).

As identidades das sequências de nucleotídeos para cada gene em relação aos EIVs analisados estão descritos no quadro 4.

Quadro 4 - Identidades nucleotídicas dos isolados brasileiros de 2012/2015 e da estirpe vacinal recomendada pela OIE em relação aos EIVs analisados no presente estudo

Gene	Estirpe		
	A/equine/São Paulo/8.FMVZ/2015	A/equine/São Paulo/1.19/2012	A/equine/South Africa/4/2003 (PB1 gene: A/equine/ Ohio/1/2003)
HA 1-1650	99,3% São Paulo/1.19/2012 Dubai/1/2012 Rio_Grande_do_Sul/1/2012 OR/78356/2012 Kentucky/1/2011	99,9% Rio_Grande_do_Sul/1/2012 FL/146609/2011	99,8% Ohio/1/2003 * 97,9% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,4% São Paulo/1.19/2012
NA 28-1395	98,8% Dubai/1/2012 98,7% São Paulo/1.19/2012	99,9% Dubai/1/2012	99,9% Ohio/1/2003 * 97,2% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,1% São Paulo/1.19/2012
NP 1-1487	99,5% São Paulo/1.19/2012 Rio_Grande_do_Sul/1/2012 Dubai/1/2012	100% Rio_Grande_do_Sul/1/2012 Dubai/1/2012 99,8% Kentucky/1/2011	99,9% Ohio/1/2003 * 98,3% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,7% São Paulo/1.19/2012
M	99,7% OR/78356/2012 Kentucky/1/2011 99,5% São Paulo/1.19/2012 99,6% Rio_Grande_do_Sul/1/2012	99,8% Rio_Grande_do_Sul/1/2012	99,8% Ohio/1/2003 Wisconsin/1/2003 Massachusetts/213/2003 * 98,3% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,3% São Paulo/1.19/2012
NS 1-819	99,2% São Paulo/1.19/2012 Dubai/1/2012 Kentucky/1/2011 99,1% Rio_Grande_do_Sul/1/2012	100% Dubai/1/2012 Kentucky/1/2011 99,8% Rio_Grande_do_Sul/1/2012	99,5% Ohio/1/2003 * 97,3% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,0% São Paulo/1.19/2012
PA 6-2106	98,6% São Paulo/1.19/2012 Rio_Grande_do_Sul/1/2012	100% Rio_Grande_do_Sul/1/2012 99,9% Dubai/1/2012	99,6% California/8560/2002 Kentucky/5/2002 * 97,3% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,4% São Paulo/1.19/2012
PB1 1-346	98,5% Rio_Grande_do_Sul/1/2012 Dubai/1/2012 98,2% São Paulo/1.19/2012	99,7% Rio_Grande_do_Sul/1/2012 Dubai/1/2012	99,7% Wisconsin/1/03 California/1/10 New_York/146066/2007 Virginia/131054-3/2005 Montana/9233/2007 Texas/117793/2005 Newmarket/5/2003 Kentucky/5/2002 * 97,6% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,8% São Paulo/1.19/2012
PB2 1695-2280	99,4% São Paulo/1.19/2012 Rio_Grande_do_Sul/1/2012 Dubai/1/2012	100% Rio_Grande_do_Sul/1/2012 Dubai/1/2012 99,8% Kentucky/1/2011 California/1/2010	99,8% Newmarket/5/2003 California/8560/2002 * 97,5% São Paulo/8.FMVZ/2015 * 98,1% São Paulo/1.19/2012

Nota: Os respectivos tamanhos das seqüências em pares de base utilizados na análise estão descritos sob cada gene. \*Identidade de nucleotídeo em relação aos EIV dos surtos de São Paulo de 2012 e 2015. A quantidade de seqüências nucleotídeos analisadas para cada gene foram: 163 HA, 68 NA, 48 M, 51 NP, 48 NS, 52 PA, 53 PB1, 42 PB2.

## 5.5 ANÁLISE EVOLUTIVA DO GENE HA

A diversidade evolucionária média para 78 sequências de aminoácidos da HA1, que foram utilizadas nas árvores filogenética e temporal, representando os cinco grupos/subgrupos filogenéticos, foi de 0,035 (erro padrão 0,005) e para as estirpes brasileiras de 2015 foi de 0,0019 (erro padrão 0,0012). Em adição, as sequências dos grupos Florida 1, Flórida 2, pré-divergente e estirpes brasileiras de 2015 foram analisados quanto à distância de aminoácidos (Tabela 6). Os parâmetros foram calculados utilizando a correção de Poisson (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) com o *software* MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Nenhuma evidência de recombinação na HA foi encontrada utilizando *Genetic Algorithms for Recombination Detection* (GARD) (POND et al., 2006) no servidor *online* HyPhy ([www.datamonkey.org/GARD](http://www.datamonkey.org/GARD)).

Tabela 6 - Distância de aminoácidos de 78 EIV HA1 sequências entre os grupos filogenéticos: pré-divergente, Flórida 1 e Flórida 2

Grupos de EIV	Distância (%)	Erro padrão
Pré-divergente/ Brasil 2015	13,93	0,021
Pré-divergente/ Florida I	13,07	0,020
Brasil 2015/ Florida I	1,33	0,004
Brasil 2015/ Florida II	4,28	0,010
Florida II/ Florida I	3,38	0,008

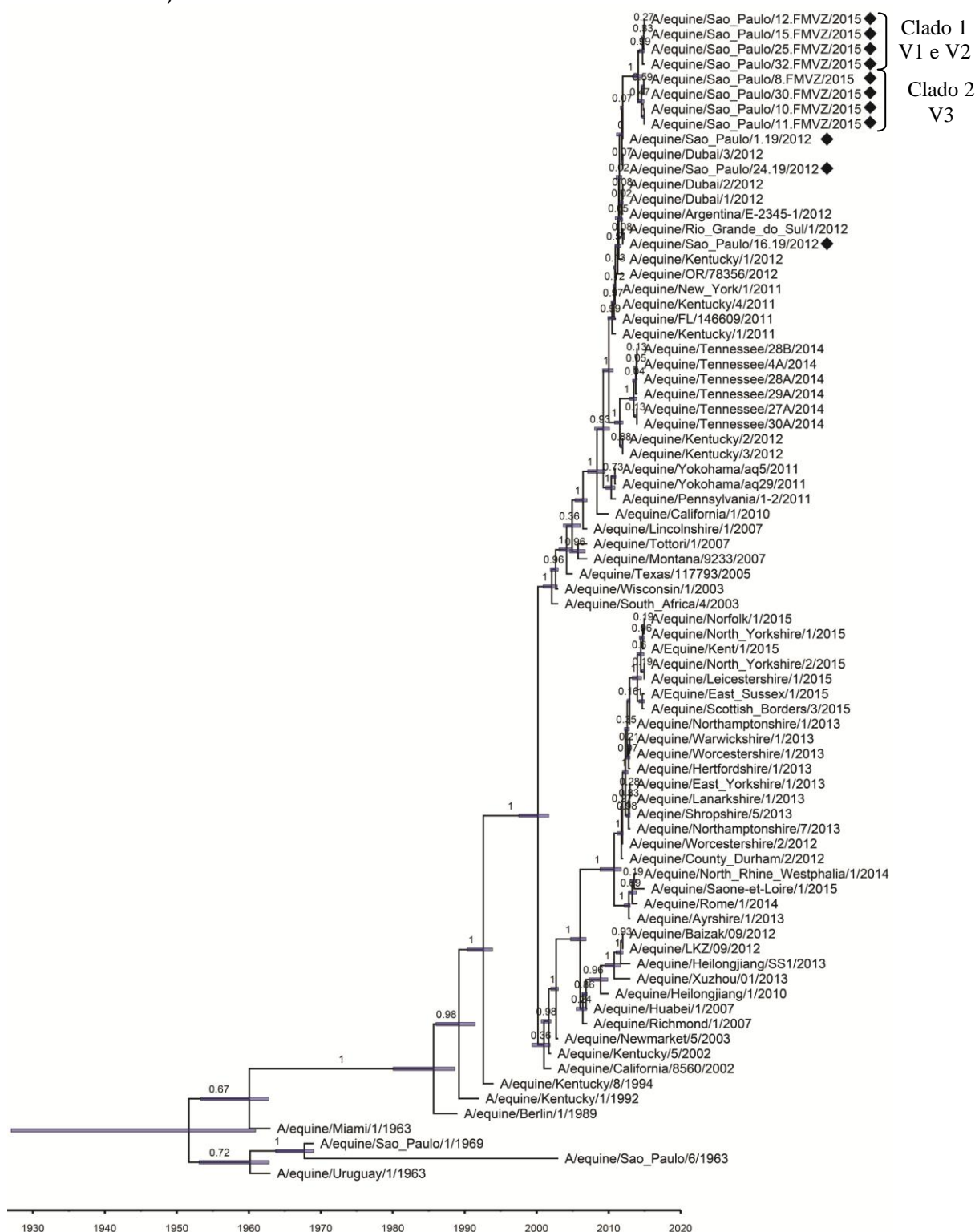
Nota: Distâncias foram calculadas utilizando o modelo de correção Poisson (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) com o *software* MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

O tempo de evolução dos EIVs e dispersão temporal foram estimados através do método Bayesiano com o mesmo modelo de substituição de nucleotídeos adotado para a construção das árvores filogenéticas, HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985) com ajuste de escala de tempo pelo ano de isolamento de cada estirpe viral com o *software* BEAST v.1.7.5 (DRUMMOND et al., 2012) (Figura 18). O teste de relógio molecular nas 78 EIV sequências de HA1 mostrou que a taxa evolucionária foi de  $1,47 \times 10^{-3}$  substituições de nucleotídeos por sítio por ano, com intervalo de maior densidade posterior (HPD - *Highest posterior density*) entre  $1,05 \times 10^{-3}$  a  $1,86 \times 10^{-3}$ , que está próximo ao esperado para vírus RNA (DUFFY;

SHACKELTON; HOLMES, 2008) e para o EIV (MURCIA; WOOD; HOLMES, 2011). Em ambos os relógios moleculares *relaxed* (*lognormal* e exponencial), o tamanho do efetivo amostral (ESS - *effective sample size*) estava acima de 200, o que significa que as sequências tiveram boa representação posterior e não eram correlacionadas, ou seja, ESS indica a estimativa do número de pontos independentes amostrados e, conseqüentemente, se os valores para os parâmetros são acurados. O relógio exponencial representou melhor a análise evolucionária do que o relógio *lognormal* visto que teve menor desvio padrão (exponencial: 12,34 e *lognormal*: 12,41), portanto, o relógio molecular exponencial foi utilizado para a análise.

As variantes do surto de brasileiro de 2015 agruparam-se em dois clados: clado 1 para sequências V1 e V2; e clado 2 para sequências V3. A estimativa de tempo decorrido desde o ancestral comum mais recente (TMRCA - *The Most Recent Common Ancestor*) indica que os EIVs Brasil-2015 são significativamente mais novos que os outros EIVs pertencentes à sublinhagem Florida 1, inclusive aos EIVs brasileiros de 2012.

Figura 18 - Árvore filogenética com base no relógio molecular do gene de HA de EIVs, usando o relógio molecular exponencial, modelo evolutivo HKY e calibração com os anos de coleta de 78 estirpes (nt 1 ao 987) realizado com BEAST v.1.7.5 (DRUMMOND et al., 2012)



Nota: Os vírus caracterizados no presente estudo estão indicados com losangos (◆).

Sequências da HA (1 - 437 nt do gene) compreendendo o peptídeo sinalizador e os primeiros 130 aminoácidos da subunidade 1 da hemaglutinina (nt 1 ao 392) foram clonadas a partir de quatro isolados: São Paulo/8.FMVZ/2015, São Paulo/10.FMVZ/2015, São Paulo/15.FMVZ/2015 e São Paulo/18.FMVZ/2015. Quatro clones de cada estirpe foram sequenciados e as diversidades médias de nucleotídeos e aminoácidos foram estimadas. A diversidade média de substituições para nt e aa por sítio, na população clonal dos quatro cavalos foi de 0,0055 e 0,015, com erro padrão estimado de 0,001 e 0,004, respectivamente. A diversidade das sequências de aminoácidos na população clonal foi obtida por meio do modelo Poisson (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) e a de nucleotídeos foi estimada utilizando o modelo Maximum Composite Likelihood, ambos com taxa de distribuição gama e 1000 repetições de bootstrap no *software* MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

As descrições das substituições de aminoácidos nas sequências dos clones do fragmento de HA1 dos isolados São Paulo/8.FMVZ/2015, São Paulo/10.FMVZ/2015, São Paulo/15.FMVZ/2015 e São Paulo/18.FMVZ/2015, em comparação com as estirpes São Paulo/6/1963, São Paulo/1/1969 e South Africa/4/03 estão apresentados na tabela 7.



Tabela 7 – Descrição das substituições de aminoácidos em clones de um segmento (nt 1 to 392) da subunidade 1 da hemaglutinina dos isolados de São Paulo, 2015

Estirpe/ Clone	Peptídeo sinalizador		Numeração de HA1															
	2	5	3	7	16	19	32	36	58	59	62	75	104	106	110	117	120	121
SA/4/03	K	I	N	G	G	A	D	V	I	L	R	H	D	A	S	T	F	T
SP/1.19/12	A	.	.	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/16.19/12	A	.	.	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/24.19/12	A	.	.	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/6/63	.	T	.	D	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	M
SP/1/69	.	T	.	D	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	M
SP/8.1/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	L	.
SP/8.2/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	S
SP/8.3/15	T	.	S	D	.	V	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/8.4/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	P	.	.	.
SP/10.1/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	R	N	.	.	.	.	.
SP/10.2/15	T	.	S	D	.	.	.	.	T	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/10.3/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/10.4/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/15.1/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	S
SP/15.2/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	A	.	S
SP/15.3/15	T	.	S	D	.	.	.	A	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
SP/15.4/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	S
SP/18.1/15	T	T	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	S
SP/18.2/15	T	.	S	.	.	.	.	.	.	P	K	.	N	T	.	.	.	S
SP/18.3/15	T	.	S	D	R	.	N	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	S
SP/18.4/15	T	.	S	D	.	.	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	S

Notas: Pontos representam aminoácidos idênticos. São Paulo/8.FMVZ/2015 (clones SP/8.1/15, SP/8.2/15, SP/8.3/15 e SP/8.4/15), São Paulo/10.FMVZ/2015 (clones SP/10.1/15, SP/10.2/15, SP/10.3/15 e SP/10.4/15), São Paulo/15.FMVZ/2015 (clones SP/15.1/15, SP/15.2/15, SP/15.3/15 e SP/15.4/15), São Paulo/18.FMVZ/2015 (clones SP/18.1/15, SP/18.2/15, SP/18.3/15 e SP/18.4/15), São Paulo/6/1963 (SP/6/63), São Paulo/1/1969 (SP/1/69) and South Africa/4/2003 (SA/4/03).





