

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
TESE DE DOUTORADO**

VIVIANE MARIA DIAS COSTA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE EQUÍDEOS NATURALMENTE
INFECTADOS PELO *EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VÍRUS***

Belo Horizonte,

2023

VIVIANE MARIA DIAS COSTA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE EQUÍDEOS NATURALMENTE
INFECTADOS PELO *EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutor (a) em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Marques Teixeira

Belo Horizonte,

2023

043

Costa, Viviane Maria Dias.

Avaliação clínico-laboratorial de equídeos naturalmente infectados pelo Equine Infectious anemia vírus [manuscrito] / Viviane Maria Dias Costa. – 2023. 133 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon. Coorientador: Prof. Dr. Bruno Marques Teixeira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Anemia Infecciosa Equina. 3. Retroviridae. 4. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. I. Kroon, Erna Geessien. II. Teixeira, Bruno Marques. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE VIVIANE MARIA DIAS COSTA

Nº REGISTRO: 2018752698

Às 14:00 horas do dia **12 de abril de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Betânia Paiva Drumond (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), Paulo Eduardo Brandão (Universidade de São Paulo - USP), Daniel Moura de Aguiar (Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT), Profa. Dra. Erna Geessien Kroon (Orientadora) e Prof. Dr. Bruno Marques Teixeira (Coorientador), para julgar o trabalho final "**Avaliação clínico-laboratorial de equídeos naturalmente infectados pelo equine infectious anemia virus**" da aluna **Viviane Maria Dias Costa**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Erna Geessien Kroon, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 12 de abril de 2023

Membros da Banca:

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond

Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

Dr. Daniel Moura de Aguiar

De acordo:

Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

(Orientadora)
 Prof. Dr. Bruno Marques Teixeira
 (Coorientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
 (Coordenadora do Programa de Pós-graduação
 em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 13/04/2023, às 08:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 13/04/2023, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Moura de Aguiar, Usuário Externo**, em 14/04/2023, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 18/04/2023, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Eduardo Brandão, Usuário Externo**, em 02/05/2023, às 08:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2023, às 08:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2144456** e o código CRC **68580D38**.

AGRADECIMENTOS

Eis que mais um ciclo se fecha em minha vida, mas nada teria sido possível sozinha. Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Início agradecendo a Deus, por me abençoar em todos os momentos e me fortalecer na jornada da vida.

À minha família, mãe, pai, irmão e André pelo apoio incondicional, amor e paciência durante a realização de todo o processo.

Tentarei por toda a minha vida e talvez um dia eu seja capaz de retribuir um pouco de tudo que vocês são para mim, mas nada que eu diga ou faça é capaz de expressar meu amor e gratidão a vocês.

Ao meu pai, Expedito Costa, meu grande exemplo de luta e perseverança, mesmo nas horas mais difíceis está sempre comigo. Gratidão pai, esta conquista também é sua.

Aos meus orientadores, Professor Bruno Marques Teixeira e Professora Erna Geessien Kroon, minha gratidão e reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de pessoas que transpiram sabedoria.

A Professora Gissandra Braz, pelo acolhimento, contribuições e convívio, os quais me posicionaram a refletir e amadurecer enquanto pesquisadora.

Agradeço aos profissionais do Hospital Veterinário de Pequenos Animais do Centro Universitário INTA - UNINTA, em especial, ao Dr. Roberto Sabóia e Sr. Naldo pelos ensinamentos, paciência, atenção, carinho e amizade durante esta jornada.

Ao professor Cahuê Paz e seus estagiários sou eternamente grata pelas experiências que trocamos no momento das coletas. Vocês foram peças fundamentais neste processo.

A Andreia Cursino, Grazielle Pereira Oliveira e Jamile Dias, por todo carinho, disponibilidade e auxílio, além da colaboração, paciência, parceria, recepção e apoio. Gratidão por conhecer pessoas com mente brilhante e espírito nobre.

Agradeço a todos os colegas e amigos do laboratório de vírus durante o tempo em que estive no Laboratório, obrigada pela convivência e por tudo que eu aprendi durante esse tempo, seria difícil citar cada um nominalmente. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Agradeço pela paciência e pelas

valiosas discussões, por ter contribuído grandemente para esse trabalho, analisando os resultados e dando sugestões.

Não posso esquecer todo apoio que o Centro Universitário UNINTA me deu através dos recursos disponíveis e de toda estrutura que facilita a grande harmonia entre todos os intervenientes que permitiram a conclusão do projeto de pesquisa.

A todos os profissionais da Fazenda Paula Rodrigues, também do DETRAN, em especial ao Dr. Valdemir Rodrigues e Raimundo Torquato e a todos os proprietários de equídeos de Jericoacoara pela disponibilidade dos animais e do espaço para que esta pesquisa caminhasse.

Ao Aguiar Filho, ao Inácio Costa e ao Tharlllyam Martins que para além da amizade foi possível desempenhar auxílio indispensável no momento da coleta.

Aos demais professores do Curso de Medicina Veterinária e do Mestrado do UNINTA pelos ensinamentos, por abrir meus caminhos me possibilitando novas descobertas.

Agradeço aos professores do Laboratório de vírus Dra. Betânia Paiva Drumond, Dra. Giliane de Souza Trindade, Dr. Jônatas Santos Abrahão e Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, por todo o conhecimento e dedicação ao Laboratório de vírus.

As Dra. Iracelma Arruda, Dra. Daniele Fiuza e Dra. Clarissa Neuman que fazem parte da ADAGRI, sou grata pelas ricas contribuições.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

RESUMO

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença infecciosa grave de grande importância para a criação de equídeos, é causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), pertencente à família *Retroviridae* e gênero *Lentivirus*. Os animais infectados podem se tornar portadores assintomáticos por toda a vida e potenciais transmissores do EIAV. A doença está na lista da *World Organization for Animal Health* entre as 11 doenças de notificação obrigatória dos equinos, por se tratar de uma doença de alta morbidade, sem tratamento, sem vacina e que causa entraves sanitários e econômicos para a equideocultura. Assim, em quase todos os países existem leis regulamentais que obrigam a eutanásia do animal infectado, como forma de controle da AIE. A patogênese da doença é altamente variável, podendo ser uma infecção inaparente até a mortal. Entretanto, a maioria dos animais infectados pelo vírus são portadores assintomáticos e o diagnóstico clínico é impossível. Desta forma o diagnóstico laboratorial assume um papel decisivo para controle e prevenção da doença. O objetivo desse estudo foi avaliar e acompanhar, o curso clínico e a infecção pelo EIAV em equídeos naturalmente infectados, além de detectar e caracterizar molecularmente do EIAV circulante no Nordeste do Brasil. Destacamos que o Nordeste brasileiro concentra o maior número de asininos do país, assim foram feitos inquéritos epidemiológicos e avaliações clínicas também nessa espécie. O estudo foi realizado em duas populações distintas, sendo numa fazenda de abrigo de animais abandonados e apreendidos nas estradas de todo o estado do Ceará, onde foram avaliados 127 animais (124 asininos e 3 equinos); e na Vila de Jericoacoara, localizada no Parque Nacional de Jericoacoara (PARNA Jericoacoara), onde foram avaliados 112 animais (104 equinos e 8 muares) utilizados no turismo equestre ecológico. Dos 124 jumentos, apenas 0,81% (1/124) foi positivo no IDGA, 22% (27/124) no ELISA gp90 e 10,6% (13/124) no ELISA p26. Os três cavalos da Fazenda foram positivos em IDGA e ELISA p26, mas apenas dois (2/3) foram positivos em ELISA gp90. Desses animais foram obtidas seis sequências de nucleotídeos do EIAV. Também foi feito o acompanhamento da evolução clínica e laboratorial de um jumento naturalmente infectado por EIAV, comprovando que a espécie apresenta sintomatologia semelhante à descrita em cavalos. Dos 112 equídeos, do PARNA de Jericoacoara, 11,6% (13 /112) foram positivos em IDGA, 36,6% (41/112) no ELISA gp90 e 25,9% (29/112) no ELISA p26. Com as avaliações hematológicas dessa população as análises estatísticas confirmaram existir associação entre alteração nos níveis de GGT ($p = 0,0027$) e a infecção por EIAV. Os resultados moleculares indicaram a origem das amostras cearenses de EIAV, pois as sequências estão agrupadas próximas às sequências do Japão, apoiadas por um valor de *bootstrap* significativo. Todos os resultados foram enviados às instituições responsáveis pela saúde animal no Ceará (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA e Agência de Defesa Agropecuária do Ceará – ADAGRI), para implantação dos planos de contingência para as principais doenças equinas. Os dados gerados nesse estudo auxiliarão no direcionamento das políticas públicas de controle da AIE no estado.

Palavras-chave: Anemia infecciosa equina; *Retroviridae*; Asininos; Equinos; Semiárido brasileiro; teste sorológico imunoenzimático – ELISA; Caracterização molecular.