## 6 DISCUSSÃO

Doze EIVs foram isolados de equídeos durante o surto de EI dentro do Hospital Veterinário. Os vírus do surto de 2012 e de 2015 foram caracterizados como sendo H3N8 através do sequenciamento dos genes da hemaglutinina e neuraminidase, o que suporta a tese de o H3N8 ser o circulante em surtos de EIV (CUNHA et al., 1986; MANCINI et al., 1988; LOUREIRO, 2004; VILLALOBOS et al., 2013; BEUTTEMMÜLLER et al., 2016) visto a última identificação do H7N7 em surtos de EIV no Brasil ter sido em 1976 (PIEGAS et al., 1976; CUNHA; PASSOS; VALLE, 1978) e ser considerado extinto no mundo (WEBSTER, 1993).

Dentre os EIVs isolados de 2015, três variantes genéticas (V1-3) foram identificadas. A diferença entre as variantes V1, V2 e V3 consiste na substituição de T por S no resíduo 121 do gene da hemaglutinina. Até o momento do presente estudo, o resíduo S121 foi encontrado somente nas estirpes V3 brasileiras de 2015. Durante o surto, a mutação ocorreu primeiro nas amostras que foram coletadas dos animais entre os dias 19 de setembro e 22 de setembro, porém não foi encontrado nas amostras coletadas entre os dias 14 e 16 de setembro, sugerindo que tenha surgido durante o surto.

Estudos sobre as estirpes de EIV de campo circulantes no Brasil são poucos e mais escassos são os sequenciamentos da HA e NA de EIV brasileiros, analisando a NA e não somente o tipo de HA viral. Embora este não seja um estudo de desafio, tentamos avaliar as alterações genéticas dos EIVs de campo e de maneira indireta detectar possíveis indícios de alterações de antigenicidade que pudessem acarretar em mudanças em epítomos considerados importantes para as respostas vacinais, e, assim, inferir se houve distanciamento das estirpes vacinais utilizadas no Brasil.

Os isolados brasileiros de 2015 têm semelhanças aos de Dubai, Uruguai, Argentina, Chile, Estados Unidos (Kentucky) e Brasil (Rio Grande do Sul) de surtos de 2010 e 2012 (LEGRAND et al., 2015; BEUTTEMMÜLLER et al., 2016; PERGLIONE et al., 2016) e ao isolado brasileiro de 2012 (São Paulo) (VILLALOBOS et al., 2013), com os oito genes completos sequenciados e analisados neste trabalho, porém com certo distanciamento na análise

filogenética. A análise filogenética apontou a formação de um sub-clado para os EIVs Brasil-2015, dentro da sublinhagem Flórida 1 com proximidade aos EIVs 2011 e 2012 desse grupo. A pequena distância na árvore filogenética entre as variantes brasileiras (2015) é esperada para estirpes do mesmo surto.

A análise do relógio molecular indicou que os EIVs brasileiros de 2012/2015 e os EIVs de 2012 de Dubai e Estados Unidos têm o ancestral em comum. As variantes isoladas do surto de 2015 agruparam-se em dois clados na árvore de máxima credibilidade (MCC), indicando a evolução durante o surto e o distanciamento dos EIVs-2015 em relação aos de 2012 e da estirpe vacinal South Africa/4/03.

Realizamos a análise de substituições de nucleotídeos e aminoácidos dos oito genes e a análise do perfil de hidrofobicidade das proteínas HA e NA de forma a detectar indiretamente o distanciamento dos vírus vacinais em relação às amostras de campo. A análise sobre as sequências permite inferir sobre eventuais coberturas vacinais em relação aos EIVs de campo, entretanto análises de antigenicidade possam dar resultados de forma mais sugestiva sobre a ação vacinal.

As substituições R62K (sítio E), D104N e A138S (sítio A) (BRYANT et al., 2009) e V223I na HA foram previamente descritas em estirpes Flórida 1 (LEGRAND et al., 2015). As substituições V78A e N159S, que diferenciam as sublinhagens Flórida 1 e Flórida 2 (BRYANT et al., 2011; LEGRAND et al., 2015) permaneceram nos EIVs isolados. Como descrito por Legrand *et al.*, as sete substituições nos resíduos G7D, R62K, V78A, D104N, A138S, N159S e V223I aparentemente permaneceram sem mudanças desde 2008.

Substituições em sítios antigênicos da HA podem interferir na resposta de anticorpos (WOODWARD et al., 2015). Os EIVs do presente estudo (2015) tiveram duas substituições de aminoácidos no sítio antigênico A (resíduos 138 e 142) e um no sítio E (resíduo 62). O sítio A teve queda na hidrofobicidade e está situada na porção externa da parte globular da HA (WOODWARD et al., 2015; BEUTTEMÜLLER et al., 2016). As duas substituições no sítio A combinadas geraram maior mudança do que somente a substituição 138, visto que essa já estava presente nas estirpes de 2012 do grupo Florida 1 (BEUTTEMÜLLER et al., 2016) Esta combinação pode ter sido um dos fatores facilitadores da

disseminação viral durante o surto. A substituição G142R foi única para as três variantes brasileiras de 2015 e não foi encontrada em outros EIVs disponíveis nas bases de dados, sugerindo que tenha ocorrido pouco antes ou durante o surto.

A OIE realiza recomendações anuais em relação à atividade do EIV isolados nos anos anteriores. Em 2016, EIVs isolados da Irlanda, Reino Unido e EUA pertencem à linhagem americana, sublinhagem Florida. O sequenciamento e análise da HA e NA mostraram que os isolados dos EUA pertencem ao clado 1 e são semelhantes aos identificados no ano de 2015, enquanto os vírus isolados da Irlanda e Reino Unido pertencem ao clado 2 e também semelhantes aos vírus isolados dos países no ano de 2015. Os vírus foram caracterizados antigenicamente por meio do teste da inibição da hemaglutinação (HI) utilizando soros de ferrets pós-infecção concluindo que os vírus isolados em 2016 caracterizados continuam antigenicamente próximos às estirpes recomendadas para vacinas contra o EIV (OIE, 2017). Entretanto, testes de desafio poderiam confirmar se há proximidade entre amostras de campo em relação à estirpe vacinal, visto que consideraria a ação do vírus como um todo como por exemplo quando há mutações em genes que podem interferir na virulência e propagação viral (YAMANAKA et al., 2016).

A desatualização de muitas vacinas comerciais foi observada pela OIE, que recomenda desde 2010 que sejam compostas pelos cladros 1 e 2 da sublinhagem Florida, representadas por *A/equine/South Africa/04/2003-like* ou *A/equine/Ohio/2003-like* para o clado 1 e *A/equine/Richmond/1/2007-like* para clado 2 (OIE, 2017).

Foi observado que dez dos animais imunizados receberam vacinas com estirpe desatualizada (KY/97) e outros animais não receberam a vacinação contra o EIV. Isto sugere que, a utilização de vacinas desatualizadas, ou a utilização de vacinas atualizadas porém, possivelmente, sem níveis protetores suficientes, podem ter sido os maiores fatores contribuidores para a disseminação viral durante este surto de EIV.

No presente estudo, foram encontradas mutações que provocaram maior distanciamento filogenético e temporal das estirpes vacinais, além das diferenças hidrofóbicas em sítios antigênicos, o sugere indiretamente uma mudança nesses sítios e há suspeita de mudança de antigenicidade.

As diversidades nucleotídicas e de aminoácidos dos clones mostrou que houve a ocorrência de quasiespécies durante o surto de EI. Esse dado corrobora com a hipótese da evolução de variantes durante surtos de doenças virídicas. A rede de transmissão e a evidência de variantes genéticas foi previamente observada em um surto de EI ocorrido em Newmarket, Reino Unido, 2003 (HUGHES et al., 2012).

As variantes virais isoladas deste surto sugerem que houve um padrão de evolução de quasiespécie. As mutações (resíduos 138 e 142) encontradas na HA1 podem ter tido papel de interferência na ligação antígeno-anticorpo, especialmente nos cavalos que foram imunizados com vacinas contendo a estirpe vacinal recomendada pela OIE, A/equine/South Africa/4/2003. A formação de quasiespécies é o resultado de mutações causadas pelo erro de replicação viral pela RNA polimerases RNA-dependente, o que é característico em populações virais com diversidade genética (ANDINO; DOMINGO, 2015). A expansão dos vírus quasiespécies é o início para o desenvolvimento de novas estirpes/variantes virais, que, quando prosperam, evoluem para escapar do sistema imune do hospedeiro e da ação de medicamentos antivirais (ANDINO; DOMINGO, 2015; MORI et al., 2015).

O teste de ELISA utilizado nas amostras provenientes do surto do Hospital Veterinário em 2015 tem um formato de bloqueio de epítipo, que permite ser utilizado para a detecção de anticorpos contra vírus da influenza A em diversas espécies (BOER; BACK; OSTERHAUS, 1990; STARICK et al., 2006; CIACCI-ZANELLA et al., 2010). Anticorpos anti-NP foram detectados em nove cavalos em amostras da primeira coleta, enquanto 28 amostras da segunda coleta foram positivas, demonstrando a soroconversão após a infecção viral. Dois cavalos que não tiveram sinais clínicos, e foram negativos na triagem para EIV, soroconverteram, confirmando que estes foram infectados durante o surto.

A função catalítica da enzima NA está relacionada aos resíduos R-116, D-149, R-150, R-223, E-275, R-291, R-368 e Y-402 (SHTYRYA; MOCHALOVA; BOVIN, 2009), que são conservadas nas estirpes brasileiras de 2015. Os epítipos da parte globular da NA, envolvendo os resíduos 150, 199, 344-346, 367, 399 e 400 (SAITO et al., 1994) são conservados nos EIVs analisados, com

três excessões: a mutação Q199H na estirpe *A/equine/Kentucky/2/12* e *A/equine/Kentucky/3/2012* e a mutação R150Q em *A/equine/Spain/1/2007*.

A proteína NS1 tem em torno de 26 KDa (HALE et al., 2008), é multifuncional e tem grande importância na replicação viral e fatores de virulência (GEISS et al., 2002; SOLÓRZANO et al., 2005). Apesar de não possuir função enzimática, tem epítomos que interagem com proteínas celulares e RNA (LU et al., 1995; NEMEROFF et al., 1998; CHEN; LI; KRUG, 1999; ARAGÓN et al., 2000; LI et al., 2006; GUO et al., 2007; MELÉN et al., 2007; SATTERLY et al., 2007). Os dois epítomos da NS1, resíduos 1-73 e 74-230 (WANG et al., 2002; CHIEN et al., 2004) promovem estabilidade à proteína o que é essencial para suas funções e são conservadas entre os vírus influenza A e B (NEMEROFF; QIAN; KRUG, 1995; WANG; KRUG, 1996).

Algumas das mutações encontradas na NS1 do vírus de 2015 estão situadas em região de epítomos que se ligam a algumas proteínas celulares: V22F, G47S, T56K (neutro para básico) e E66K (ácido para básico) (E1B-AP5 - ribonucleoproteína nuclear heterogênea) (SATTERLY et al., 2007), V22F (RNA fita dupla) (LU et al., 1995), I156V e V180I (CPSF - fator específico de poliadenilação e clivagem (NEMEROFF et al., 1998). As mutações T56K e E66K tiveram alteração de pH e poderiam alterar a ligação com a proteína celular E1B-AP5. O E1B-AP5 é um dos fatores que constitui a maquinaria de exportação de mRNA na célula (GABLER et al., 1998), que quando reduzida pela ação do NS1 deixa a célula mais permissiva para a replicação do genoma viral (SATTERLY et al., 2007).

As proteínas que contêm NLS (sinalizador de transporte nuclear) podem ser reconhecidas por importinas que promovem a entrada no núcleo de células eucarióticas (LI et al., 2015). As NSLs são encontradas nos vírus influenza A nas proteínas PB1, PB2, PA, NP, M1 e NS1 (GREENSPAN; PALESE; KRYSTAL, 1988; NATH; NAYAK, 1990; MUKAIGAWA; NAYAK, 1991; NIETO et al., 1994; WANG; PALESE; O'NEILL, 1997; TARENDEAU et al., 2007; HUTCHINSON et al., 2011). O isolado brasileiro de 2015 apresentou mutações na região de NLS2 da NS1, com diferença de hidrofobicidade (N219I) (GREENSPAN; PALESE; KRYSTAL, 1988; MELÉN et al., 2007) e da PA (E237K) (NIETO et al., 1994). Maiores análises são necessárias para analisar se essas mutações geraram alguma alteração em virulência viral.

Os vírus influenza A podem ser potenciais ameaças aos humanos e animais devido ao risco de cruzarem barreiras entre espécies (BERRÍOS, 2005; CRAWFORD et al., 2005; KIRKLAND et al., 2010; CRISPE et al., 2011; SU et al., 2014; LARSON et al., 2015). Mutações ocorrem frequentemente em múltiplos genes durante o processo de adaptação do vírus em uma nova espécie (BENDER et al., 1999; ZHOU et al., 1999; HIROMOTO et al., 2000) e algumas dessas mutações podem refletir em uma resposta à pressão imune enquanto outras podem ser somente mutações sem interferência na patogenia viral ou na reação ao hospedeiro. Frequentemente vê-se *reassortments* precedendo a infecção de um hospedeiro diferente resultando em grande variação genética (GETHING et al., 1980; FANG et al., 1981; KAWAOKA; KRAUSS; WEBSTER, 1989). Devido ao risco de ocorrerem tais mutações, pequenas ou grandes, a vigilância dos vírus influenza A são importantes para o monitoramento das estirpes virais circulantes em humanos e animais.

Durante o surto de 2015 no hospital veterinário, os animais com EIV apresentaram ao menos um dos sinais clínicos: febre, tosse, secreção nasal, letargia e inapetência; o que está de acordo com o que é comumente observado em casos de EI (MORLEY et al., 2000; MUMFORD et al., 2003; PUSTERLA et al., 2011).

Dois dias antes do início dos sinais clínicos nos animais, dois equinos (animais nº1 e nº2) provenientes de uma mesma propriedade no estado do Rio de Janeiro, foram encaminhados ao hospital veterinário para cirurgia eletiva, não apresentando acometimento do sistema respiratório. Após o período de jejum para a realização da cirurgia, um desses animais apresentou febre e secreção nasal (14/09/2015), e o segundo equino apresentou os mesmos sinais clínicos em um curto período de tempo (16/09/2015). Em seguida outros animais que estavam no hospital veterinário começaram a apresentar sintomatologia semelhante e suspeitou-se de ser infecção pelo vírus da influenza equina.

De acordo com os relatórios semestrais publicados pela OIE, o Brasil notificou surtos de EIV em 2013, dois surtos na Paraíba e dois no Espírito Santo e em 2014 quatro surtos: um em março em Roraima, um em abril em São Paulo e um em abril e em março em Santa Catarina. Em 2015 e 2016 não houveram

notificações brasileiras à OIE de surtos de EIV ([http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home)).

Em relação ao surto de 2015 no hospital veterinário, a partir da identificação do quadro clínico nos animais compatíveis com EI, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento foi notificado e a movimentação animal foi restringida, não permitindo a entrada ou saída de equídeos até a liberação pelo órgão responsável.

Um estudo sobre a vigilância voluntária do EIV nos EUA entre os anos 2010 e 2013 revelou que há proteção subótima de vacinas comerciais contra o EIV disponíveis contra o EIV (PUSTERLA et al., 2015). Assim como no presente estudo, muitos dos animais analisados não tinham o histórico vacinal completo, não incluindo dados como a marca da vacina e fabricante, logo, conclusões não podem ser feitas à respeito da eficácia das vacinas utilizadas nos animais (PUSTERLA et al., 2015).

As vacinas contra EI devem conter estirpes que sejam epidemiologicamente relevantes à região ou país e sua atualização ser realizada para desenvolver proteção ótima nos animais (PUSTERLA et al., 2015). A vacinação deve ser considerada não somente para a infecção contra o EIV, mas também para a redução de doença clínica (HAPPOLD; RUBIRA, 2011).





## 7 CONCLUSÕES

Face a escassez de estudos sobre a caracterização genética de estirpes do vírus da influenza equina circulantes, o presente trabalho fornece informações inéditas para a epidemiologia e controle da EI no Brasil.

a) Foi possível sequenciar os oito genes completos de uma estirpe de EIV e o gene da HA de outras duas estirpes de EIVs provenientes do surto brasileiro de 2012.

b) No surto brasileiro de 2015 foi possível isolar 12 amostras virais, não sendo possível sequenciar o genoma completo, porém os oito genes foram sequenciados com coberturas parciais ou totais que permitiram as análises do presente estudo.

c) Os vírus obtidos do surto de 2012 e isolados do surto de 2015 são do subtipo H3N8 e pertencem à sublinhagem Flórida 1.

d) As sequências obtidas com os isolados de 2012 e 2015 permitiram a análise filogenética dos oito genes do EIV que revelou certa proximidade com os vírus de surtos de 2012 dos Estados Unidos, Dubai e América do Sul, porém com certo distanciamento entre as estirpes de 2012 e 2015. Os EIVs brasileiros de 2015 formaram um clado separado dos demais e houve maior distanciamento com a estirpe vacinal A/equine/South Africa/4/03, visto a evolução sofrida.

e) A análise evolutiva corroborou com a análise filogenética, e evidenciou o distanciamento existente entre os EIVs isolados do surto de 2015 em relação aos demais vírus de 2012 e à estirpe vacinal A/equine/South Africa/4/03.

f) O distanciamento filogenético e temporal das amostras dos surtos brasileiros de 2012 e 2015 em relação à estirpe vacinal não necessariamente traduz em diferenças antigênicas, portanto foram analisadas as mutações e alterações em HA e NA. As análises de mutações e hidrofobicidade permitiram detectar mudanças de polaridade e hidrofobicidade. Tais mudanças podem potencialmente causar um distanciamento antigênico do EIV, tornando essencial o contínuo monitoramento das características genéticas das amostras circulantes em nosso meio. A posse destas informações pode orientar a

realização de estudos de proteção ao desafio para avaliar a cobertura imunológica pelas vacinas disponibilizadas no mercado.

## REFERÊNCIAS

ANDINO, R.; DOMINGO, E. Viral quasispecies. **Virology**, v. 479–480, p. 46–51, 2015.

ANDREWS, C.; PEREIRA, H. G.; WILDY, P. **Viruses of vertebrates**. 4. ed. London, United Kingdom: Ballière Tindall, 1978.

ARAGÓN, T.; LUNA, S.; NOVOA, I.; CARRASCO, L.; ORTÍN, J.; NIETO, A. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4GI is a Cellular Target for NS1 Protein, a Translational Activator of Influenza Virus. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 17, p. 6259–6268, 2000.

BANCROFT, C. T.; PARSLOW, T. G. Evidence for Segment-Nonspecific Packaging of the Influenza A Virus Genome. **Journal of Virology**, v. 76, n. 14, p. 7133–7139, 2002.

BENDER, C.; HALL, H.; HUANG, J.; KLIMOV, A.; COX, N.; HAY, A.; GREGORY, V.; CAMERON, K.; LIM, W.; SUBBARAO, K. Characterization of the Surface Proteins of Influenza A (H5N1) Viruses Isolated from Humans in 1997–1998. **Virology**, v. 254, n. 1, p. 115–123, 1999.

BERA, B. C.; VIRMANI, N.; SHANMUGASUNDARAM, K.; VAID, R. K.; SINGH, B. K.; GULATI, B. R.; ANAND, T.; BARUA, S.; MALIK, P.; SINGH, R. K. Genetic analysis of the neuraminidase (NA) gene of equine influenza virus (H3N8) from epizootic of 2008-2009 in India. **Indian Journal of Virology**, v. 24, n. 2, p. 256–264, 2013.

BERRÍOS, P. E. Influenza equina en Chile (1963 - 1992). Un posible caso en un ser humano. **Revista chilena de infectología**, v. 22, n. 1, p. 47–50, 2005.

BEUTTEMÜLLER, E. A.; WOODWARD, A.; RASH, A.; FERRAZ, L. E. S.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; ELTON, D. Characterisation of the epidemic strain of H3N8 equine influenza virus responsible for outbreaks in South America in 2012. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 45, 2016.

BOER, G. F.; BACK, W.; OSTERHAUS, A. D. M. E. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. **Archives of Virology**, v. 115, p. 47–61, 1990.

BOONE, S. A.; GERBA, C. P. The occurrence of influenza A virus on household and day care center fomites. **Journal of Infection**, v. 51, n. 2, p. 103–109, 2005.

BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 26, n. Suppl4, p. D49–D53, 2008.

BRYANT, N. A.; RASH, A. S.; RUSSELL, C. A.; ROSS, J.; COOKE, A.; BOWMAN, S.; MACRAE, S.; LEWIS, N. S.; PAILLOT, R.; ZANONI, R.; MEIER,

H.; GRIFFITHS, L. A.; DALY, J. M.; TIWARI, A.; CHAMBERS, T. M.; NEWTON, J. R.; ELTON, D. M. Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1–2, p. 41–52, 2009.

BRYANT, N. A.; RASH, A. S.; WOODWARD, A. L.; MEDCALF, E.; HELWEGEN, M.; WOHLFENDER, F.; CRUZ, F.; HERRMANN, C.; BORCHERS, K.; TIWARI, A.; CHAMBERS, T. M.; NEWTON, J. R.; MUMFORD, J. A.; ELTON, D. M. Isolation and characterisation of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 1–2, p. 19–27, 2011.

CHAMBERS, T. M. A brief introduction to equine influenza and equine influenza viruses. In: SPACKMAN, E. (Ed.). **Animal Influenza Virus**. 2. ed. Athens, GA, USA: Humana Press, 2014. p. 365–370.

CHAMBERS, T. M.; REEDY, S. E. Equine influenza diagnosis: Sample collection and Transport. In: SPACKMAN, E. (Ed.). **Animal Influenza Virus**. 2. ed. Athens, GA, USA: Humana Press, 2014. p. 371–377.

CHEN, H.; CALVO, P. A.; MALIDE, D.; GIBBS, J.; SCHUBERT, U.; BACIK, I.; BASTA, S.; O'NEILL, R.; SCHICKLI, J.; PALESE, P.; HENKLEIN, P.; BENNINK, J. R.; YEWDELL, J. W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nature Medicine**, v. 7, n. 12, p. 1306–1312, 2001.

CHEN, Z.; LI, Y.; KRUG, R. M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 8, p. 2273–2283, 1999.

CHIAPPONI, C.; FACCINI, S.; DE MATTIA, A.; BAIONI, L.; BARBIERI, I.; ROSIGNOLI, C.; NIGRELLI, A.; FONI, E. Detection of Influenza D virus among swine and cattle, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 352–354, 2016.

CHIEN, C.; XU, Y.; XIAO, R.; ARAMINI, J. M.; SAHASRABUDHE, P. V.; KRUG, R. M.; MONTELLONE, G. T. Biophysical Characterization of the Complex between Double-Stranded RNA and the N-Terminal Domain of the NS1 Protein from Influenza A Virus: Evidence for a Novel RNA-Binding Mode. **Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 1950–1962, 2004.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; VINCENT, A. L.; PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, S. M.; ZIMMERMAN, J. J. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 22, n. 1, p. 3–9, 2010.

CLEMON, F. Epidemic Influenza. Proceedings of Society of Medical Officers of Health. **Public Health**, v. 2, n. 1, p. 358–367, 1889.

COLMAN, P. M.; LAWRENCE, M. C. The structural biology of type I viral

membrane fusion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 4, p. 309–319, 2003.

CONNOR, R. J.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G.; PAULSON, J. C. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. **Virology**, v. 205, p. 17–23, 1994.

CRAWFORD, P. C.; DUBOVI, E. J.; CASTLEMAN, W. L.; STEPHENSON, I.; GIBBS, E. P. J.; CHEN, L.; SMITH, C.; HILL, R. C.; FERRO, P.; POMPEY, J.; BRIGHT, R. A.; MEDINA, M.; JOHNSON, C. M.; OLSEN, C. W.; COX, N. J.; KLIMOV, A. I.; KATZ, J. M.; DONIS, R. O. Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs. **Science**, v. 310, p. 482–485, 2005.

CRISPE, E.; FINLAISON, D. S.; HURT, A. C.; KIRKLAND, P. D. Infection of dogs with equine influenza virus: Evidence for transmission from horses during the Australian outbreak. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. SUPPL.1, p. 27–28, 2011.

CROS, J. F.; PALESE, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: Influenza, Thogoto and Borna disease viruses. **Virus Research**, v. 95, p. 3–12, 2003.

CUNHA, R. G. Isolamento do vírus de influenza A/equi 2 no Estado da Guanabara. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, n. 4, p. 491–498, 1970.

CUNHA, R. G.; PASSOS, W. S.; PAGANO, M. C. C.; SOUZA, D. M. Surto de gripe equina produzido por vírus de influenza A/equi 2 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 88–91, 1986.

CUNHA, R. G.; PASSOS, W. S.; VALLE, M. C. C. Surto de gripe equina produzido por vírus influenza A/Eq1 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 3, p. 549–554, 1978.

DALY, J. M.; BLUNDEN, A. S.; MACRAE, S.; MILLER, J.; BOWMAN, S. J.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; SMITH, K. C. Transmission of equine influenza virus to english foxhounds. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 461–464, 2008.

DALY, J. M.; LAI, A. C. K.; BINNS, M. M.; CHAMBERS, T. M.; BARRANDEGUY, M.; MUMFORD, J. A. Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 4, p. 661–671, 1996.

DALY, J. M.; MACRAE, S.; NEWTON, J. R.; WATTRANG, E.; ELTON, D. M. Equine influenza: A review of an unpredictable virus. **Veterinary Journal**, v. 189, n. 1, p. 7–14, 2011.

DALY, J. M.; WHITWELL, K. E.; MILLER, J.; DOWD, G.; CARDWELL, J. M.; SMITH, K. C. Investigation of Equine Influenza Cases Exhibiting Neurological Disease: Coincidence or Association? **Journal of Comparative Pathology**, v.

134, n. 2–3, p. 231–235, 2006.

DOMINGO, E.; SHELDON, J.; PERALES, C. Viral quasispecies evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159–216, 2012.

DOWDLE, W. R.; SCHILD, G. C. Influenza: its antigenic variation and ecology. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v. 10, n. 3, p. 193–195, 1976.

DRUMMOND, A. J.; NICHOLLS, G. K.; RODRIGO, A. G.; SOLOMON, W. Simultaneously From Temporally Spaced Sequence Data. **Genetics**, v. 1320, p. 1307–1320, 2002.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.

DUCATEZ, M. F.; PELLETIER, C.; MEYER, G. Influenza d virus in cattle, France, 2011–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 368–371, 2015.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 4, p. 267–276, 2008.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 28–41, 2014.