ABSTRACT

EIA is a severe infectious disease of great importance for equine breeding. It is caused by the *Equine infectious anemia virus* (EIAV), which belongs to the *Retroviridae* family and *Lentivirus* genus. Infected animals can become lifelong asymptomatic carriers and potential transmitters of EIAV. The disease is on the list of the World Organization for Animal Health among the 11 notifiable diseases of horses, as it is a disease with high morbidity, no treatment, and no vaccine which causes health and economic obstacles to equine breeding, as well as in almost in all countries some regulations require the euthanasia of the infected animal as a form of EIA control. The pathogenesis of the disease is highly variable, ranging from an unapparent infection to a deadly one. However, most animals infected by the virus are asymptomatic carriers, and clinical diagnosis is impossible, so laboratory diagnosis plays a decisive role in controlling and preventing the disease. The objective of this study was to evaluate and monitor the clinical course of EIAV infection in naturally infected horses, in addition to performing the detection and molecular characterization of EIAV circulating in Northeastern Brazil. We emphasize that the Brazilian Northeast concentrates the most significant number of donkeys in the country, so we also sought to conduct epidemiological surveys and clinical evaluations in this species. The study was carried out in two different populations, one in a farm that shelters abandoned and seized animals on roads throughout the state of Ceará, where 127 animals were evaluated (124 donkeys and 3 horses), and in Vila de Jericoacoara, located in the Jericoacoara National Park (PARNA Jericoacoara), where 112 animals (104 horses and 8 mules) used in ecological equestrian tourism were evaluated. Of the 124 donkeys, only 0,81% (1/124) were positive in the AGID, 22% (27/124) in the gp90 ELISA and 10,6% (13/124) in the p26 ELISA. Of the three horses on the farm, all were positive in AGID and p26 ELISA, but only two (2/3) were positive in gp90 ELISA. From these animals, six EIAV nucleotide sequences were obtained. Furthermore, it was possible to carry out evaluations to monitor and describe the clinical and laboratory evolution of a donkey naturally infected with EIAV, proving that the species present symptoms similar to those described in horses. Of the 112 horses, 1,6% (13/112) were positive on AGID, 25,9% (29/112) on the p26 ELISA and 36,6% (41/112) on the gp90 ELISA. With the hematological evaluations of this population, statistical analyses confirmed an association between changes in GGT levels and the presence of EIAV infection. from Japan backed by a significant bootstrap value. All results were sent to the institutions responsible for animal health in Ceará (MAPA and ADAGRI), where contingency plans were implemented for the main equine diseases, so that the data generated in this study can help guide EIA control policies.

Key words: Equine infectious anemia; *Retroviridae*; Donkey; Equine; Brazilian semiarid; Enzyme linked immune sorbent assay – ELISA; molecular characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura do EIAV.	21
Figura 2. Representação do genoma do EIAV.	22
Figura 3. Esquema representando o ciclo de multiplicação dos lentivírus.	25
Figura 4. Cinética da infecção por EIAV em animais experimentalmente infectados	28
Figura 5. Fotografia dos animais da Fazenda Paula Rodrigues.	37
Figura 6. Fotografia dos cavalos utilizados no turismo equestre na Vila de Jericoacoara.	39
Figura 7. Fluxograma da avaliação clínica e coleta.	40
Figura 8. Fluxograma do processamento inicial das amostras sanguíneas coletadas em tubos com EDTA.	41
Figura 9. Fluxograma do processamento inicial das amostras sanguíneas coletadas em tubos sem EDTA.	42
Figura 10. Avaliação clínica dos animais.	43
Figura 11. Lamina de gel de agarose para IDGA.	47
Figura 12. Testes diagnósticos para AIE dos asininos.	54
Figura 13. Análise filogenética das sequências de EIAV circulante na FPR com 34 sequências parciais da região tat-gag.	55
Figura 14. Asinino com todos os testes de diagnóstico positivos.	60
Figura 15. Fotografia de lâmina de IDGA.	60
Figura 16. Asinino sintomático da FPR acompanhado por quatro semanas antes da morte aos 26 dias.	61
Figura 17. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de BRA-CE-J269, posição 1-80 do alinhamento.	64
Figura 18. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de BRA-CE-J269,, posição 81-160 do alinhamento.	64
Figura 19. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de BRA-CE-J269,, posição 161-240 do alinhamento.	65
Figura 20. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de BRA-CE-J269,, posição 241-272 do alinhamento.	65
Figura 21. Similaridade de nucleotídeos entre a sequência de BRA-CE-J269 (ASININO) e 23 sequencias de EIAV depositadas no Genbank*.	67

Figura 22. Análise filogenética da sequência de nucleotídeos de BRA-CE-J269 (ASININO) e 23 sequencias de EIAV depositadas no Genbank.	68
Figura 23. Análise filogenética das sequências de EIAV detectados nos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara, com 41 sequências parciais da região tat-gag ...	80
Figura 24. Similaridade de nucleotídeos entre das sequências de EIAV detectados nos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara e 24 sequencias de EIAV depositadas no Genbank da região tat-gag.	82
Figura 25. Associação entre os valores de GGT e FA séricos e os valores das absorbância dos ELISAS.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores para amplificação do DNA proviral do EIAV.....	50
Tabela 2. Avaliações clínicas dos asininos: escore corporal (EC) e coloração da mucosa ocular.....	57
Tabela 3. Avaliações hematológicas e de diagnóstico de EIA dos 20 asininos selecionados da FPR.....	59
Tabela 4. Avaliações clínicas do asinino da FPR acompanhado por quatro semanas antes da morte aos 26 dias.....	62
Tabela 5. Testes imunológicos para AIE dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	69
Tabela 6. Parâmetros de avaliação clínica dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	70
Tabela 7. Eritrograma dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	72
Tabela 8. Leucograma dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	73
Tabela 9. Contagem total de plaquetas dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	73
Tabela 10. Enzimas hepáticas e marcadores renais dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	76
Tabela 11. Dosagens das proteínas totais, albumina, globulinas e fibrinogênio dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara.....	78
Tabela 12. Testes de IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 em amostras de equídeos acompanhados em coletas sucessivas.....	84
Tabela 13. Hemogramas dos animais acompanhados em coletas sucessivas e que tiveram variações significativas na absorbância dos ELISAS gp90 e p26.....	86
Tabela 14. Testes bioquímicos dos animais acompanhados em sucessivas coletas e que tiveram variações significativas na absorbância dos ELISAS gp90 e p26.....	89
Tabela 15. Resultados dos hemogramas: Resultados dos hemogramas dos animais acompanhados e que tiveram variações surpreendentes na absorbância dos ELISAS gp90 e p26 (TODOS OS ANIMAIS).....	117
Tabela 16. Resultados dos bioquímicos: Resultados dos bioquímicos dos animais acompanhados e que tiveram variações surpreendentes na absorbância dos ELISAS gp90 e p26 (TODOS OS ANIMAIS).....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

AIE	Anemia Infecciosa Equina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
Bpm	Batimentos por minutos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Creatina Quinase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC / ECC	Escore Corporal
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EIAV	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
ELISA	Ensaio de imunabsorbância ligado à enzima
ELR	Receptor de Lentivírus Equino
Env	Envelope
FA	Fosfatase Alcalina
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
G	Força Gravitacional
GGT	Gama-glutamil transferase
GL	Contagem Global de leucócitos
GTA	Guia de Trânsito Animal
Hb	Hemoglobina
He	Hemácias
Ht	Hematócrito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

IN	Integrase
IN	Instrução Normativa
ID	Identificação
IC	Intervalo de confiança
JERI	Jericoacoara
Kb	Kilobase
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NC	Não Consta
°C	Graus Celsius
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PARNA	Parque Nacional
PB	Pares de bases
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE	Prostaglandina
PNSE	Programa Nacional de Sanidade dos Equinos
Pol	Polimerase
PPT	Proteína Plasmática Total
PP	Proteína Sérica total
PR	Protease
Pt	Plaquetas
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minutos
RT	Transcriptase Reversa
Seg	Segundos
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA

TEMP	Temperatura Retal
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPC	Tempo de Preenchimento Capilar
UNINTA	Centro Universitário INTA
VR	Valor de Referência
VG	Volume Globular
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	EQUÍDEOS – POPULAÇÃO E IMPORTÂNCIA	17
1.2	ANEMIA INFECCIOSA EQUINA – AIE	18
1.2.1	EPIDEMIOLOGIA	19
1.2.2	O AGENTE ETIOLÓGICO - <i>EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS</i> (EIAV)	21
1.2.3	PATOGENIA	24
1.2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	26
1.2.5	TRANSMISSÃO	28
1.2.6	DIAGNÓSTICO	29
1.2.6.1	Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)	30
1.2.6.2	Ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA)	30
1.2.7	CONTROLE E PROFILAXIA	32
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVOS GERAIS	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	LOCAIS DO ESTUDO	37
4.2	ESTRATÉGIA DE TRABALHO	39
4.3	AMOSTRAS	40
4.4	PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS	40
4.5	AVALIAÇÕES CLÍNICAS	42
4.6	TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E FRACIONAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	44
4.7	HEMOGRAMA COMPLETO	44
4.8	A CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (PPT) E FIBRINO GÊNIO	45
4.9	PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DOS EQUÍDEOS DO EQUÍDEOS DO PARQUE NACIONAL DE JERICOACOARA	46
4.10	DIAGNÓSTICOS IMUNOLÓGICOS PARA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	46
4.10.1	Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)	46
4.10.2	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	47