ELTON, D.; BRYANT, N. Facing the threat of equine influenza. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 3, p. 250–258, 2011.

ELTON, D.; DIGARD, P.; TILEY, L.; ORTÍN, J. Structure and function of the influenza virus RNP. In: KAWAOKA, Y. (Ed.). **Current topics in influenza virology**. [s.l.] Norfolk: Horizon Scientific Press, 2005. p. 1–36.

ELTON, D.; MEDCALF, L.; BISHOP, K.; HARRISON, D.; DIGARD, P. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7357–7367, 1999.

ENAMI, M.; SHARMA, G.; BENHAM, C.; PALESE, P. An influenza virus containing nine different RNA segments. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 291–298, 1991.

FANG, R.; JOU, W. M.; HUYLEBROECK, D.; DEVOS, R.; FIERS, W. Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: Animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin. **Cell**, v. 25, n. 2, p. 315–323, 1981.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1–15, 1985.

FERGUSON, L.; ECKARD, L.; EPPERSON, W. B.; LONG, L.; SMITH, D.; GENOVA, S.; WEBBY, R.; WAN, X. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. **Virology**, v. 486, p. 28–34, 2015.

FLEMING, G. **Animal plagues: their history, nature and prevention**. Londres: Chapman and Hall, 1871.

FOUCHIER, R. A. M.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; VAN DER KEMP, L.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4096–4101, 2000.

FUJII, K.; FUJII, Y.; NODA, T.; MURAMOTO, Y.; WATANABE, T.; TAKADA, A.; GOTO, H.; HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. **Journal of virology**, v. 79, n. 6, p. 3766–3774, 2005.

FUJII, Y.; GOTO, H.; WATANABE, T.; YOSHIDA, T.; KAWAOKA, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 2002–2007, 2003.

FUJIYOSHI, Y.; KUME, N. P.; SAKATA, K.; SATO, S. B. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 2, p. 318–326, 1994.

GABLER, S.; SCHUTT, H.; GROITL, P.; WOLF, H.; SHENK, T.; DOBNER, T. E1B 55-Kilodalton-Associated Protein: a Cellular Protein with RNA-Binding Activity Implicated in Nucleocytoplasmic Transport of Adenovirus and Cellular mRNAs. **Journal of Virology**, v. 72, n. 10, p. 7960–7971, 1998.

GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28403–28409, 2010.

GARCIA-SASTRE, A. The neuraminidase of bat influenza viruses is not a neuraminidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. 18635–18636, 2012.

GEISS, G. K.; SALVATORE, M.; TUMPEY, T. M.; CARTER, V. S.; WANG, X.; BASLER, C. F.; TAUBENBERGER, J. K.; BUMGARNER, R. E.; PALESE, P.; KATZE, M. G.; GARCÍA-SASTRE, A. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10736–10741, 2002.



GETHING, M.; BYE, J.; SKEHEL, J.; WATERFIELD, M. Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus. **Nature**, v. 287, p. 301–306, 1980.

GILDEA, S.; FITZPATRICK, D. A.; CULLINANE, A. Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010-2012). **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, n. SUPPL.4, p. 61–72, 2013.

GILDEA, S.; QUINLIVAN, M.; ARKINS, S.; CULLINANE, A. The molecular epidemiology of equine influenza in Ireland from 2007-2010 and its international significance. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 4, p. 387–392, 2012.

GREENSPAN, D.; PALESE, P.; KRYSTAL, M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. **Journal of Virology**, v. 62, n. 8, p. 3020–3026, 1988.

GUO, Z.; CHEN, L.; ZENG, H.; GOMEZ, J. A.; PLOWDEN, J.; FUJITA, T.; KATZ, J. M.; DONIS, R. O.; SAMBHARA, S. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 36, n. 3, p. 263–269, 2007.

GUTHRIE, A. J. Equine influenza in South Africa, 2003 outbreak. In: 9th International Congress of World Equine Veterinary Association, Marrakech, Morocco. **Anais...** Marrakech, Morocco: 2006.

HALE, B. G.; RANDALL, R. E.; ORTIN, J.; JACKSON, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 10, p. 2359–2376, 2008.

HALL, T. A. Hall 1999.Pdf. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAPPOLD, J.; RUBIRA, R. Equine influenza: Patterns of disease and seroprevalence in Thoroughbred studs and implications for vaccination. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. Suppl.1, p. 135–137, 2011.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, p. 160–174, 1985.

HAUSE, B.; COLLIN, E.; LIU, R.; HUANG, B.; SHENG, Z.; LU, W. Characterization of a novel influenza virus strain in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. **mBio**, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2014.

HIGA, H. H.; ROGERS, G. N.; PAULSON, J. C. Influenza Virus Hemagglutinins Differentiate between Receptor Determinants bearing N-Acetyl-, N-glycolyl, and N,O-Diacetylneuraminic acids. **Virology**, v. 144, n. 1, p. 279–282, 1985.

HIROMOTO, Y.; YAMAZAKI, Y.; FUKUSHIMA, T.; SAITO, T.; LINDSTROM, S.

E.; OMOE, K.; NEROME, R.; LIM, W.; SUGITA, S.; NEROME, K. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 5, p. 1293–1303, 2000.

HOFFMANN, E.; STECH, J.; GUAN, Y.; WEBSTER, R. G.; PEREZ, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2275–2289, 2001.

HUANG, Q.; SIVARAMAKRISHNA, R. P.; LUDWIG, K.; KORTE, T.; BÖTTCHER, C.; HERRMANN, A. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: Stability and energetics of the hemagglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1614, n. 1, p. 3–13, 2003.

HUGHES, J.; ALLEN, R. C.; BAGUELIN, M.; HAMPSON, K.; BAILLIE, G. J.; ELTON, D.; NEWTON, J. R.; KELLAM, P.; WOOD, J. L. N.; HOLMES, E. C.; MURCIA, P. R. Transmission of Equine Influenza Virus during an Outbreak Is Characterized by Frequent Mixed Infections and Loose Transmission Bottlenecks. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2012.

HUGHEY, P. G.; ROBERTS, P. C.; HOLSINGER, L. J.; ZEBEDEE, S. L.; LAMB, R. A.; COMPANS, R. W. Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. **Virology**, v. 212, p. 411–421, 1995.

HUTCHINSON, E. C.; ORR, O. E.; LIU, S. M.; ENGELHARDT, O. G.; FODOR, E. Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor ran-binding protein 5. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 8, p. 1859–1869, 2011.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of viruses. Virus taxonomy.** Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/)>. Acesso em: 16 ago. 2017.

ITO, T.; COUCEIRO, J. N.; KELM, S.; BAUM, L. G.; KRAUSS, S.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; KIDA, H.; PAULSON, J. C.; WEBSTER, R. G.; KAWAOKA, Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7367–7373, 1998.

ITO, T.; KAWAOKA, Y. Host-range barrier of influenza A viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 71–75, 2000.

JAGGER, B. .; WISE, H. .; KASH, J. .; WALTERS, K.-A.; WILLS, N. .; XIAO, Y.-L.; R.L, D.; SCHWARTZMAN, L. .; OZINSKY, A.; BELL, G. .; DALTON, R. .; LO, A.; EFSTATHIOU, S.; ATKINS, J. .; FIRTH, A. .; TAUBENBERGER, J. .; DIGARD, P. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 199–204, 2012.

KARAMENDIN, K.; KYDYRMANOV, A.; KASYMBEKOV, Y.; KHAN, E.; DAULBAYEVA, K.; ASANOVA, S.; ZHUMATOV, K.; SEIDALINA, A.; SAYATOV, M.; FERREIDOUNI, S. R. Continuing evolution of equine influenza virus in Central

Asia, 2007-2012. **Archives of virology**, v. 159, n. 9, p. 2321–2327, 2014.

KASEL, J. A.; COUCH, R. B. Experimental infection in man and horses with influenza A viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 41, n. 3, p. 447–452, 1969.

KAWAOKA, Y.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. **Virology**, v. 169, n. 2, p. 283–292, 1989.

KAWAOKA, Y.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. **Journal of virology**, v. 63, n. 11, p. 4603–4608, 1989.

KIDO, H.; MURAKAMI, M.; OBA, K.; CHEN, Y.; TOWATARI, T. Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. **Molecules and Cells**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 1999.

KIRKLAND, P. D.; DAVIS, R. J.; WONG, D.; RYAN, D.; HART, K.; CORNEY, B.; HEWITSON, G.; COOPER, K.; BIDDLE, A.; EASTWOOD, S.; SLATTERY, S.; RAYWARD, D.; EVERS, M.; WRIGHT, T.; HALPIN, K.; SELLECK, P.; WATSON, J. The first five days: Field and laboratory investigations during the early stages of the equine influenza outbreak in Australia, 2007. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. Suppl.1, p. 6–10, 2011.

KIRKLAND, P. D.; FINLAISON, D. S.; CRISPE, E.; HURT, A. C. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 699–702, 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LAI, A. C. K.; CHAMBERS, T. M.; HOLLAND, R. E.; MORLEY, P. S.; HAINES, D. M.; TOWNSEND, H. G. G.; BARRANDEGUY, M. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. **Archives of Virology**, v. 146, n. 6, p. 1063–1074, 2001.

LANDOLT, G. A.; TOWNSEND, H. G. . G.; LUNN, D. P. Equine influenza infection. In: SELLON, D. C.; LONG, M. T. (Ed.). **Equine Infectious Diseases**. 1. ed. St. Louis, USA: Saunders, 2007. p. 124–133.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

LARSON, K. R. L.; HEIL, G. L.; CHAMBERS, T. M.; CAPUANO, A.; WHITE, S. K.; GRAY, G. C. Serological evidence of equine influenza infections among persons with horse exposure, Iowa. **Journal of Clinical Virology**, v. 67, p. 78–83, 2015.

LEAR, J. D. Proton conduction through the M2 protein of the influenza A virus; a quantitative, mechanistic analysis of experimental data. **FEBS Letters**, v. 552, n. 1, p. 17–22, 2003.

LEE, C.; SUAREZ, D. L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 1–15, 2005.

LEGRAND, L. J.; PITEL, P. H. Y.; CULLINANE, A. A.; FORTIER, G. D.; PRONOST, S. L. Genetic evolution of equine influenza strains isolated in France from 2005 to 2010. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 2, p. 207–211, 2015.

LI, J.; YU, M.; ZHENG, W.; LIU, W. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2668–2682, 2015.

LI, Q.; SUN, X.; LI, Z.; LIU, Y.; VAVRICKA, C. J.; QI, J.; GAO, G. F. Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 46, p. 18897–18902, 2012.

LI, S.; MIN, J.; KRUG, R. M.; SEN, G. C. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. **Virology**, v. 349, n. 1, p. 13–21, 2006.

LIANG, Y.; HONG, Y.; PARSLOW, T. G. cis-Acting Packaging Signals in the Influenza Virus PB1, PB2, and PA Genomic RNA Segments. **Journal of virology**, v. 79, n. 16, p. 10348–10355, 2005.

LIN, C.; HOLLAND JR., R. E.; DONOFRIO, J. C.; MCCOY, M. H.; TUDOR, L. R.; CHAMBERS, T. M. Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 357–365, 2002.

LOUREIRO, B. O. **Estudo de um surto de influenza eqüina ocorrido em 2001 no estado do rio de janeiro mediante a caracterização do vírus e avaliação do esquema vacinal**. 2004. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2004.

LU, L.; LYCETT, S. J.; BROWN, A. J. L. Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 16, 2014.

LU, Y.; WAMBACH, M.; KATZE, M. G.; KRUG, R. M. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. **Virology**, v. 214, n. 1, p. 222–228, 1995.

MANCINI, D. A. P.; GERALDES, E. A.; PINTO, J. R.; SOARES, M. A. Ocorrência de influenza equina na fazenda São Joaquim, São Roque - SP, do Instituto Butantan. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 93–100, 1988.

MANRUBIA, S. C.; ESCARMÍS, C.; DOMINGO, E.; LÁZARO, E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. **Gene**, v. 347, n. 2, p. 273–282, 2005.

MAPA. **PNSE - Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/sanidade-de-equideos>>. Acesso em: 13 set. 2017.

MARKLUND, J. K.; YE, Q.; DONG, J.; TAO, Y. J.; KRUG, R. M. Sequence in the influenza A virus nucleoprotein required for viral polymerase binding and RNA synthesis. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p. 7292–7297, 2012.

MELÉN, K.; KINNUNEN, L.; FAGERLUND, R.; IKONEN, N.; TWU, K. Y.; KRUG, R. M.; JULKUNEN, I. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. **Journal of virology**, v. 81, n. 11, p. 5995–6006, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1900311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MORENS, D. M.; TAUBENBERGER, J. K. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 4, n. 6, p. 327–337, 2010.

MORI, K.; MURANO, K.; OHNIWA, R. L.; KAWAGUCHI, A.; NAGATA, K. Oseltamivir Expands Quasispecies of Influenza Virus through Cell-to-cell Transmission. **Scientific Reports**, v. 5, n. 9163, p. 1–7, 2015.

MORLEY, P. S.; TOWNSEND, H. G.; BODGAN, J. R.; HAINES, D. M. Descriptive epidemiologic study of disease associated with influenza virus infections during three epidemics in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 126, n. 4, p. 535–544, 2000.

MUKAIGAWA, J.; NAYAK, D. P. Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. **Journal of Virology**, v. 65, n. 1, p. 245–253, 1991.

MUMFORD, E. L.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; CARMAN, J.; CALLAN, R. J.; COLLINS, J. K.; GOLTZ, K. L.; ROMM, S. R.; TARR, S. F.; SALMAN, M. D. Occurrence of infectious upper respiratory tract disease and response to vaccination in horses on six sentinel premises in northern Colorado. **Equine veterinary journal**, v. 35, n. 1, p. 72–77, 2003.

MURAKAMI, S.; ENDOH, M.; KOBAYASHI, T.; TAKENAKA-UEMA, A.; CHAMBERS, J. K.; UCHIDA, K.; NISHIHARA, M.; HAUSE, B.; HORIMOTO, T. Influenza D virus infection in herd of cattle, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 8, p. 1517–1519, 2016.

MURAMOTO, Y.; NODA, T.; KAWAKAMI, E.; AKKINA, R.; KAWAOKA, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA.

**Journal of Virology**, v. 87, n. 5, p. 2455–2462, 2013.

MURAMOTO, Y.; TAKADA, A.; FUJII, K.; NODA, T.; IWATSUKI-HORIMOTO, K.; WATANABE, S.; HORIMOTO, T.; KIDA, H.; KAWAOKA, Y. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. **Journal of virology**, v. 80, n. 5, p. 2318–2325, 2006.

MURCIA, P. R.; BAILLIE, G. J.; DALY, J.; ELTON, D.; JERVIS, C.; MUMFORD, J. A.; NEWTON, R.; PARRISH, C. R.; HOELZER, K.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J.; LENNARD, N.; ORMOND, D.; MOULE, S.; WHITWHAM, A.; MCCAULEY, J. W.; MCKINLEY, T. J.; HOLMES, E. C.; GRENFELL, B. T.; WOOD, J. L. N. Intra- and interhost evolutionary dynamics of equine influenza virus. **Journal of virology**, v. 84, n. 14, p. 6943–54, 2010.

MURCIA, P. R.; BAILLIE, G. J.; STACK, J. C.; JERVIS, C.; ELTON, D.; MUMFORD, J. A.; DALY, J.; KELLAM, P.; GRENFELL, B. T.; HOLMES, E. C.; WOOD, J. L. N. Evolution of equine influenza virus in vaccinated horses. **Journal of virology**, v. 87, n. 8, p. 4768–4771, 2013.

MURCIA, P. R.; WOOD, J. L. N.; HOLMES, E. C. Genome-Scale Evolution and Phylodynamics of Equine H3N8 Influenza A Virus. **Journal of Virology**, v. 85, n. 11, p. 5312–5322, 2011.

NATH, S.; NAYAK, D. P. Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1N1). **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 8, p. 4139–4145, 1990.

NAYAK, D. P.; BALOGUN, R. A.; YAMADA, H.; ZHOU, Z. H.; BARMAN, S. Influenza virus morphogenesis and budding. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 147–161, 2009.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. [s.l.] Oxford University Press, New York, 2000.

NEMEROFF, M. E.; BARABINO, S. M. L.; LI, Y.; KELLER, W.; KRUG, R. M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. **Molecular Cell**, v. 1, n. 7, p. 991–1000, 1998.

NEMEROFF, M. E.; QIAN, X.; KRUG, R. M. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. **Virology**, v. 212, p. 422–428, 1995.

NEWTON, J. R.; DALY, J. M.; SPENCER, L.; MUMFORD, J. A. Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. **The Veterinary Record**, v. 158, n. 6, p. 185–192, 2006.

NIETO, A.; LUNA, S.; BARCENA, J.; PORTELA, A.; ORTIN, J.; BÁRCENA, J.; PORTELA, A.; ORTÍN, J. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. **The Journal of General Virology**, v. 75,

n. 1, p. 29–36, 1994.

NOBUSAWA, E.; AOYAMA, T.; KATO, H.; SUZUKI, Y.; TATENO, Y.; NAKAJIMA, K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. **Virology**, v. 182, n. 2, p. 475–485, 1991.

NYAGA, P. N.; WIGGINS, A. D.; PRIESTER, W. A. Epidemiology of equine influenza risk by age, breed and sex. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 3, p. 67–73, 1980.

OIE. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations.** Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D6325.PDF>>. Acesso em: 9 ago. 2017.

OIE. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations.** Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D10847.PDF>>. Acesso em: 9 ago. 2017.

OIE. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial Manual - Equine Influenza**, n. cap. 2. 5. 7., p. 1–14, 2012.

OIE. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial Manual - Equine Influenza**, n. cap. 2. 5. 7., p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 9 ago. 2017.

OIE. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations.** Disponível em: <<http://www.oie.int/our-scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/equine-influenza/>>. Acesso em: 11 set. 2017.

OZAWA, M.; KAWAOKA, Y. Cross Talk Between Animal and Human Influenza Viruses. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 21–42, 2013.

PALESE, D.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M. (Ed.). **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 3091.

PARK, A. W.; DALY, J. M.; LEWIS, N. S.; SMITH, D. J.; WOOD, J. L. N.; GRENFELL, B. T. Quantifying the impact of immune escape on transmission dynamics of influenza. **Science**, v. 326, n. 5953, p. 726–728, 2009.

PECORARO, H. L.; BENNETT, S.; GARRETSON, K.; QUINTANA, A. M.; LUNN, K. F.; LANDOLT, G. A. Comparison of the infectivity and transmission of contemporary canine and equine H3N8 influenza viruses in dogs. **Veterinary Medicine International**, v. 2013, n. 874521, p. 1–10, 2013.

PEEK, S. F.; LANDOLT, G.; KARASIN, A. I.; SLACK, J. A.; STEINBERG, H.; SEMRAD, S. D.; OLSEN, C. W. Acute respiratory distress syndrome and fatal interstitial pneumonia associated with equine influenza in a neonatal foal. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 132–134, 2004.

PEREIRA, H. G.; TAKIMOTO, S.; PIEGAS, N. S.; DO VALLE, L. A. Antigenic variation of equine (Heq2Neq2) influenza virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 47, n. 4, p. 465–469, 1972.

PERGLIONE, C. O.; GILDEA, S.; RIMONDI, A.; MIÑO, S.; VISSANI, A.; CAROSSINO, M.; CULLINANE, A.; BARRANDEGUY, M. Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 1, p. 37–46, 2016.

PIEGAS, N. S.; TAKIMOTO, S.; BARBOSA, H. C.; LACERDA, J. P.; GUARNIERI, R.; ISHIMARU, T. Isolamento do vírus influenza de surto de gripe equina em São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 15, Resumos, Rio de Janeiro., **Anais...**1976.

PINTO, L. H.; HOLSINGER, L. J.; LAMBT, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. **Cell**, v. 69, p. 517–528, 1992.

POND, S. L. K.; POSADA, D.; GRAVENOR, M. B.; WOELK, C. H.; FROST, S. D. W. GARD: A genetic algorithm for recombination detection. **Bioinformatics**, v. 22, n. 24, p. 3096–3098, 2006.

PUSTERLA, N.; KASS, P. H.; MAPES, S.; JOHNSON, C.; BARNETT, D. C.; VAALA, W.; GUTIERREZ, C.; MCDANIEL, R.; WHITEHEAD, B.; MANNING, J. Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. **Veterinary Record**, v. 169, n. 1, p. 12, 2011.

PUSTERLA, N.; KASS, P. H.; MAPES, S.; WADEMAN, C.; AKANA, N.; BARNETT, C.; MACKENZIE, C.; VAALA, W. Voluntary Surveillance Program for Equine Influenza Virus in the United States from 2010 to 2013. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 1, p. 417–422, 2015.

RAMBAUT, A. **FigTree Tree Figure Drawing Tool, Version 1.4.2**. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 9 ago. 2017.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, W.; DRUMMOND, A. J. **Tracer MCMC Trace Analysis Tool, Version v1.6.0**. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>. Acesso em: 9 ago. 2017.

READ, A. J.; FINLAISON, D. S.; GU, X.; DAVIS, R. J.; ARZEY, K. E.; KIRKLAND, P. D. Application of real-time PCR and ELISA assays for equine influenza virus to determine the duration of viral RNA shedding and onset of antibody response in naturally infected horses. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. Suppl.1, p. 42–43, 2011.



RESA-INFANTE, P.; JORBA, N.; COLOMA, R.; ORTIN, J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. **RNA biology**, v. 8, n. 2, p. 207–215, 2011.

REZENDE, J. M. Epidemia, endemia, pandemia. Epidemiologia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 153–155, 1998.

ROGERS, G. N.; PAULSON, J. C. Receptor Determinants of Human and Animal Influenza Virus Isolates: Differences in Receptor Specificity of the H3 Hemagglutinin Based on Species of Origin. **Virology**, v. 127, n. 2, p. 361–373, 1983.

ROGERS, G. N.; SOUZA, B. L. Receptor Binding Properties of Human and Animal H1 Influenza Virus Isolates. **Virology**, v. 173, p. 317–322, 1989.

SAITO, T.; TAYLOR, G.; LAVER, W. G.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Antigenicity of the N8 influenza A virus neuraminidase: existence of an epitope at the subunit interface of the neuraminidase. **Journal of Virology**, v. 68, n. 3, p. 1790–1796, 1994.

SAMMARCO, A. M. **Images of america: the great boston fire of 1872**. San Francisco, CA, USA: Arcadia Publishing, 1997.

SATTERLY, N.; TSAI, P.; DEURSEN, J.; NUSSENZVEIG, D. R.; WANG, Y.; FARIA, P. A.; LEVAY, A.; LEVY, D. E.; FONTOURA, B. M. A. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 6, p. 1853–1858, 2007.

SCHEIFFELE, P.; RIETVELD, A.; SIMONS, K.; WILK, T. Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains during Budding from the Plasma Membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2038–2044, 1999.

SHAW, M. L.; PALESE, P. Orthomyxoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2013. p. 1151–1185.

SHOPE, R. . E. Swine influenza: I. Experimental transmission and pathology. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 54, n. 3, p. 349–59, 1931.

SHTYRYA, Y. A.; MOCHALOVA, L. V; BOVIN, N. V. Influenza virus neuraminidase: structure and function. **Acta naturae**, v. 1, n. 2, p. 26–32, 2009.

SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 69, p. 531–569, 2000.

SLEIGH, A. Outbreaks, epidemics and clusters. In: WEBB, P.; BAIN, C. (Ed.). **Essential Epidemiology**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 2011. p. 276–305.

SMITH, D. J. Applications of bioinformatics and computational biology to influenza surveillance and vaccine strain selection. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1758–1761, 2003.

SMITH, G. L.; HAY, A. J. Transcription of the influenza virus genome. **Virology**, v. 83, n. 1, p. 337–355, 1977.

SMITH, G. L.; HAY, A. J. Replication of the influenza virus genome. **Virology**, v. 118, n. 1, p. 96–108, 1982.

SMITH, W.; ANDREWES, C. H.; LAIDLAW, P. P. A virus obtained from influenza patients. **The Lancet**, v. 222, n. 5732, p. 66–68, 1933.

SOLÓRZANO, A.; WEBBY, R. J.; LAGER, K. M.; JANKE, H.; GARCÍA-SASTRE, A.; RICHT, J. A. Mutations in the NS1 Protein of Swine Influenza Virus Impair Anti-Interferon Activity and Confer Attenuation in Pigs. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7535–7543, 2005.

STARICK, E.; WERNER, O.; SCHIRRMIEIER, H.; KÖLLNER, B.; RIEBE, R.; MUNDT, E. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, n. 8, p. 370–375, 2006.

STRENGELL, M.; IKONEN, N.; ZIEGLER, T.; JULKUNEN, I. Minor changes in the hemagglutinin of influenza a(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

SU, S.; WANG, L.; FU, X.; HE, S.; HONG, M.; ZHOU, P.; LAI, A.; GRAY, G.; LI, S. Equine Influenza A(H3N8) Virus Infection in Cats. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 12, p. 2096–2099, 2014.

SUAREZ, D. L. Influenza A virus. In: SWAYNE, D. E. (Ed.). **Avian Influenza**. 1. ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2008. p. 3–22.

SUZUKI, Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 3, p. 399–408, 2005.

SUZUKI, Y.; ITO, T.; SUZUKI, T.; HOLLAND, R. E.; CHAMBERS, T. M.; KISO, M.; ISHIDA, H.; KAWAOKA, Y. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. **Journal of Virology**, v. 74, n. 24, p. 11825–11831, 2000.

TAKEDA, M.; PEKOSZ, A.; SHUCK, K.; PINTO, L. H.; LAMB, R. A. Influenza A Virus M2 Ion Channel Activity Is Essential for Efficient Replication in Tissue Culture. **Journal of Virology**, v. 76, n. 3, p. 1391–1399, 2002.

TARENDEAU, F.; BOUDET, J.; GUILLIGAY, D.; MAS, P. J.; BOUGAULT, C. M.; BOULO, S.; BAUDIN, F.; RUIGROK, R. W. H.; DAIGLE, N.; ELLENBERG, J.; CUSACK, S.; SIMORRE, J.; HART, D. J. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 14, n. 3, p. 229–233, 2007.

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D. A. A.; CHEN, L. M.; RECUENCO, S.; ELLISON, J. A.; DAVIS, C. T.; YORK, I. A.; TURMELLE, A. S.; MORAN, D.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M. R.; TANG, K.; ROWE, L. A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K. A.; COX, N. J.; ANDERSON, L. J.; RUPPRECHT, C. E.; DONIS, R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J.; CHEN, L. M.; JOHNSON, A.; TAO, Y.; DREYFUS, C.; YU, W.; MCBRIDE, R.; CARNEY, P. J.; GILBERT, A. T.; CHANG, J.; GUO, Z.; DAVIS, C. T.; PAULSON, J. C.; STEVENS, J.; RUPPRECHT, C. E.; HOLMES, E. C.; WILSON, I. A.; DONIS, R. O. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003657, 2013.

TREBBIEN, R.; LARSEN, L. E.; VIUFF, B. M. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 434, 2011.

VILLALOBOS, E. M. C.; MORI, E.; LARA, M. C. C. S. H.; AL., E. Isolation, sequencing and phylogenetic analysis of equine influenza virus causing the 2012 outbreak in São Paulo, Brazil. Virus Reviews and Research. In: XXIV Congresso Brasileiro de Virologia, VIII Encontro de Virologia do Mercosul. Vol 18. Porto Seguro, Bahia, Brazil, **Anais...**2013.