4.11 SOROLOGIA PAREADA	48
4.12 AVALIAÇÕES MOLECULARES	48
4.12.1 Extração de ácido nucleico	48
4.12.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR	49
4.12.3 Eletroforese em géis de poliacrilamida – PAGE	50
4.12.4 Purificação do produto de PCR.....	51
4.12.5 Sequenciamento	51
4.12.6 Análise do sequenciamento	51
4.12.7 Análise filogenética	51
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
5.1 ANIMAIS DA FAZENDA PAULA RODRIGUES (FPR)	53
5.1.1 Ensaio imunológico para diagnóstico de AIE	53
5.1.2 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética	53
5.1.3 Avaliações clínicas	56
5.1.4 Avaliação hematológica.....	57
5.1.5 Acompanhamento clínico e laboratorial de um asinino naturalmente infectado pelo EIAV	58
5.2 ANIMAIS DO PARQUE NACIONAL DE JERICOACOARA	69
5.2.1 Análises imunológicas para AIE	69
5.2.2 Avaliações clínicas	69
5.2.3 Avaliação hematológica.....	70
5.2.4 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética	79
5.2.5 Acompanhamento clínico e sorológico de equídeos infectados pelo EIAV	
83	
5.2.5.1 Sorologia pareada	83
5.2.5.2 Avaliação hematológica.....	85
5.2.5.3 Avaliação bioquímica sérica	86
6 DISCUSSÃO	90
6.1 ANIMAIS DA FAZENDA PAULA RODRIGUES (FPR)	90
6.1.1 Ensaio imunológico para diagnóstico de AIE	90
6.1.2 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética	92
6.1.3 Avaliações clínicas e hematológica	93
6.1.4 Acompanhamento clínico e laboratorial de um asinino naturalmente infectado pelo EIAV	94
6.2 ANIMAIS DO PARQUE NACIONAL DE JERICOACOARA	97

6.2.1	Análises imunológicas para AIE	97
6.2.2	Avaliações clínicas e hematológicas	98
6.2.3	Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética	99
6.2.4	Acompanhamento clínicos e sorológico de equídeos infectados pelo EIAV 100	
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 EQUÍDEOS – POPULAÇÃO E IMPORTÂNCIA

Os equídeos são mamíferos de grande porte pertencentes a família *Equidae* e gênero *Equus*. Esses animais foram muito utilizados para desempenhar as funções de montaria, carga e tração. Hoje porém a criação de equídeos vem ganhando destaque, principalmente pelo avanço dos esportes equestres, e também no aspecto social, sendo utilizado além das atividades de esportes e lazer (LIMA; CINTRA, 2016). No Nordeste do Brasil os equídeos são criados para trabalho, lazer e, principalmente, para esporte, onde as vaquejadas e cavalgadas são as suas principais utilizações (SILVA *et al.*, 2013). A indústria equina na agropecuária gera 3 milhões de empregos diretos e indiretos e atingindo mais de 30 segmentos diferentes entre negócios comerciais, pecuária e destino final. Cada ocupação direta gera outras quatro ocupações indiretas. Estes indicadores econômicos demonstram a relevância da criação de cavalos, jumentos e muares, como um ótimo negócio para a economia de mercado (LIMA; CINTRA, 2016).

A população total de equídeos no Brasil é de aproximadamente 5.228.434 animais, distribuídos como 4.236.062 (81%) equinos (*Equus caballus*), 376.874 (7,2%) asininos (*Equus asinus*) e 615.498 (11,8%) muares (*E. caballus* x *E. asinus*). A maior população brasileira de equinos encontra-se na região Sudeste, seguida das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte (BRASIL, 2017). O Nordeste concentra o maior número de asininos (87%) e muares (42%) do país. Nesta população temos os denominados animais errantes, classificados em: sem controle (abandonados ou sem dono) e semicontrolados (animais que vivem soltos, apesar de terem proprietário).

Dentre os equídeos, na região nordeste brasileira os jumentos e as mulas foram muito importantes para os serviços agrícolas, pois são dotados de grande resistência física quando comparados aos cavalos. Em um cenário recente, porém esse papel está sendo substituído por formas de transporte e suprimentos agrícolas mecanizados, isso culminou na diminuição do uso de jumentos. Esses, passaram a ser abandonados por seus donos, assim o número de jumentos abandonados cresce dia após dia, passando a viver livremente em estradas e rodovias como animais quase selvagens e ocasionando muitos acidentes (CARNEIRO; LUCENA; BARROS, 2018).

Esta crescente população de animais errantes sem informações sanitárias, constitui uma ameaça em potencial, em termos de possibilidade de atuarem como

reservatório para manutenção de doenças, incluindo a anemia infecciosa equina (AIE). Conseqüentemente, é importante investigar a ocorrência dessa enfermidade também nessa população de animais errantes.

1.2 ANEMIA INFECCIOSA EQUINA – AIE

A anemia infecciosa equina é uma doença infecciosa grave de grande importância para a criação de equídeos que acomete somente os membros da família *Equidae*, equinos (cavalos e pôneis), asininos (jumentos) e muares (mulas e burros). A doença é causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), animais infectados podem se tornar portadores assintomáticos por toda a vida e potenciais transmissores do EIAV (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

A AIE foi descrita pela primeira vez em 1843 na França sendo uma das primeiras doenças em animal descrita de etiologia viral em 1904. No Brasil, o primeiro registro da AIE foi em 1968 nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. A AIE tem ocorrência mundial descrita, principalmente em regiões de climas quente e úmido, ambientes mais propícios à proliferação dos vetores, os tabanídeos hematófagos. Estes são descritos como responsáveis por uma grande porcentagem de transmissão da doença no momento do repasto sanguíneo, ao se alimentar de um animal infectado e logo após de um animal susceptível o vetor, mecânico, é capaz de transmitir a doença. Destacam-se os artrópodes da ordem Diptera, *Stomoxys calcitrans* e os gêneros *Tabanus*, *Chrysops* e *Hybromitra* (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

A doença é de notificação obrigatória e é uma das doenças virais mais importantes que afetam os equídeos, causando perdas substanciais para proprietários de cavalos (ALMEIDA *et al.*, 2006; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004). A doença está na lista da *World Organization for Animal Health (WOAH, founded as OIE)*, entre as 11 doenças de notificação obrigatória de equinos, por se tratar de uma doença de alta morbidade, sem tratamento, nem vacina e causar entraves sob o ponto de vista sanitário e principalmente econômico para a equideocultura (WOAH, 2022).

No Brasil, a AIE tem sua ocorrência registrada em todo o país, sendo considerada doença endêmica na população de equinos. A doença é controlada pelo Programa Nacional de Sanidade dos Equinos (PNSE), sendo uma das enfermidades mais importantes, sob o ponto de vista sanitário e econômico para a equideocultura. Este fato se deve aos possíveis prejuízos aos proprietários que necessitam do

trabalho desses animais, além de ser importante barreira sanitária impedindo o acesso ao mercado internacional. Como medida de controle está previsto o isolamento e a eliminação dos animais com sorologia positiva. Fazem parte das ações também a educação sanitária, os estudos epidemiológicos, o controle de trânsito de animais, o cadastramento, a fiscalização, a certificação sanitária e a intervenção imediata da área do foco (ALMEIDA *et al.*, 2006; BRASIL, 2008).

Apesar de AIE acometer todos os membros da família *Equidae* a maioria dos estudos realizados se concentram em cavalos e pôneis. Há poucas informações sobre a resposta imune, patogenicidade e alterações clínicas dos outros equídeos, como asininos e muares, para a infecção com EIAV. Em asininos está descrita uma maior resistência ao aparecimento desses sinais clínicos, o que pode indicar uma maior resistência à multiplicação viral. Porém apesar desta descrição de resistência o animal infectado é um possível transmissor do EIAV (COOK *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2016).

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

Segundo o MAPA (2023) no período 1999 a 2021 foram registrados 141.860 casos de AIE no Brasil com ampla distribuição em todo o território nacional. Somente em 2021 foram notificados 2.290 casos de AIE. Destes casos notificados em 2021, 38% (870/2.290) foram registrados em nove estados do nordeste, e destes 404 no Ceará, sendo o Estado com maior número de casos na região. Apesar desses registros, o índice de prevalência da AIE nos estados brasileiros não apresentam exatidão, pois a solicitação de exames diagnósticos para AIE pelos proprietários de equídeos não é uma prática comum. Isto favorece a que nem todos os animais sejam testados e pode resultar em um perfil epidemiológico diferente do previsto. O perfil epidemiológico da AIE no Brasil está dividido em dois grupos, incluindo no primeiro grupo o de criadores de animais de entidades hípcas, que é facilmente controlável pela realização de exames e consequente eutanásia dos animais positivos. No segundo grupo são incluídos os criadores do campo, que em virtude de características ambientais, socioeconômicas e políticas, é extremamente difícil de ser controlada (FRANCO; PAES, 2011; PARREIRA, 2009).

A prevalência da AIE varia nos diferentes estados, o que pode ser atribuído à grande extensão territorial e as características geoclimáticas diferentes em cada unidade federativa. Alguns estudos que avaliaram a prevalência de AIE em

estabelecimentos de criação de equinos no Brasil relataram uma grande variação nos resultados obtidos, com prevalência de animais positivos variando de 0% a 52%. Destaca-se como exemplo Minas Gerais, onde a prevalência variou de 0,07% a 5% dentro do próprio estado (ALMEIDA *et al.*, 2006).

No Pantanal com regiões alagadiças, que propicia à proliferação dos insetos vetores, têm-se prevalência relatada de 36% (MELO *et al.*, 2012). Em 2013, em um estudo também realizado no Pantanal brasileiro, no município de Poconé, do estado do Mato Grosso mostrou uma prevalência de 31,5% da AIE. Também foi demonstrado que 52% das fazendas amostradas tiveram pelo menos um animal positivo (BORGES *et al.*, 2013). No Rio Grande do Sul, amostras de soro de 1.010 animais de 341 fazendas foram analisadas por IDGA para detecção de anticorpos virais, e nenhum animal positivo foi encontrado (MACHADO *et al.*, 2021). Já em Goiás em um estudo com 1.170 amostras de cavalos, 14 foram positivos, onde de 332 fazendas amostradas, 12 tinham um ou mais animais positivos para AIE, assim, estabelecendo uma prevalência de 2,01 % no Estado, uma prevalência baixa, mas generalizada (PÁDUA *et al.*, 2022).

No nordeste do Brasil, os estudos de prevalência da AIE são mais escassos. Na Bahia a prevalência de AIE relatada foi de 5,9% em 2011 (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Em um levantamento de resultados positivos obtidos por laboratórios credenciados e oficiais relatados no estado do Ceará em Silva *et al.* (2013) apontam a prevalência de 3,1%. Esse é o único estudo de prevalência no Ceará. A prevalência da Paraíba foi de 2,86 % e do Rio Grande do Norte foi de 1,29%. Um fator que pode levar a variação regional na ocorrência da AIE são as diferentes composições dos números populacionais dos equídeos em cada estado. No Ceará a população de asininos é maior do que nos demais estados (BRASIL, 2017; FRANCO; PAES, 2011).

A incidência da AIE em jumentos é pouco estudada. Historicamente, os jumentos tiveram uma importância social, econômica e cultural no nordeste brasileiro, tendo um papel fundamental no desenvolvimento dessa região. Recentemente OLIVEIRA *et al.*, (2017) realizou um inquérito sorológico da AIE em jumentos semisselvagens, no Rio Grande do Norte. Em 367 amostras de jumentos testados somente 1,6% (6/367) das amostras foram positivas no IDGA, 3,3% (12/367) no cELISA e de 14,4% (53/367) no rpg90 ELISA. A preocupação é a de que esses animais podem servir como potencial fonte de transmissão e manutenção do EIAV.

1.2.2 O AGENTE ETIOLÓGICO - EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (EIAV)

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses*, o EIAV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (ICTV, 2022; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

A família *Retroviridae* tem como principal característica a presença da enzima transcriptase reversa (RT), responsável por transcrever em DNA o RNA viral. O DNA viral transcrito é capaz de se integrar ao DNA cromossômico da célula infectada. A integração permite o escape ao sistema imunológico. Além disso o vírus apresenta a potencial capacidade de formar subpopulações virais heterogêneas (*quase-espécies*) através mutações no genoma (BLACKLAWS *et al.*, 2004; MONTELARO *et al.*, 1984; PASICK, 1998).

O EIAV apresenta estrutura única de tripla camada: a mais interna é o complexo de nucleoproteínas genômicas, com simetria circular ou oval; a segunda camada é o capsídeo icosaédrico que é recoberto por envelope derivado da membrana da célula hospedeira, no qual se projetam peplômeros glicoproteicos. O envelope viral é constituído por lipídeos e glicoproteínas codificadas pelo gene *env*, as quais são denominadas de glicoproteínas de superfície e de transmembrana, que atuam como receptores virais durante a interação do vírus com a célula hospedeira (Figura 1) (ISSEL *et al.*, 2014; RAVAZOLLO; COSTA, 2007).

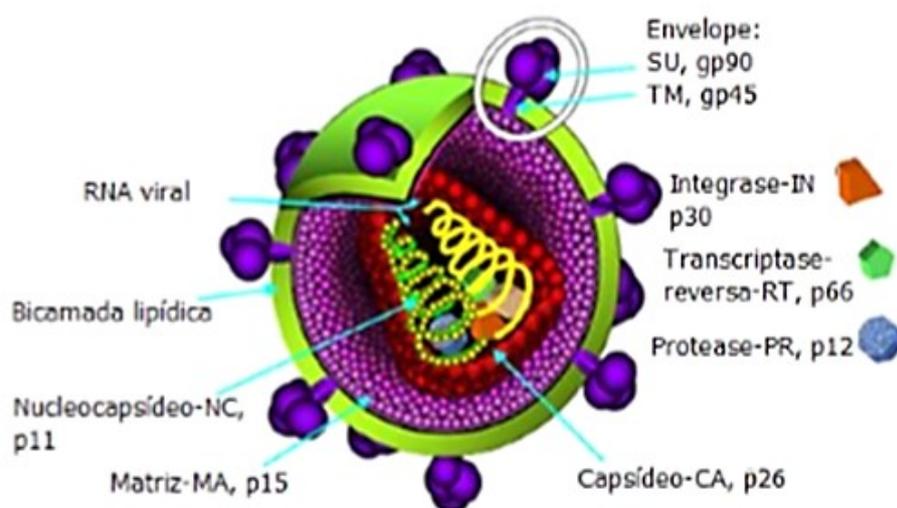


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do EIAV. Representação da localização das estruturas do vírus (ISSEL *et al.*, 2014, modificado).

O EIAV é um vírus com RNA fita simples, diploide, com genoma de aproximadamente 8,2 kilobases (kb), sendo assim, o menor genoma dentre os lentivírus, composto por três genes (figura 2) principais responsáveis que codificam proteínas estruturais e não estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e três quadros de leitura abertos que codificam proteínas reguladoras (*tat*, *rev* e *S2*), além de duas regiões terminais não codificantes (“*long terminal repeats*” ou LTR) (CLEMENTS; ZINK, 1996; RAVAZOLLO; COSTA, 2007).

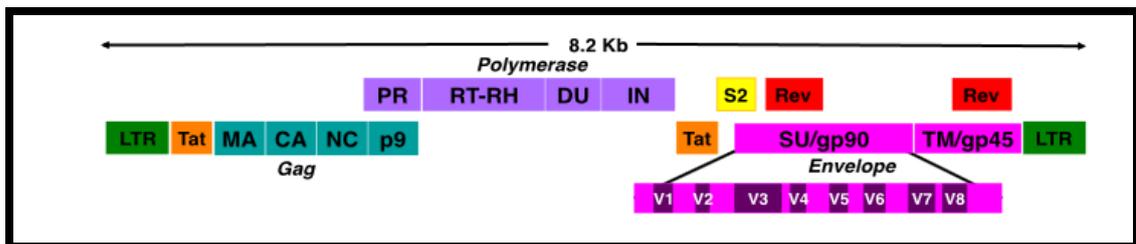


Figura 2. Representação do genoma do EIAV. A localização dos três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), as três sequências de leitura aberta (*tat*, *rev* e *S2*) e LTR identificados (CRAIGO; MONTELARO, 2013, modificado).

As proteínas codificadas pelo gene *gag* são essenciais no ciclo de multiplicação. As quatro proteínas estruturais que compõem o vírus são: a proteína MA (p15), a proteína CA (p26) e duas NC (p11 e p9). Estas proteínas formam o cerne viral (COUTINHO *et al.*, 2013). A p15 e p26 são essenciais para a formação de partículas virais, enquanto p9 é crítico para a liberação de partículas virais descendentes da célula hospedeira (CHEN; LI; MONTELARO, 2001; ISSEL *et al.*, 2014; JIN; CHEN; MONTELARO, 2005).

O gene *pol* codifica para proteínas com função enzimática, com papéis importantes na integração no genoma hospedeiro, a protease (PR), a integrase (IN) e RT. A PR é essencial para o processamento das poliproteínas gag e gag-pol, por outro lado, a RT faz a conversão do RNA viral em DNA proviral e a IN facilita a integração do DNA proviral ao DNA cromossômico da célula hospedeira (DONG *et al.*, 2014).

O envelope viral é constituído pelos produtos do gene *env* duas glicoproteínas: gp90 e gp45, que estão envolvidas na ligação do vírus ao receptor celular. Como receptor de AIEV foi identificado o lentivírus equino-1 (ELR-1), membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (DONG *et al.*, 2014; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

As LTRs são formadas na fase de síntese do DNA pelas sequências RU3 e RU5 presentes no genoma do vírus, as quais contêm o sítio de iniciação da transcrição para a RNA polimerase II (MAURY, 1998). A função de LTR tem impacto direto sobre a infecção produtiva da célula hospedeira, a expressão viral e montagem para elevar a carga viral a níveis associados à progressão da doença e patogênese e transição entre os níveis de expressão viral da latência clínica para a infecção altamente produtiva (KREBS; HOGAN; QUITERIO, 2001).

O genoma também apresenta três ORF`s (sequências de leituras abertas), além dos três genes estruturais, as quais codificam proteínas acessórias (tat, rev e S2) que controlam os níveis de replicação do vírus, na defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro e promovem a patogenicidade. Tat tem a função de recrutar proteínas da célula hospedeira essenciais para a elongação do RNA viral nascente, enquanto rev promove o *splicing* e a exportação nuclear do RNAm viral para o citoplasma. S2 codifica proteína essencial para determinação da virulência *in vivo*, participando da regulação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, induzindo potencialmente o quadro de trombocitopenia observado na fase aguda da doença. As proteínas tat e rev são comuns a todos os retrovírus, enquanto S2 está presente apenas no genoma do EIAV (BACCAM *et al.*, 2003; COUTINHO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2000).

Todos os lentivírus codificam um transativador pós-transcricional, *rev*, mas recentemente um estudo demonstrou que o (EIAV), codifica um segundo transativador pós-transcricional, *grev*. Semelhante ao *rev*, *grev* está localizado no núcleo e ambos são capazes de mediar a expressão de *MAT* (uma proteína viral recentemente identificada da função desconhecida do EIAV), mas o *rev* pode mediar a expressão de EIAV GAG/POL, enquanto *grev* não pode. Assim, é possível afirmar que o EIAV codifica dois transativadores pós-transcricionais, *rev* e *grev*, com funções semelhantes, mas não idênticas (LI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022).