VIRMANI, N.; BERA, B. C.; SHANUMUGASUNDARAM, K.; SINGH, B. K.; GULATI, B. R.; SINGH, R. K.; VAID, R. K. Genetic analysis of the matrix and non-structural genes of equine influenza virus (H3N8) from epizootic of 2008–2009 in India. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 169–175, 2011.

WADDEL, G. H.; TEIGLAND, M. B.; SIGEL, M. M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 587–590, 1963.

WANG, P.; PALESE, P.; O'NEILL, R. E. The NPI-1/NPI-3 (Karyopherin  $\alpha$ ) binding site on the influenza A virus nucleoprotein is a nonconventional nuclear localization signal. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 1850–1856, 1997.

WANG, W.; KRUG, R. M. The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. **Virology**, v. 223, n. 1, p. 41–50, 1996.

WANG, X.; BASLER, C. F.; WILLIAMS, B. R. G.; SILVERMAN, R. H.; PALESE, P.; GARCÍA-SASTRE, A. Functional replacement of the carboxy-terminal two-

thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. **Journal of virology**, v. 76, n. 24, p. 12951–12962, 2002.

WANG, Z.; LIU, X.; ZHAO, Z.; XU, C.; ZHANG, K.; CHEN, C.; SUN, L.; GAO, G. F.; YE, X.; LIU, W. Cyclophilin E functions as a negative regulator to influenza virus replication by impairing the formation of the viral ribonucleoprotein complex. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22625, 2011.

WATANABE, T.; WATANABE, S.; NODA, T.; FUJII, Y.; KAWAOKA, Y. Exploitation of Nucleic Acid Packaging Signals To Generate a Novel Influenza Virus-Based Vector Stably Expressing Two Foreign Genes. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10575–10583, 2003.

WATSON, J.; HALPIN, K.; SELLECK, P.; AXELL, A.; BRUCE, K.; HANSSON, E.; HAMMOND, J.; DANIELS, P.; JEGGO, M. Isolation and characterisation of an H3N8 equine influenza virus in Australia, 2007. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. SUPPL.1, p. 35–37, 2011a.

WATSON, J.; SELLECK, P.; AXELL, A.; BRUCE, K.; TAYLOR, T.; HEINE, H.; DANIELS, P.; JEGGO, M. Diagnosis of equine influenza virus infections in quarantine stations in Australia, 2007. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. Suppl.1, p. 4–6, 2011b.

WEBSTER, R. G. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 6, p. 537–538, 1993.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J. Genetics of influenza virus. **Annual Reviews of Genetics**, v. 12, p. 415–431, 1978.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 152–179, 1992.

WEBSTER, R. G.; LAVER, W. G. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. **Virology**, v. 104, n. 1, p. 139–148, 1980.

WHO. **World Health Organization - Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza**, 2011. .

WILLOUGHBY, R.; ECKER, G.; MCKEE, S.; RIDDOLLS, L.; VERNAILLEN, C.; DUBOVI, E.; LEIN, D.; MAHONY, J. B.; CHERNESKY, M.; NAGY, E.; STAEMPFI, H. The effects of equine rhinovirus, influenza virus and herpesvirus infection on tracheal clearance rate in horses. **Canadian journal of veterinary research**, v. 56, n. 2, p. 115–121, 1992.

WOODWARD, A. L.; RASH, A. S.; BLINMAN, D.; BOWMAN, S.; CHAMBERS, T. M.; DALY, J. M.; DAMIANI, A.; JOSEPH, S.; LEWIS, N.; MCCAULEY, J. W.; MEDCALF, L.; MUMFORD, J.; NEWTON, J. R.; TIWARI, A.; BRYANT, N. A.;

ELTON, D. M. Development of a surveillance scheme for equine influenza in the UK and characterisation of viruses isolated in Europe, Dubai and the USA from 2010-2012. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 113-127, 2014.

WOODWARD, A.; RASH, A. S.; MEDCALF, E.; BRYANT, N. A.; ELTON, D. M. Using epidemics to map H3 equine influenza virus determinants of antigenicity. **Virology**, v. 481, p. 187-198, 2015.

WRIGHT, P.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed.). **Fields virology**. 6. ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams e Wilkins, 2013. p. 1186-1243.

WU, Y.; WU, Y.; TEFSEN, B.; SHI, Y.; GAO, G. F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 183-191, 2014.

YAMANAKA, T.; NEMOTO, M.; BANNAI, H.; TSUJIMURA, K.; KONDO, T.; MATSUMURA, T.; GILDEA, S.; CULLINANE, A. Assessment of antigenic difference of equine influenza virus strains by challenge study in horses. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 6, p. 536-539, 2016.

YAMANAKA, T.; NIWA, H.; KONDO, T.; MATSUMURA, T. Epidemic of Equine Influenza among Vaccinated Racehorses in Japan in 2007. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 6, p. 623-625, 2008.

YAMANAKA, T.; TSUJIMURA, K.; KONDO, T.; MATSUMURA, T.; ISHIDA, H.; KISO, M.; HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Infectivity and pathogenicity of canine H3N8 influenza A virus in horses. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 4, n. 6, p. 345-351, 2010.

YONDON, M.; HEIL, G. L.; BURKS, J. P.; ZAYAT, B.; WALTZEK, T. B.; JAMIYAN, B. O.; MCKENZIE, P. P.; KRUEGER, W. S.; FRIARY, J. A.; GRAY, G. C. Isolation and characterization of H3N8 equine influenza A virus associated with the 2011 epizootic in Mongolia. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 5, p. 659-665, 2013.

ZEBEDEE, S. L.; LAMB, R. A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. **Journal of virology**, v. 62, n. 8, p. 2762-2772, 1988.

ZHANG, J.; PEKOSZ, A.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 74, n. 10, p. 4634-4644, 2000.

ZHOU, N. N.; SHORTRIDGE, K. F.; CLAAS, E. C.; KRAUSS, S. L.; WEBSTER, R. G. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 3366-74, 1999.

ZHU, X.; YANG, H.; GUO, Z.; YU, W.; CARNEY, P. J.; LI, Y.; CHEN, L. M.;

PAULSON, J. C.; DONIS, R. O.; TONG, S.; STEVENS, J.; WILSON, I. A. Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. 18903–18908, 2012.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of theoretical biology**, v. 8, n. 2, p. 357–366, 1965.









ANEXO A – Números de acesso da base de dados EpiFlu™ GISAID referentes às sequências de nucleotídeos de EIVs utilizados no presente estudo.

Identificação	Gene	Nome do isolado	Data da coleta (yyyy-mm-dd)	País ou região	Laboratório de origem	Laboratório que submeteu	Autores
EPI ISL 205763	HA NA	A/equine/Norfolk/1/2015	12-08-15	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust, Newmarket	
EPI ISL 205764	HA NA	A/equine/North Yorkshire/1/2015	10-03-15	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust, Newmarket	
EPI ISL 207225	HA NA	A/equine/North Yorkshire/2/2015	08-04-15	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust, Newmarket	
EPI ISL 205957	HA NA	A/equine/Leicestershire/1/2015	22-04-15	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust, Newmarket	
EPI ISL 212044	HA NA	A/equine/Scottish Borders/3/2015	23-07-15	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust, Newmarket	
EPI ISL 220480	HA NA M NP NS PA PB1 PB2	A/equine/Tennessee/28A/2014	21-10-14	United States	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital	Importado de outra base de dados	Danner A, Friedman K, Krauss S, Webby R, Franks J
EPI ISL 220481	HA M NP NS PB2	A/equine/Tennessee/4A/2014	21-10-14	United States	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital	Importado de outra base de dados	Danner A, Friedman K, Krauss S, Webby R, Franks J
EPI ISL 220482	HA M NP NS PA	A/equine/Tennessee/30A/2014	21-10-14	United States	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital	Importado de outra base de dados	Danner A, Friedman K, Krauss S, Webby R, Franks J

(continuação)

EPI ISL 220484	PB1 HA M NP NS PA PB1 PB2	A/equine/Tennessee/28B/2014	21-10-14	United States	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital	Importado de outra base de dados	Danner A, Friedman K, Krauss S, Webby R, Franks J
EPI ISL 220485	HA M NP NS PB1 PB2	A/equine/Tennessee/29A/2014	21-10-14	United States	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital	Importado de outra base de dados	Danner A, Friedman K, Krauss S, Webby R, Franks J
EPI ISL 220483	HA M NP NS PA PB1 PB2	A/equine/Tennessee/27A/2014	21-10-14	United States	Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital	Importado de outra base de dados	Danner A, Friedman K, Krauss S, Webby R, Franks J
EPI ISL 151130	HA	A/equine/Xuzhou/01/2013	27-08-13	China	Veterinary Disease Diagnostic Center, Shanghai Animal Disease Control Center	Importado de outra base de dados	Ge F, Liu J, Yang D, Ju H, Zhou J
EPI ISL 151796	HA NA	A/equine/Ayrshire/1/2013	12-02-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151797	HA	A/equine/Hertfordshire/1/2013	27-06-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151841	HA NA	A/equine/Northamptonshire/1/2013	15-07-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151845	HA NA	A/equine/Worcestershire/1/2013	02-09-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151846	HA NA	A/equine/Warwickshire/1/2013	05-09-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151847	HA	A/equine/East Yorkshire/1/2013	12-09-13	United	Animal Health	Animal Health	

	NA			Kingdom,	Trust	Trust	
EPI ISL 151981	HA NA	A/equine/Lanarkshire/1/2013	30-09-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151982	HA	A/equine/Lanarkshire/2/2013	15-10-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151984	HA NA	A/equine/Northamptonshire/7/2013	17-10-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151985	HA NA	A/equine/Shropshire/5/2013	23-10-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 151986	HA NA	A/equine/Shropshire/8/2013	06-12-13	United Kingdom,	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI ISL 177502	HA NA NP M NS PA PB1 PB2	A/equine/Rio Grande do Sul/1/2012	08-03-12	Brazil	Universidade Estadual de Londrina, Paraná	Animal Health Trust, Newmarket	Beuttemüller EA, Woodward A, Rash A, Ferraz LES, Alfieri AF., Alfieri AA, Elton D.
EPI ISL 177501	HA NA NP M NS PA PB1 PB2	A/equine/Dubai/1/2012	31-05-12	United Arab Emirates, Dubai	Central Veterinary Research Laboratory, Dubai	Animal Health Trust, Newmarket	Woodward AL, Rash AS, Blinman D, Bowman S, Chambers TM, Daly JM, Damiani A, Joseph S, Lewis N, McCauley JW, Medcalf L, Mumford J, Newton JR, Tiwari A, Bryant NA, Elton DM
EPI ISL 177500	HA NA M NP PA PB2	A/equine/Kentucky/1/2011	01-01-11	United States	Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, University of Kentucky	Animal Health Trust, Newmarket	Woodward AL, Rash AS, Blinman D, Bowman S, Chambers TM, Daly JM, Damiani A, Joseph S, Lewis N, McCauley JW, Medcalf L, Mumford J, Newton JR, Tiwari A, Bryant NA, Elton DM
EPI ISL 177498	HA NA M NP PA	A/equine/California/1/2010	01-01-10	United States	Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary	Animal Health Trust, Newmarket	Woodward AL, Rash AS, Blinman D, Bowman S, Chambers TM, Daly JM, Damiani A, Joseph S, Lewis N, McCauley JW, Medcalf L,

(continuação)

	PB1 PB2				Science, University of Kentucky		Mumford J, Newton JR, Tiware A, Bryant NA, Elton DM
EPI ISL 180684	HA	A/Equine/Sweden/SVA111206SZ0 085/VIR165837/2011	05-12-11	Sweden	National Veterinary Institute, Uppsala	National Veterinary Institute, Uppsala	Zohari S, Back H
EPI ISL 240665	HA NA M NP NS PA PB2	A/equine/South Africa/4/2003	12-09-03	South Africa	Equine Research Centre, University of Pretoria	Animal Health Trust, Newmarket	
EPI ISL 9534	NA	A/equine/Ohio/1/2003	2003 (Mês e dia desconhecidos)	United States	Division of Viral and Rickettsial Diseases, Influenza Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA	Importado de outra base de dados	Crawford PC, Dubovi EJ, Castelman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Bright RA, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AL, Katz JM, Donis RO.
EPI969024 EPI969057 EPI969062 EPI969029 EPI969069 EPI969075 EPI969081 EPI969087	HA NA M NP NS PB2 PB1 PA	A/equine/Saone-et-Loire/1/2015	01-03-15	França		Importado de outra base de dados	Fougerolle S, Legrand L, Lecouturier F, Sailleau C, Paillot R, Hans A, Pronost S.
EPI873586 EPI873587 EPI873588 EPI873591 EPI873592 EPI873589 EPI873593 EPI873590	PB2 PB1 PA M NA NS HA NP	A/Equine/Kent/1/15	06-10-15	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI873580	PA	A/Equine/East Sussex/1/2015	03-11-15	United	Animal Health	Animal Health	

EPI873581 EPI873582 EPI873608 EPI873584 EPI873585 EPI873583 EPI873607	NS NP PB1 HA NA M PB2			Kingdom	Trust	Trust	
EPI651401 EPI651399 EPI651402 EPI651397 EPI662160	M NP NS PA PB1	A/equine/Buckinghamshire/1/2014	06-11-14	United Kingdom	Animal Health Trust	Animal Health Trust	
EPI969061 EPI969028 EPI969068 EPI969086 EPI969080 EPI969074	M NP NS PA PB1 PB2	A/equine/Gironde/1/2014	01-03-14	France		Importado de outra base de dados	Fougerolle S, Legrand L, Lecouturier F, Sailleau C, Paillot R, Hans A, Pronost S.
EPI969063 EPI969078	M PB1	A/equine/Neuville-Pres-Sees/1/2011	01-03-11	France		Importado de outra base de dados	Fougerolle S, Legrand L, Lecouturier F, Sailleau C, Paillot R, Hans A, Pronost S.
EPI969027 EPI969067 EPI969085 EPI969079 EPI969073	NP NS PA PB1 PB2	A/equine/Cambremer/1/2012	01-03-12	France		Importado de outra base de dados	Fougerolle S, Legrand L, Lecouturier F, Sailleau C, Paillot R, Hans A, Pronost S.