Por muito tempo, o conhecimento do genoma de EIAV foi restrito às sequências de duas amostras: Wyoming, a primeira sequência de EIAV obtida em 1997 nos EUA (PETROPOULOS, 1997), e Liaoning, isolada na China 2007 (TU *et al.*, 2007). Atualmente, com o uso de novas tecnologias de sequenciamento, tem sido possível aumentar o conhecimento do genoma EIAV de amostras de Equídeos de diferentes países: Miyazaki do Japão (DONG *et al.*, 2013); H3, F4, F3 e F2 da Irlanda (QUINLVAN *et al.*, 2013); SA e DE da Itália (CAPPELLI *et al.*, 2017). Novas

sequências de genoma completas e quase completas foram depositadas no GenBank: Cornwall, Devon e Newmarket da Inglaterra (ROBINSON *et al.*, 2019); TN_0109, UKY98-07_PA_S15, NC_Dagmar e UKYE62_FL dos EUA (COOK *et al.*, 2019); Ecl_Gard_co e Bau_Gard_co da França (DESHIERE *et al.*, 2019).

No Brasil, o primeiro genoma completo de dois cavalos naturalmente infectados de amostras de campo do Pantanal, uma região endêmica para AIE, foi recentemente descrito (MALOSSO *et al.*, 2020). Existem sequências gênicas parciais de amostras brasileiras que compreendem o gene *gag* (TIGRE *et al.*, 2016), o gene LTR-*tat* (CURSINO *et al.*, 2018) e o gene *tat-gag* (CURSINO *et al.*, 2020). No entanto, é necessário ampliar o conhecimento do genoma do EIAV, o que permitirá rastrear a circulação do EIAV e contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico molecular para o EIAV e os atuais testes imunológicos existentes.

1.2.3 PATOGENIA

O EIAV tem tropismo *in vivo* por células da linhagem monocítica/macrofágica, células alvo primários nessas infecções virais. A infecção dos monócitos é dita improdutiva, sendo necessária a maturação para macrófagos para iniciar a multiplicação viral, evento próprio dos lentivírus denominado restrição da multiplicação. Assim, os órgãos onde ocorre maior multiplicação viral são os que apresentam abundância em macrófagos como: baço, fígado, linfonodos, pulmões, rins, glândula adrenal e medula óssea. Portanto os monócitos e macrófagos infectados são os grandes disseminadores da doença no animal (CLEMENTS; ZINK, 1996; MAURY, 1994; SELLON *et al.*, 1996).

A infecção das células do hospedeiro pelo EIAV tem início quando a gp90 do envelope do vírus se liga ao receptor *equine lentivirus receptor-1* (ELR-1). Estudos demonstraram que ELR-1 é expressa em células permissivas à multiplicação de EIAV, incluindo as células da linhagem monocítica/macrofágica, estando ausente em linhagens de células humanas, símias e de roedores (LIN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2005).

Após a ligação do vírus ao receptor ELR-1, ocorrem mudanças conformacionais nas glicoproteínas do envelope e na membrana celular do hospedeiro, ocasionando a fusão viral à célula hospedeira. A multiplicação viral na célula infectada é comum a todos os lentivírus (figura 3). Dentro do citoplasma da célula hospedeira o vírus transcreve sua fita de RNA em DNA proviral, com auxílio da RT. O DNA viral é

integrado no DNA genômica com auxílio da IN, denominando-se DNA proviral, alterando as funções das células do hospedeiro ocasionando multiplicação intensa de material genético. O vírus é liberado da célula hospedeira para corrente sanguínea através da membrana com auxílio da enzima PR. O DNA proviral persiste durante toda

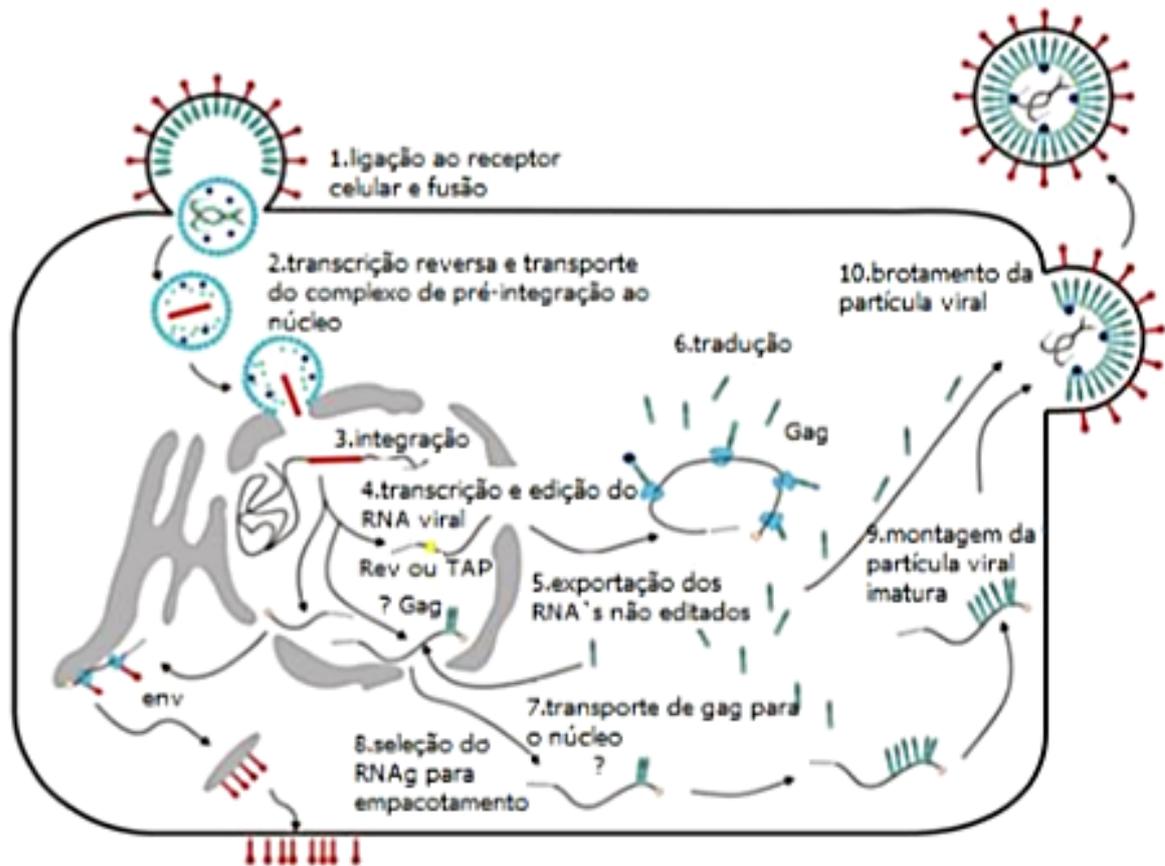


Figura 3. Esquema representando o ciclo de multiplicação dos lentivírus. O ciclo de multiplicação ocorre no citoplasma da célula hospedeira, com a ajuda da enzima RT, ocorre a transcrição da fita de RNA em DNA proviral. O DNA viral é integrado no DNA genômica com auxílio da IN, denominando-se DNA proviral, a partir daí ocorre intensa multiplicação de material genético dentro da célula hospedeira. O vírus é liberado da célula hospedeira para corrente sanguínea através da membrana com auxílio da enzima PR (STAKE *et al.*, 2013, modificado).

As alterações clínicas observadas na fase aguda da AIE têm início a partir da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), IL-1 α e fator de transformação de crescimento (TGF- β) (ISSEL *et al.*, 2014; SELLON *et al.*, 1998; TORNQUIST; OAKS; CRAWFORD, 1997).

Os macrófagos são os mais importantes produtores das citocinas pró-inflamatórias nas infecções pelos lentivírus (ESSER *et al.*, 1996; LECHER *et al.*, 1997). As citocinas IL-6 e TNF- α induzem febre através da ativação da via do ácido

araquidônico, aumentando a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (COOK *et al.*, 2013). A associação de TNF- α e TGF- β apresentam ação supressiva na medula, na hematogênese dos megacariócitos, levando aos quadros de trombocitopenia e contribuindo para os quadros de anemia (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004; TORNQUIST; OAKS; CRAWFORD, 1997).

A anemia e a trombocitopenia encontrada nos animais infectados podem ser explicadas pela destruição dos eritrócitos e plaquetas pelos fagócitos ativados por componentes do sistema imunológico (complemento C3, anticorpos IgG e IgM), como ocorre nas reações de hipersensibilidade tipo III. A atuação dos produtos da resposta imune também podem causar outros sinais clínicos como glomerulonefrite, hepatite e linfadenopatia, causados pela deposição de imunocomplexos (HENSON; MCGUIRE, 1971; ISSEL *et al.*, 2014; MAURY, 1998; MCGUIRE; FRASER; MEALEY, 2004; SELLON *et al.*, 1996). Ainda podemos salientar que o nível de IFN- α também está fortemente relacionado à multiplicação viral e à viremia (TORNQUIST; OAKS; CRAWFORD, 1997).

1.2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O EIAV apesar de infectar todos os membros da família *Equidae*, os aspectos clínicos e patológicos da doença variam dependendo da espécie. Nos muares, as alterações clínicas e laboratoriais são semelhantes aos observados em equinos (SPYROU *et al.*, 2003). Em asininos, mesmo sendo susceptíveis ao EIAV, apresentam níveis de viremia muito baixos, o que já justificaria o fato de ser escasso as observações dos sinais clínicos da enfermidade nessa espécie (COOK *et al.*, 2001).

O curso clínico da AIE é variável e inespecífico, tratando-se de uma doença persistentemente crônica com ciclos recorrentes de viremia e episódios clínicos de anemia, febre e trombocitopenia. Esses episódios clínicos são variáveis e irão depender da dose e virulência da amostra infectante, também da susceptibilidade individual e o *status* imune dos hospedeiros (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Em infecções naturais e também em condições experimentais a resposta clínica dos hospedeiros ocorre em três fases como representado na figura 4 (CRAIGO; MONTELARO, 2013; ISSEL; COGGINS, 1979; MCGUIRE; CRAWFORD; HENSON, 1971).

Na fase aguda ocorre febre, trombocitopenia, anorexia, com intensa multiplicação viral nos macrófagos. A fase tem duração de 5 a 30 dias após a infecção, e o título de anticorpos específicos pode ser baixo, insuficientes para reagir nos testes sorológicos.

Na fase crônica ocorrem frequentes ciclos de viremia com intervalos irregulares entre os ciclos, podendo essa fase durar até um (1) ano, com episódios clínicos mais variados incluindo febre, anorexia, edema, leucopenia, anemia, trombocitopenia, hemorragias, diarreia, glomerulonefrite e letargia. Cada episódio pode ter a duração de três a cinco dias. A maioria dos animais apresenta episódios recorrentes da doença associado a picos de viremia com intervalos irregulares. Cada episódio de viremia está associado à emergência de uma nova variante nova predominante (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Após essa fase os animais entram na fase de infecção assintomática ou inaparente. A maioria dos animais na natureza se encontram nesta fase, o que os tornam mantenedores do vírus no plantel, se não forem identificados. Estes animais não apresentam sinais clínicos e têm baixos níveis de viremia. Em alguns portadores assintomáticos a fase de viremia e recrudescimento dos sinais clínicos podem ser induzidos em casos de imunossupressão como o estresse e a administração de corticoides (CRAIGO; MONTELARO, 2013; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Durante a fase assintomática a carga viral diminui, assim como a expressão de RNAm viral. Durante a fase aguda o nível de RNA viral no plasma pode atingir de 10^5 a 10^8 cópias/mL, enquanto na fase inaparente, o número de cópias de RNAm no plasma pode ser menor que 100 cópias por mL, em consequência da supressão efetiva da multiplicação viral. A gravidade dos sinais clínicos diminuem com o tempo, podendo não existir mais sinal clínico ao final de um (1) ano pós-infecção o que indica um controle altamente eficiente da doença e da multiplicação viral (HAMMOND *et al.*, 2000).

Durante os episódios febris da fase crônica, os animais podem apresentar linfadenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia, hemorragias viscerais e nas mucosas, edema ventral subcutâneo e trombose. No exame histopatológico pode ser observado o acúmulo de linfócitos e macrófagos em áreas periportais do fígado e nos gânglios linfáticos, baço, meninges e pulmão (SELLON; FULLER; MCGUIRE, 1994).

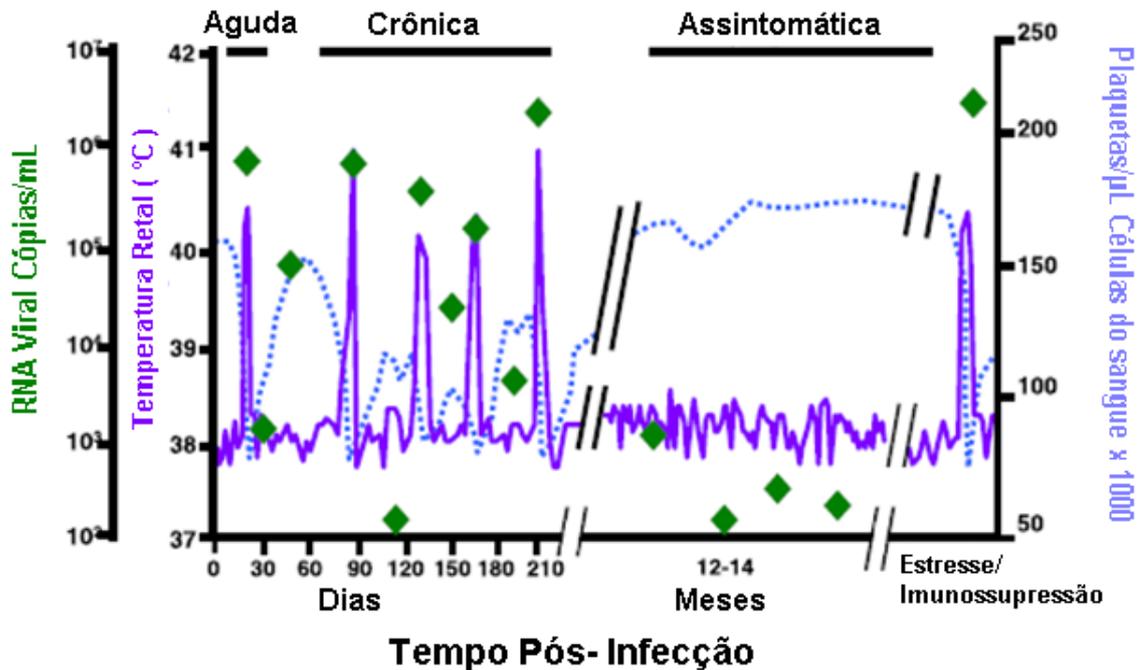


Figura 4. Cinética da infecção por EIAV em animais experimentalmente infectados. Curva demonstrando o perfil clínico típico durante o tempo decorrido após à infecção, indicando os estágios característicos da doença. Os episódios febris são definidos como temperaturas retais acima de 39 ° C, a trombocitopenia é definida como níveis de plaquetas abaixo de 105.000 / μ L de sangue e a viremia de plasma for $> 10^5$ cópias de RNA/mL (CRAIGO; MONTELARO, 2013, modificado).

1.2.5 TRANSMISSÃO

A transmissão do EIAV ocorre pela transferência de material biológico, sendo o sangue de equídeos persistentemente infectados a principal fonte de transferência do EIAV para animais susceptíveis. A transmissão pode ocorrer por via vertical (intrauterina), horizontal, por meio de utensílios (esporas, agulhas, freios e outros) ou por insetos hematófagos (vetores mecânicos). Não existem relatos de contágio direto de um animal para outro (GONÇALVES; RIBEIRO, 2005).

Os artrópodes hematófagos da ordem *Diptera* como a mosca do estabulo (*Stomoxys calcitrans*) e os tabanídeos (*Tabanus* sp) são os principais responsáveis por transferir o vírus, funcionando como vetores mecânicos (não há multiplicação do agente no vetor) que podem transportar o vírus no aparelho bucal por um período de 30 minutos a 4 horas. Desta forma a maior incidência de AIE ocorre em áreas ou habitats mais favorável aos insetos tabanídeos, com regiões de áreas alagadas, presença de rios, lagos assim como meses de alta pluviosidade (COOK, R. F.; LEROUX; ISSEL, 2013; ISSEL, C. J. *et al.*, 2014; ISSEL, C. J.; FOIL, 1984;; SPYROU *et al.*, 2003).

Embora a transmissão da AIE por insetos hematófagos seja considerada uma forma de transmissão de importância epidemiológica, o homem apresenta um potencial de transmissão superior pela quantidade de sangue que pode veicular por meio de fômites. Esta via pode envolver uma maior carga viral. Destaca-se a transferência de sangue contaminado em falhas de manejo ou de forma iatrogênica como a reutilização de agulhas, materiais cirúrgicos e arreios. Estudos relatam que o vírus pode permanecer viável em agulhas contaminadas por até 96 horas. Desta forma, o uso de materiais sem prévia desinfecção ou esterilização tem sido responsável por surtos da doença em todo o mundo (CRAIGO; MONTELARO, 2013; HAWKINS *et al.*, 1976; SANTOS; LEITE; REIS, 2012; WILLIAMS *et al.*, 1981). Em um estudo de avaliação de risco associados à anemia infecciosa equina Pádua *et al.*, (2022) conclui que o uso de pistola de vacinação é fator de risco associados à ocorrência de AIE.

Como o vírus pode estar presente em todos os fluidos biológicos, existem evidências de transmissão do EIAV *in utero* da égua para o potro, também transferência através do colostro e sêmen do garanhão. Essa forma de transmissão porém é mais rara e quando ocorre é provável que o animal infectado esteja em intensa viremia (CRAIGO; MONTELARO, 2013), confirmando esse fato Resende *et al.*, (2022) apresentaram evidências de que a transmissão vertical do EIAV é um evento pouco recorrente em potros nascidos de éguas soropositivas para EIAV assintomáticas.

1.2.6 DIAGNÓSTICO

A AIE é uma doença infecciosa que pode apresentar sinais clínicos inespecíficos, sendo que a maioria dos animais infectados pelo vírus são portadores assintomáticos, e sendo assim, o diagnóstico clínico é impossível. Desta maneira, o diagnóstico laboratorial assume um papel decisivo no controle e prevenção da doença. A principal forma de controle é o diagnóstico e a eutanásia dos animais infectados (BRASIL, 2004).