ANEXO B – Números de acesso da base de dados *GenBank* referentes às sequências de nucleotídeos de EIVs utilizados no presente estudo.

ID do segmento	Gene	Nome do vírus
KF806985.1	HA	A/equine/Xuzhou/01/2013
KC986390.2	HA	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KM359812.1	HA	A/equine/OR/78356/2012
KF712451.1	HA	A/equine/South Kazakhstan/236/2012
KF026412.1	HA	A/equine/Dubai/2/2012
KF026413.1	HA	A/equine/Dubai/3/2012
KF026407.1	HA	A/equine/Kentucky/1/2012
KF026408.1	HA	A/equine/Kentucky/2/2012
KF026409.1	HA	A/equine/Kentucky/3/2012
KJ372713.1	HA	A/equine/Argentina/E-2345-1/2012
KP202377.1	HA	A/equine/Baizak/09/2012
KF026392.1	HA	A/equine/Worcestershire/2/2012
KF026396.1	HA	A/equine/County_Durham/2/2012
KF026402.1	HA	A/equine/Pennsylvania/1-2/2011
KF026399.1	HA	A/equine/New_York/1/2011
KF026401.1	HA	A/equine/Kentucky/4/2011
KF026400.1	HA	A/equine/Kentucky/1/2011
KP202378.1	HA	A/equine/LKZ/09/2012
JX549063.1	HA	A/equine/Mongolia/20/2011
AB727561.1	HA	A/equine/Yokohama/aq79/2011
AB727559.1	HA	A/equine/Yokohama/aq53/2011
AB727557.1	HA	A/equine/Yokohama/aq29/2011
AB727555.1	HA	A/equine/Yokohama/aq5/2011
KM359811.1	HA	A/equine/FL/146609/2011
AB745622.1	HA	A/equine/Mongolia/6/2011
KF317697.1	HA	A/equine/Tiaret/1/2011
JX844146.2	HA	A/equine/Kyonggi/SA1/2011
JQ265982.2	HA	A/equine/Heilongjiang/1/2010
GU396102.1	HA	A/equine/Ahmedabad/1/2009
AB618504.1	HA	A/equine/Yokohama/aq13/2010
AB544410.1	HA	A/equine/Yokohama/aq19/2009
AB543705.1	HA	A/equine/Hokkaido/I828/2008
GU396101.1	HA	A/equine/Mysore/1/2008
EU794495.1	HA	A/equine/Gansu/7/2008
EU794503.1	HA	A/equine/Hubei/6/2008
EU794511.1	HA	A/equine/Heilongjiang/10/2008
FJ209731.1	HA	A/equine/Egypt/6066NAMRU3-VSVRI/2008
EU794519.1	HA	A/equine/Liaoning/9/2008
FJ888344.1	HA	A/equine/Katra-Jammu/6/2008
KP693700.1	HA	A/equine/Guangxi/1/2008



(continuação)

JN222937.1	HA	A/equine/Down/1/2008
EU794527.1	HA	A/equine/Inner Mongolia/8/2008
AB591842.1	HA	A/equine/Tottori/1/2007
JF683499.1	HA	A/equine/Otar/764/2007
GU571144.1	HA	A/equine/Huabei/1/2007
EU794575.1	HA	A/donkey/Xinjiang/5/2007
HQ917682.1	HA	A/equine/Colorado/10/2007
JN222936.1	HA	A/equine/Kildare/1/2007
JN222934.1	HA	A/equine/Donegal/1/2007
FJ195398.2	HA	A/equine/Lincolnshire/1/2007
FJ195395.3	HA	A/equine/Richmond/1/2007
EU794543.1	HA	A/equine/Xinjiang/1/2007
CY067566.1	HA	A/equine/New York/146066/2007
CY075851.1	HA	A/equine/Spain/1/2007
CY067510.1	HA	A/equine/Montana/9233/2007
EU794551.1	HA	A/equine/Xinjiang/2/2007
EU794559.1	HA	A/equine/Xinjiang/3/2007
EU794567.1	HA	A/equine/Xinjiang/4/2007
EU855744.1	HA	A/equine/Guelph/06-28865/2006
EU926631.1	HA	A/equine/Lonquen/1/2006
CY067318.1	HA	A/equine/Ohio/113461-1/2005
CY067310.1	HA	A/equine/Ohio/113461-2/2005
CY067326.1	HA	A/equine/Ohio/113461-3/2005
CY067558.1	HA	A/equine/Virginia/131054-3/2005
CY067286.1	HA	A/equine/Texas/117793/2005
JF498589.1	HA	A/equine/Florida/779/2004
JF498588.1	HA	A/equine/Florida/612/2004
EU855742.1	HA	A/equine/Guelph/G04-54701/2004
EU855743.1	HA	A/equine/Guelph/G03-0250/2003
DQ124192.1	HA	A/equine/Ohio/1/2003
EU855741.1	HA	A/equine/Guelph/G03-55399/2003
FJ375213.1	HA	A/equine/Newmarket/5/2003
DQ222913.1	HA	A/equine/Wisconsin/1/2003
CY030759.1	HA	A/equine/California/8560/2002
CY030181.1	HA	A/equine/Kentucky/8/1994
CY032357.1	HA	A/equine/Switzerland/173/1993
CY030149.1	HA	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032349.1	HA	A/equine/Austria/421/1992
CY032341.1	HA	A/equine/Italy/1199/1992
CY032333.1	HA	A/equine/Italy/824/1991
CY032373.1	HA	A/equine/Italy/1062/1991
CY032365.1	HA	A/equine/Roma/5/1991
CY030173.1	HA	A/equine/Kentucky/1/1991
CY030157.1	HA	A/equine/Alaska/29759/1991
CY030141.1	HA	A/equine/Texas/39655/1991
CY030133.1	HA	A/equine/Kentucky/1277/1990

(continuação)

CY032413.1	HA	A/equine/Berlin/1/1989
CY032325.1	HA	A/equine/Rook/93753/1989
CY032317.1	HA	A/equine/Sussex/1/1989
CY030125.1	HA	A/equine/Kentucky/698/1988
CY030117.1	HA	A/equine/Kentucky/694/1988
CY030109.1	HA	A/equine/Kentucky/692/1988
CY030101.1	HA	A/equine/Kentucky/1/1987
CY031538.1	HA	A/equine/Kentucky/2/1987
GU052337.1	HA	A/equine/Kentucky/211/1987
CY030165.1	HA	A/equine/Tennessee/5/1986
CY032229.1	HA	A/equine/Kentucky/3/1986
CY032221.1	HA	A/equine/Kentucky/2/1986
CY030093.1	HA	A/equine/Kentucky/1/1986
CY032953.1	HA	A/equine/Johannesburg/1/1986
CY032309.1	HA	A/equine/Santa Fe/1/1985
CY032301.1	HA	A/equine/Cordoba/18/1985
CY028916.1	HA	A/equine/New York/VR-297/1983
CY030085.1	HA	A/equine/California/83/1982
CY028908.1	HA	A/equine/California/103/1982
CY028892.1	HA	A/equine/Georgia/13/1981
CY028900.1	HA	A/equine/Kentucky/magnificent genius1/1981
CY028884.1	HA	A/equine/Georgia/10/1981
CY030743.1	HA	A/equine/Kentucky/Rosie100/1981
CY028876.1	HA	A/equine/Georgia/9/1981
CY030077.1	HA	A/equine/Kentucky/3/1981
CY028868.1	HA	A/equine/Georgia/3/1981
CY028860.1	HA	A/equine/Georgia/1/1981
CY028828.1	HA	A/equine/Kentucky/1/1981
CY028820.1	HA	A/equine/Kentucky/2/1981
CY028812.1	HA	A/equine/California/1/1980
CY032389.1	HA	A/equine/Romania/1/1980
CY028804.1	HA	A/equine/Kentucky/4/1980
CY032937.1	HA	A/equine/Kentucky/2/1980
CY096899.1	HA	A/equine/New Market/nasalwash1/1979
CY032381.1	HA	A/equine/Switzerland/1118/1979
CY032405.1	HA	A/equine/Fontainbleu/1/1979
CY096891.1	HA	A/equine/New Market/1/1979
CY028796.1	HA	A/equine/Kentucky/1/1978
CY033481.1	HA	A/equine/Kascakew/1/1978
CY030189.1	HA	A/equine/New York/1/1975
CY032945.1	HA	A/equine/Algiers/1/1972
CY096915.1	HA	A/equine/Tokyo/2/1971
CY034934.1	HA	A/equine/Sachiyama/1/1971
CY032397.1	HA	A/equine/Sao Paulo/1/1969
CY032293.1	HA	A/equine/Sao Paulo/6/1963

CY032421.1	HA	A/equine/Uruguay/1/1963
CY028836.1	HA	A/equine/Miami/1/1963
KX954135	HA	A/equine/Sao Paulo/4.FMVZ/2015
KX954136	HA	A/equine/Sao Paulo/8.FMVZ/2015
KX954137	HA	A/equine/Sao Paulo/10.FMVZ/2015
KX954138	HA	A/equine/Sao Paulo/11.FMVZ/2015
KX954139	HA	A/equine/Sao Paulo/12.FMVZ/2015
KX954140	HA	A/equine/Sao Paulo/15.FMVZ/2015
KX954141	HA	A/equine/Sao Paulo/25.FMVZ/2015
KX954142	HA	A/equine/Sao Paulo/30.FMVZ/2015
KX954143	HA	A/equine/Sao Paulo/32.FMVZ/2015
KX954149	HA	A/equine/Sao_Paulo/8.1.FMVZ/2015
KX954150	HA	A/equine/Sao_Paulo/8.2.FMVZ/2015
KX954151	HA	A/equine/Sao_Paulo/8.3.FMVZ/2015
KX954152	HA	A/equine/Sao_Paulo/8.4.FMVZ/2015
KX954153	HA	A/equine/Sao_Paulo/10.1.FMVZ/2015
KX954154	HA	A/equine/Sao_Paulo/10.2.FMVZ/2015
KX954155	HA	A/equine/Sao_Paulo/10.3.FMVZ/2015
KX954156	HA	A/equine/Sao_Paulo/10.4.FMVZ/2015
KX954157	HA	A/equine/Sao_Paulo/15.1.FMVZ/2015
KX954158	HA	A/equine/Sao_Paulo/15.2.FMVZ/2015
KX954159	HA	A/equine/Sao_Paulo/15.3.FMVZ/2015
KX954160	HA	A/equine/Sao_Paulo/15.4.FMVZ/2015
KX954161	HA	A/equine/Sao_Paulo/18.1.FMVZ/2015
KX954162	HA	A/equine/Sao_Paulo/18.2.FMVZ/2015
KX954163	HA	A/equine/Sao_Paulo/18.3.FMVZ/2015
KX954164	HA	A/equine/Sao_Paulo/18.4.FMVZ/2015
KJ955628	HA	A/equine/São Paulo/1.19/2012
KT460192	HA	A/equine/São Paulo/16.19/2012
KT460193	HA	A/equine/Sao Paulo/24.19/2012
KF049173.1	NA	A/equine/Dubai/1/2012
KF806987.1	NA	A/equine/Xuzhou/01/2013
KC986392.2	NA	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KP202373.1	NA	A/equine/Baizak/09/2012
KP202374.1	NA	A/equine/LKZ/09/2012
AB727558.2	NA	A/equine/Yokohama/aq29/2011
AB727556.2	NA	A/equine/Yokohama/aq5/2011
JX844148.2	NA	A/equine/Kyonggi/SA1/2011
AB618505.1	NA	A/equine/Yokohama/aq13/2010
KF309035.1	NA	A/equine/Heilongjiang/1/2010
AB591843.1	NA	A/equine/Tottori/1/2007
GU571145.1	NA	A/equine/Huabei/1/2007
KF559336.1	NA	A/equine/Richmond/1/2007
CY075852.1	NA	A/equine/Spain/1/2007
CY067512.1	NA	A/equine/Montana/9233/2007
EU926630.1	NA	A/equine/Lonquen/1/2006

CY067304.1	NA	A/equine/Texas/117793/2005
CY067320.1	NA	A/equine/Ohio/113461-1/2005
CY067560.1	NA	A/equine/Virginia/131054-3/2005
FJ375224.1	NA	A/equine/Newmarket/5/2003
DQ222914.1	NA	A/equine/Wisconsin/1/2003
CY030761.1	NA	A/equine/California/8560/2002
CY030183.1	NA	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030151.1	NA	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032407.1	NA	A/equine/Fontainbleu/1/1979
CY032415.1	NA	A/equine/Berlin/1/1989
CY032311.1	NA	A/equine/Santa Fe/1/1985
CY032399.1	NA	A/equine/Sao Paulo/1/1969
CY032295.1	NA	A/equine/Sao Paulo/6/1963
CY032423.1	NA	A/equine/Uruguay/1/1963
CY028838.1	NA	A/equine/Miami/1/1963
KX954144	NA	A/equine/Sao Paulo/8.FMVZ/2015
KX954145	NA	A/equine/Sao_Paulo/10.FMVZ/2015
KX954146	NA	A/equine/Sao_Paulo/12.FMVZ/2015
KX954147	NA	A/equine/Sao_Paulo/15.FMVZ/2015
KX954148	NA	A/equine/Sao_Paulo/25.FMVZ/2015
KF049187.1	NA	A/equine/Kentucky/2/2012
KF049186.1	NA	A/equine/Kentucky/3/2012
KF049185.1	NA	A/equine/Kentucky/4/2012
KF049184.1	NA	A/equine/Kentucky/5/2012
KF049192.1	NA	A/equine/County Durham/2/2012
KF049191.1	NA	A/equine/Lichtenfeld/1/2012
KF049190.1	NA	A/equine/Roxburghshire/1/2012
KF049174.1	NA	A/equine/Worcestershire/1/2012
KP202376.1	NA	A/equine/Kostanay/09/2012
KF049172.1	NA	A/equine/East Renfrewshire/2/2011
KF049183.1	NA	A/equine/Pennsylvania/1-2/2011
KF049194.1	NA	A/equine/Devon/1/2011
KF049177.1	NA	A/equine/Aboyne/2005
KF049176.1	NA	A/equine/Lincolnshire/2006
KM032368	NA	A/equine/São Paulo/1.19/2012
KM002449	M	A/equine/Sao Paulo/8.FMVZ/2015
KM032367	M	A/equine/Sao Paulo/1.19/2012
DQ124188.1	M	A/equine/Ohio/1/2003
DQ222916.1	M	A/equine/Wisconsin/1/2003
KF806986.1	M	A/equine/Xuzhou/01/2013
KC986391.2	M	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KP202381.1	M	A/equine/Baizak/09/2012
KM359826.1	M	A/equine/OR/78356/2012
JX844149.2	M	A/equine/Kyonggi/SA1/2011
KM359825.1	M	A/equine/FL/146609/2011
KF309036.1	M	A/equine/Heilongjiang/1/2010