O histórico do diagnóstico da AIE pode ser dividido em dois períodos. No primeiro período antes de 1960 quando as pesquisas com vírus eram muito limitadas e impossibilitava testes *in vitro*, como isolamento, multiplicação e quantificação. O diagnóstico era feito apenas pela presença de hemosiderina no sangue ou através da inoculação de sangue de um animal suspeito em um cavalo sadio e observação do

aparecimento de sinais clínicos. Após 1960, vários testes diagnósticos começaram a ser desenvolvidos como a fixação de complemento, imunofluorescência, mas o teste ouro descoberto e até hoje utilizado em todo o mundo como exame oficial para AIE foi a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), descrito por Coggins em 1972 (COGGINS; NORCROSS, 1970; ISSEL; COGGINS, 1979).

1.2.6.1 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

A IDGA é o teste oficial indicado pela WOAAH para o diagnóstico sorológico da AIE em todo o mundo (WOAH, 2013). Este teste utiliza como antígeno a proteína p26 (COGGINS; NORCROSS, 1970). É uma prova qualitativa, com alta especificidade, fácil execução, relativamente rápido, de baixo custo e simples, porém para a leitura dos resultados é necessário um bom treinamento, pois sua interpretação é subjetiva pela leitura visual das curvaturas das linhas de precipitação (BRASIL, 2004).

A IDGA é reconhecido como o melhor teste para o diagnóstico, apesar de possuir algumas limitações, é muito específico e se baseia na técnica de migração radial do antígeno (Ag) e do anticorpo (Ac) presente no soro animal, em um meio semissólido (ágar-gel) com a formação de complexos antígeno-anticorpo. Estes complexos formados são insolúveis e precipitam formando uma banda ou linha de precipitação visível a olho nu, identificando assim anticorpos presentes contra o antígeno. O teste de IDGA apresenta baixa sensibilidade, animais com baixos níveis de anticorpos não são detectados por esta técnica, o que pode permitir a circulação de animais com resultados falsos negativos. O ensaio não detecta animais infectados recentemente, com isso, a maioria dos equídeos só irá se tornar soropositivos 45 dias após a infecção (ISSEL; COGGINS, 1979; REIS; LEITE, 1994; SCICLUNA *et al.*, 2013).

1.2.6.2 Ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA)

Outro ensaio utilizado para o diagnóstico da AIE é o ensaio imunoenzimático (ELISA), com alta sensibilidade e a capacidade para detectar animais positivos em torno de 12 dias pós-infecção. Este método é mais rápido, maior praticidade, e se mostrou mais sensível quando comparado ao clássico teste de IDGA (REIS; LEITE, 1994). O ensaio se baseia no uso de antígenos, anticorpos e de anti-imunoglobulinas marcadas com uma enzima (ISSEL; COOK, 1993).

Diversos ensaios estão disponíveis, como o ELISA de competição (cELISA) que detecta anticorpos anti-p26 (NARDINI *et al.*, 2016), o AS-ELISA que detecta anticorpos anti-gp45 (CHONG *et al.*, 1991), e o ELISA que utiliza como antígeno o gp90 recombinante, que detecta os anticorpos precocemente (REIS, *et al.*, 2012). Os países de América do Norte e Europa que aprovaram kits de ELISA de uso comercial mostraram a eficácia do uso combinado com a IDGA, nos programas de vigilância sanitária (PARÉ; SIMARD, 2004; SCICLUNA *et al.*, 2013). A partir de 1980, *United States Department of Agriculture* (USDA) aprovou o uso dos ELISAs, devido à sua alta sensibilidade, ótima característica para um teste de triagem, sendo que os animais que desenvolvem resultados positivos no ELISA deverão ser confirmados pelo teste de IDGA (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013; ISSEL; COOK, 1993).

Em dezembro de 2014, a portaria nº 378 do MAPA, foi anexada a portaria nº 84 de 19 de outubro de 1992 indicando que o ELISA passa a ser um teste indicado para o diagnóstico da AIE. Entretanto as amostras com resultado positivo no teste de ELISA, como nos Estados Unidos, devem ser submetidas ao teste de IDGA (BRASIL, 2014).

Para interpretação dos resultados dos ensaios imunológicos é importante destacar que a maioria dos equídeos desenvolve a resposta imune humoral detectável através desses testes entre 16 a 42 dias após a infecção. Os anticorpos anti-gp90 são os primeiros a serem detectados no sangue, entre 7 e 10 dias pós-infecção, e passa a ser o anticorpo predominante no animal infectado. Entre 10 a 14 dias pós-infecção há o aparecimento de anticorpos anti-p26 e apesar da rapidez para atingir o pico de concentração, seus valores são inferiores aos anti-gp90. Os anticorpos anti-gp90 apresentam vantagens frente ao IDGA devido a detecção precoce, que são os primeiros a aparecerem no sangue e os mais abundantes, diminuindo o número de resultados falsos-negativos (REIS, 1997).

No Brasil dois kits de ELISA disponíveis comercialmente são aprovados para diagnóstico de AIE. O kit VETLISA AIE IgG, Quibasa-Bioclin, Brasil, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra o EIAV em soro de equídeos, no qual anticorpos contra os vírus presentes na amostra se ligam ao antígeno gp90 recombinante purificado que reveste a placa (REIS, *et al.*, 2012). O kit cELISA - IDEXX, EUA, que detecta anticorpos anti-p26 (NARDINI *et al.*, 2016).

1.2.7 CONTROLE E PROFILAXIA

O controle e profilaxia da doença se baseia em práticas de manejo adequadas, identificação sorológica dos animais infectados, segregação ou eutanásia dos mesmos (CRAIGO; MONTELARO, 2013).

As principais medidas de controle são o isolamento com uma distância de 183 metros entre os animais portadores ou suspeitos e negativos; o sacrifício dos animais positivos; a não reutilização de seringas e/ou outros utensílios que possam carregar o vírus de um animal para outro, bem como a desinfecção de utensílios utilizados em mais de um animal; controle dos vetores e evitar o contato entre animais de “status” sanitário desconhecido (quarentena) (RAVAZOLLO; COSTA, 2007; SANTOS; LEITE; REIS, 2012).

No Brasil, as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina seguem as medidas do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), e atualmente estão dispostas na Instrução Normativa (IN) número 45, de 15 de junho de 2004, do MAPA. Essa IN contém 9 (nove) capítulos que detalham desde simples definições até as normas e formas como os veterinários responsáveis por propriedades, os laboratórios de diagnósticos e os veterinários oficiais devem agir em relação ao diagnóstico, controle e profilaxia da AIE (BRASIL, 2004).

Quando se detecta um foco de AIE são preconizadas medidas como a interdição da propriedade, cumprimento do termo de interdição, notificação ao proprietário da proibição de trânsito dos equídeos da propriedade e da movimentação de objetos passíveis de veiculação do EIAV; investigação epidemiológica de todos os animais que reagiram positivamente ao teste de diagnóstico da AIE, incluindo histórico de trânsito; marcação, sacrifício ou isolamento dos equídeos portadores; realização de exame laboratorial, para o diagnóstico da AIE, de todos os equídeos existentes na propriedade; desinterdição da propriedade foco após realização de 2 (dois) exames com resultados negativos para AIE, consecutivos e com intervalo de 30 (trinta) a 60 (sessenta) dias, nos equídeos existentes; orientação aos proprietários das propriedades que se encontrarem na área perifocal, pelo serviço veterinário oficial, para que submetam seus animais a exames laboratoriais para diagnóstico de AIE.

Em regiões como o Pantanal brasileiro, com alta prevalência da AIE, são adotadas medidas alternativas de controle da AIE, baseada na segregação dos animais positivos, pois a eutanásia de todos os animais positivos comprometeria significativamente a pecuária extensiva que é a principal atividade econômica na

região (SILVA; BARROS, 2001). Estudos mostraram que a transmissão da AIE pode ser controlada através da identificação e segregação dos animais positivos a uma distância de pelo menos 200 metros de outros equídeos, distância considerada como segura para evitar a transmissão pelo inseto vetor (ISSEL; FOIL, 2015).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os equídeos são mamíferos de grande porte que antigamente eram usados apenas para desempenhar as funções de montaria, carga e tração. Hoje a criação de equídeos vem ganhando destaque, principalmente pelo avanço dos esportes equestres, e ainda no aspecto social. Como exemplo podemos citar a utilização dos animais na equoterapia e no programa de “cavalo-guia”.

O Nordeste brasileiro concentra o maior número de asininos e muares do país. Esses animais eram de extrema importância para os serviços agrícolas, porém no cenário recente, vêm sendo substituídos por formas de transporte mecanizados. Desta forma o número de jumentos abandonados cresce dia após dia, sendo que estes animais passaram a viver livremente em rodovias como animais quase selvagens. A crescente população de animais abandonados sem informações sanitárias, constitui uma ameaça em potencial, em termos de possibilidade de atuarem como reservatório para manutenção de doenças, tais como a AIE.

A AIE é uma doença infecciosa grave de grande importância para a criação de equídeos. A doença acomete somente os membros da família *Equidae* e é causada pelo vírus da anemia infecciosa equina (EIAV). Os animais infectados podem se tornar portadores assintomáticos por toda a vida e potenciais transmissores do EIAV, assim, é considerada uma infecção viral persistente de equídeos. A patogênese da doença é altamente variável, refletindo uma ampla gama de formas clínicas da doença – desde infecção inaparente até a morte. Considerando a inespecificidade dos sinais clínicos e que a maioria dos animais infectados pelo vírus são portadores assintomáticos, o diagnóstico clínico é impossível e o diagnóstico laboratorial assume um papel decisivo no controle e prevenção da doença.