(continuação)

EU794498.1	M	A/equine/Gansu/7/2008
KF559337.1	M	A/equine/Richmond/1/2007
GU571150.1	M	A/equine/Huabei/1/2007
AB591848.2	M	A/equine/Tottori/1/07
CY067569.1	M	A/equine/New York/146066/2007
CY067513.1	M	A/equine/Montana/9233/2007
CY067305.1	M	A/equine/Texas/117793/2005
FJ375236.1	M	A/equine/Newmarket/5/2003
DQ124162.1	M	A/equine/Massachussetts/213/2003
CY030760.1	M	A/equine/California/8560/2002
JN850794.1	M	A/equine/Newmarket/11/2003
AY855344.1	M	A/equine/Kentucky/5/2002
CY030182.1	M	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030150.1	M	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032414.1	M	A/equine/Berlin/1/1989
CY032310.1	M	A/equine/Santa Fe/1/1985
CY032406.1	M	A/equine/Fontainbleu/1/1979
CY032398.1	M	A/equine/Sao Paulo/1/1969
CY032294.1	M	A/equine/Sao Paulo/6/1963
CY032422.1	M	A/equine/Uruguay/1/1963
CY028837.1	M	A/equine/Miami/1/1963
MG002450	NP	A/equine/Sao Paulo/8.FMVZ/2015
MG002451	NP	A/equine/Sao Paulo/10.FMVZ/2015
MG002452	NP	A/equine/Sao Paulo/11.FMVZ/2015
MG002453	NP	A/equine/Sao Paulo/15.FMVZ/2015
KM032369	NP	A/equine/Sao Paulo/1.19/2012
DQ124184.1	NP	A/equine/Ohio/1/2003
DQ222915.1	NP	A/equine/Wisconsin/1/2003
KC986393.1	NP	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KF806988.1	NP	A/equine/Xuzhou/01/2013
KF712453.1	NP	A/equine/South Kazakhstan/236/2012
KM359844.1	NP	A/equine/OR/78356/2012
JX844147.1	NP	A/equine/Kyonggi/SA1/2011
KM359843.1	NP	A/equine/FL/146609/2011
EU794496.1	NP	A/equine/Gansu/7/2008
EU794520.1	NP	A/equine/Liaoning/9/2008
KF559341.1	NP	A/equine/Lincolnshire/1/2007
KF559335.1	NP	A/equine/Richmond/1/2007
CY067567.1	NP	A/equine/New York/146066/2007
CY067511.1	NP	A/equine/Montana/9233/2007
GU571146.1	NP	A/equine/Huabei/1/2007
EU926629.1	NP	A/equine/Lonquen/1/2006
CY067287.1	NP	A/equine/Texas/117793/2005
FJ375216.1	NP	A/equine/Newmarket/5/2003
AY855342.1	NP	A/equine/Kentucky/5/2002
CY030762.1	NP	A/equine/California/8560/2002

(continuação)

CY030184.1	NP	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030152.1	NP	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032416.1	NP	A/equine/Berlin/1/1989
GU052340.1	NP	A/equine/Kentucky/211/1987
CY032312.1	NP	A/equine/Santa Fe/1/1985
CY032408.1	NP	A/equine/Fontainbleu/1/1979
CY032400.1	NP	A/equine/Sao Paulo/1/1969
CY032424.1	NP	A/equine/Uruguay/1/1963
CY032296.1	NP	A/equine/Sao Paulo/6/1963
CY028839.1	NP	A/equine/Miami/1/1963
KM032366	NS	A/equine/São Paulo/1.19/2012
DQ124186.1	NS	A/equine/Ohio/1/2003
DQ222917.1	NS	A/equine/Wisconsin/1/2003
MG002443	NS	A/equine/Sao Paulo/4.FMVZ/2015
MG002444	NS	A/equine/Sao Paulo/8.FMVZ/2015
MG002445	NS	A/equine/Sao Paulo/11.FMVZ/2015
MG002446	NS	A/equine/Sao Paulo/12.FMVZ/2015
MG002447	NS	A/equine/Sao Paulo/18.FMVZ/2015
MG002448	NS	A/equine/Sao Paulo/30.FMVZ/2015
KC986394.2	NS	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KF806989.1	NS	A/equine/Xuzhou/01/2013
KP202388.1	NS	A/equine/Kostanay/09/2012
KP202385.1	NS	A/equine/Baizak/09/2012
KF309037.1	NS	A/equine/Heilongjiang/1/2010
GU571151.1	NS	A/equine/Huabei/1/2007
JF683501.1	NS	A/equine/Otar/764/2007
FJ195427.2	NS	A/equine/Lincolnshire/1/2007
FJ195429.2	NS	A/equine/Richmond/1/2007
CY067514	NS	A/equine/Montana/9233/2007
AB591849	NS	A/equine/Tottori/1/2007
CY067306	NS	A/equine/Texas/117793/2005
FJ375209	NS	A/equine/Newmarket/5/2003
CY030763	NS	A/equine/California/8560/2002
CY030185	NS	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030153	NS	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032417	NS	A/equine/Berlin/1/1989
CY032313	NS	A/equine/Santa Fe/1/1985
CY032401	NS	A/equine/Sao Paulo/1/1969
CY032297	NS	A/equine/Sao Paulo/6/1963
CY032425	NS	A/equine/Uruguay/1/1963
CY028840	NS	A/equine/Miami/1/1963
KM190933	PA	A/equine/São Paulo/1.19/2012
DQ124187.2	PA	A/equine/Ohio/1/2003
MG002454	PA	A/equine/Sao_Paulo/8.FMVZ/2015
MG002455	PA	A/equine/Sao_Paulo/11.FMVZ/2015
MG002456	PA	A/equine/Sao_Paulo/12.FMVZ/2015

MG002457	PA	A/equine/Sao_Paulo/15.FMVZ/2015
DQ222918.1	PA	A/equine/Wisconsin/1/2003
KC986395.2	PA	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KF806990.1	PA	A/equine/Xuzhou/01/2013
JX844145.2	PA	A/equine/Kyonggi/SA1/2011
KF309033.1	PA	A/equine/Heilongjiang/1/2010
EU794526.1	PA	A/equine/Inner_Mongolia/8/2008
EU794494.1	PA	A/equine/Gansu/7/2008
EU794502.1	PA	A/equine/Hubei/6/2008
EU794510.1	PA	A/equine/Heilongjiang/10/2008
EU794518.1	PA	A/equine/Liaoning/9/2008
KF559334.1	PA	A/equine/Richmond/1/2007
EU794542.1	PA	A/equine/Xinjiang/1/2007
KF559340.1	PA	A/equine/Lincolnshire/1/2007
AB591845.1	PA	A/equine/Tottori/1/2007
CY067509.1	PA	A/equine/Montana/9233/2007
CY067565.1	PA	A/equine/New_York/146066/2007
CY067557.1	PA	A/equine/Virginia/131054-3/2005
CY067317.1	PA	A/equine/Ohio/113461-1/2005
CY067301.1	PA	A/equine/Texas/117793/2005
FJ375228.1	PA	A/equine/Newmarket/5/2003
CY030764.1	PA	A/equine/California/8560/2002
AY855340.1	PA	A/equine/Kentucky/5/2002
CY030170.1	PA	A/equine/Tennessee/5/1986
CY032418.1	PA	A/equine/Berlin/1/1989
CY032346.1	PA	A/equine/Italy/1199/1992
CY030186.1	PA	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030154.1	PA	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032314.1	PA	A/equine/Santa_Fe/1/1985
CY032306.1	PA	A/equine/Cordoba/18/1985
CY032410.1	PA	A/equine/Fontainbleu/1/1979
CY032402.1	PA	A/equine/Sao_Paulo/1/1969
CY032426.1	PA	A/equine/Uruguay/1/1963
CY028841.1	PA	A/equine/Miami/1/1963
CY032298.1	PA	A/equine/Sao_Paulo/6/1963
KM190934	PB1	A/equine/São Paulo/1.19/2012
DQ124172.1	PB1	A/equine/Ohio/1/2003
MG002458	PB1	A/equine/Sao Paulo/8a.FMVZ/2015
MG002459	PB1	A/equine/Sao Paulo/8b.FMVZ/2015
MG002460	PB1	A/equine/Sao Paulo/11.FMVZ/2015
MG002461	PB1	A/equine/Sao Paulo/12.FMVZ/2015
DQ222919.1	PB1	A/equine/Wisconsin/1/03
JX844144.2	PB1	A/equine/Kyonggi/SA1/2011
KC986397.2	PB1	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
CY067564.1	PB1	A/equine/New_York/146066/2007
KF806991.1	PB1	A/equine/Xuzhou/01/2013

(continuação)

KF712455.1	PB1	A/equine/South_Kazakhstan/236/2012
KF309032.1	PB1	A/equine/Heilongjiang/1/2010
EU794493.1	PB1	A/equine/Gansu/7/2008
EU794501.1	PB1	A/equine/Hubei/6/2008
EU794509.1	PB1	A/equine/Heilongjiang/10/2008
KP693698.1	PB1	A/equine/Guangxi/1/2008
KF559333.1	PB1	A/equine/Richmond/1/2007
EU794525.1	PB1	A/equine/Inner_Mongolia/8/2008
EU794517.1	PB1	A/equine/Liaoning/9/2008
EU794541.1	PB1	A/equine/Xinjiang/1/2007
AB591846.1	PB1	A/equine/Tottori/1/07
KJ452449.1	PB1	A/equine/Ahmedabad/1/2009
KJ452447.1	PB1	A/equine/Katra-Jammu/6/2008
CY067556.1	PB1	A/equine/Virginia/131054-3/2005
CY067508.1	PB1	A/equine/Montana/9233/2007
CY067300.1	PB1	A/equine/Texas/117793/2005
FJ375233.1	PB1	A/equine/Newmarket/5/2003
DQ124175.1	PB1	A/equine/Kentucky/5/2002
CY030187.1	PB1	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030155.1	PB1	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032347.1	PB1	A/equine/Italy/1199/1992
CY032419.1	PB1	A/equine/Berlin/1/1989
CY032323.1	PB1	A/equine/Sussex/1/1989
CY032315.1	PB1	A/equine/Santa_Fe/1/1985
CY032307.1	PB1	A/equine/Cordoba/18/1985
CY032411.1	PB1	A/equine/Fontainbleu/1/1979
CY032403.1	PB1	A/equine/Sao_Paulo/1/1969
CY032427.1	PB1	A/equine/Uruguay/1/1963
CY032299.1	PB1	A/equine/Sao_Paulo/6/1963
CY028842.1	PB1	A/equine/Miami/1/1963
KM190935	PB2	A/equine/São Paulo/1.19/2012
DQ124177.1	PB2	A/equine/Ohio/1/2003
MG002462	PB2	A/equine/Sao Paulo/8.FMVZ/2015
MG002463	PB2	A/equine/Sao Paulo/10.FMVZ/2015
MG002464	PB2	A/equine/Sao Paulo/12.FMVZ/2015
DQ222920.1	PB2	A/equine/Wisconsin/1/2003
KC986396.2	PB2	A/equine/Heilongjiang/SS1/2013
KF806992.1	PB2	A/equine/Xuzhou/01/2013
KF309031.1	PB2	A/equine/Heilongjiang/1/2010
CY067563.1	PB2	A/equine/New_York/146066/2007
CY067507.1	PB2	A/equine/Montana/9233/2007
CY067315.1	PB2	A/equine/Ohio/113461-1/2005
KF559338.1	PB2	A/equine/Lincolnshire/1/2007
KF559332.1	PB2	A/equine/Richmond/1/2007
GU571147.1	PB2	A/equine/Huabei/1/2007
CY067555.1	PB2	A/equine/Virginia/131054-3/2005



(conclusão)

CY067299.1	PB2	A/equine/Texas/117793/2005
FJ375221.1	PB2	A/equine/Newmarket/5/2003
CY030766.1	PB2	A/equine/California/8560/2002
CY030188.1	PB2	A/equine/Kentucky/8/1994
CY030156.1	PB2	A/equine/Kentucky/1/1992
CY032348.1	PB2	A/equine/Italy/1199/1992
CY032420.1	PB2	A/equine/Berlin/1/1989
CY032316.1	PB2	A/equine/Santa_Fe/1/1985
CY032308.1	PB2	A/equine/Cordoba/18/1985
CY032404.1	PB2	A/equine/Sao_Paulo/1/1969
CY032300.1	PB2	A/equine/Sao_Paulo/6/1963
CY032428.1	PB2	A/equine/Uruguay/1/1963
CY028843.1	PB2	A/equine/Miami/1/1963

## ANEXO C – Solução Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X

- 0,1M de Tris
- 0,09M de ácido bórico
- 0,001M de EDTA
- H<sub>2</sub>O q.s.p. 1000mL