A AIE é descrita mundialmente, já foi relatada nos EUA, Canadá, América Latina, Europa e Ásia. A doença está na lista da *World Organization for Animal Health* (WOAH) entre as 11 doenças de notificação obrigatória dos equinos, por se tratar de uma doença de alta morbidade, sem tratamento, sem vacina e que causa entaves

sanitários e econômicos para a equideocultura. A AIE encontra-se amplamente disseminada no território brasileiro, de acordo com a coordenação de Informação e Epidemiologia – CIEP foram notificados 1.167 casos de anemia infecciosa equina todo o território nacional no segundo semestre de 2021.

No Brasil, as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina seguem as medidas do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE). A doença acarreta grandes prejuízos diretos e indiretos quando ocorre nas fazendas ou haras já que causa a diminuição da capacidade do trabalho dos animais, a proibição da participação em eventos, além da eutanásia obrigatória dos acometidos.

Os dados da prevalência e incidência da doença no Brasil são coletados baseados no teste diagnóstico realizado para o trânsito de equídeos e a participação em eventos agropecuários. Assim, a taxa de prevalência da AIE no território brasileiro pode estar subestimada devido a esses fatores.

No Brasil, o teste de escolha para o diagnóstico sorológico é o IDGA e, paralelamente, o teste ELISA pode ser usado, mas deve ser confirmado por um teste IDGA em caso de achado positivo. Assim, é essencial ampliar os ensaios de detecção da AIE para que sejam mais sensíveis, uma vez que o IDGA apresenta limitações para a detecção da infecção como a baixa sensibilidade e alta especificidade. Logo, em algumas situações torna-se necessário a realização de um diagnóstico molecular, além dos testes sorológicos convencionais, como por exemplo, para a resolução de resultados discordantes, ou no caso de suspeita de infecção de amostras negativas em testes sorológicos.

Deste modo, considerando a escassez de sequências de nucleotídeos de amostras de vírus coletadas no Brasil disponíveis em bancos de dados públicos, tornam-se importantes os estudos de detecção e caracterização molecular do EIAV circulante nas diversas regiões do Brasil.

Destaca-se a grande relevância do estudo dos aspectos biológicos, epidemiológicos e profiláticos da AIE para a resolução dos entraves econômicos e controle da mesma. Acompanhar a evolução clínica e imunológica dos equinos naturalmente infectados pelo EIAV e desenvolver o conhecimento das características do EIAV circulante na região é importante para novas estratégias de controle da doença.

O nosso estudo buscou fazer a caracterização de EIAV circulantes no semiárido brasileiro, Nordeste, além de possibilitar um incremento nos conhecimentos sobre a patogênese e o curso clínico da AIE em animais naturalmente infectados. Também foram avaliados animais errantes, sendo possível avaliar o risco desses animais serem dispersadores e mantenedores do vírus na região.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar alterações clínicas e laboratoriais de equídeos naturalmente infectados pelo vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), e realizar o diagnóstico por métodos sorológicos e moleculares, contribuindo para caracterização da doença no Nordeste.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar clinicamente animais naturalmente infectados com o EIAV, dentre animais recolhidos das estradas de todo o estado do Ceará e dentre os equídeos utilizados no turismo equestre ecológico na Vila de Jericoacoara;
- Analisar o status sorológico de animais naturalmente infectados com o EIAV;
- Avaliar a evolução clínica e laboratorial de animais infectados com EIAV;
- Detectar e amplificar em PCR o DNA proviral do EIAV para caracterização genômica do EIAV em asininos, muares e equinos naturalmente infectados no Nordeste brasileiro;
- Sequenciar as amostras amplificadas em PCR;
- Fazer a análise filogenética das sequências de nucleotídeos.

4 METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UNINTA) com protocolos nº 2017.03.001-P e nº 2019.07.008-P e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), processo nº: 21000.043322/2016-99.

4.1 LOCAIS DO ESTUDO

Foram avaliados asininos, equinos e muares provenientes de duas localizações geográficas diferente do estado do Ceará. Parte dos animais estudados foram provenientes da Fazenda Paula Rodrigues (FPR) localizada no município de Santa Quitéria, Ceará (4° 19' 55" S 40° 09' 25" O). A fazenda é mantida pelo DETRAN/CE com o propósito de abrigar animais abandonados e apreendidos nas estradas de todo o estado do Ceará. Com uma população total flutuante, variando entre 1.000 e 5.000 animais, dependendo da época do ano, é considerada a propriedade com o maior número de jumentos do mundo. Em 2017, a população total de asininos da fazenda variou de 959 à 1126 animais (Figura 5).



Figura 5. Fotografia dos animais da Fazenda Paula Rodrigues. Vista geral de animais pertencentes a Fazenda Paula Rodrigues, os asininos representam a maior parcela da população da propriedade, com população anual variando de 1000 a 5000 animais, dependendo da época do ano. Fonte: COSTA, V. M. D., 2023.

Também foram estudados animais que atuam no turismo equestre ecológico na Vila de Jericoacoara (JERI), localizada no Parque Nacional de Jericoacoara (2° 47'

S 40° 30' O), situada no município de Jijoca de Jericoacoara, estado do Ceará, Brasil. A Vila está localizada no Nordeste Brasileiro é banhada pelo Oceano Atlântico, com limites cercados pelo Parque Nacional de Jericoacoara, uma Área de Proteção Ambiental (APA), que tem por objetivo proteger e preservar amostras dos ecossistemas costeiros, assegurar a preservação de seus recursos naturais, possibilitando a realização de pesquisa científica e o desenvolvimento de atividades de educação ambiental, de recreação em contato com a natureza e de turismo ecológico. O Parque Nacional resguarda ecossistemas marinho-costeiros com mangues, restingas e dunas, de alta relevância ecológica, bem como de grande beleza cênica (ICMBIO, 2021).

A Vila de Jericoacoara tem 1,1 km² com ruas não pavimentadas, todas de areia, com clima quente e úmido, temperaturas médias oscilando entre 22° C e 35 °C e período de seca variando de 5 a 6 meses. O turismo emprega muitas pessoas na região, e o Parque e a Vila de Jericoacoara são os atrativos indutores do território. A Vila de Jericoacoara tem uma população flutuante de cerca de 3 mil pessoas, as quais vivem no entorno e se deslocam diariamente para trabalhar na Vila. O acesso a região é realizado principalmente por via terrestre, em estrada asfaltada a partir de Fortaleza, sendo que para cruzar o Parque até a Vila de Jericoacoara o trajeto ocorre pelas dunas ou pela praia, por vias não pavimentadas. O Parque vem registrando um aumento da visitação nos últimos anos, e atingiu a marca de mais de 1 milhão e 300 mil visitas em 2019, sendo atualmente a terceira unidade de conservação federal mais visitada por turistas do país (CEARÁ, 2019; ICMBIO, 2021).

A estimativa atual do número dos equídeos é de aproximadamente 200 equídeos com tutores fixos que os utilizam como fonte de renda no turismo equestre (Figura 6) e cerca de 600 asininos de vida livre que transitam pelas dunas do Parque. Apesar dos equídeos possuírem tutores, esses animais são criados soltos pelo Parque e em contato direto uns com os outros, com os asininos das dunas e até com animais silvestre das áreas preservadas do Parque.



Figura 6. Fotografia dos cavalos utilizados no turismo equestre na Vila de Jericoacoara. A estimativa do número dos equídeos é de aproximadamente 200 equídeos com tutores fixos que os utilizam como fonte de renda no turismo equestre. Fonte: COSTA, V. M, D., 2023.

4.2 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

As coletas e avaliações foram realizadas por uma equipe de veterinários e estudantes do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário UNINTA, que se deslocavam para os locais dos estudos e ao final dessas atividades retornavam para o UNINTA para o processamento das amostras sanguíneas, no mesmo dia. Em caso de coletas e avaliações de muitos animais no mesmo dia, que impossibilitassem o retorno da equipe, foi montado um laboratório no local para o processamento inicial das amostras sanguíneas.

O processamento inicial das amostras, triagem, hemograma completo, separação de soro, extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), alguns ensaios imunológicos para AIE (IDGA e ELISA gp90) e armazenamento para próximos processamentos foram realizados nos laboratórios de patologia clínica do Centro Universitário UNINTA, Sobral, Ceará. Os testes moleculares e outros ensaios imunológicos para AIE (ELISA gp90 e ELISA p26) foram realizados no Laboratório de Vírus – Instituto de Ciências Biológica da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

4.3 AMOSTRAS

Para o estudo foram avaliados 127 animais (124 asininos e 3 equinos), selecionados aleatoriamente na FPR e 112 animais (104 equinos e 8 muares) utilizados no turismo equestre ecológico em JERI. Para todos os animais do estudo foi seguido o fluxograma de avaliação clínica e coleta sanguínea (Figura 7). Inicialmente para cada animal foi preenchida uma ficha com identificação, sexo e avaliação clínica externa contemplando avaliações de escore corporal, mucosas oral e ocular e de alterações urogenital, musculoesquelética e neurológica. Os asininos, por serem animais praticamente de vida livre, as manipulações e coleta de amostras foram delicadas e nem sempre, foi possível fazer a avaliação completa.

As coletas sanguíneas foram feitas por venipuntura jugular com agulha 25x0,8mm (21G1”), após as boas práticas de flebotomia com algodão e álcool 70%, utilizando tubos à vácuo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e sem anticoagulante. Quando possível, foram obtidos aproximada 20 mL sangue de cada animal. As amostras foram identificadas com nome do animal ou número do brinco, espécie e data, acondicionadas em caixas térmicas e levadas para os laboratórios do Centro Universitário INTA - UNINTA para serem processadas.

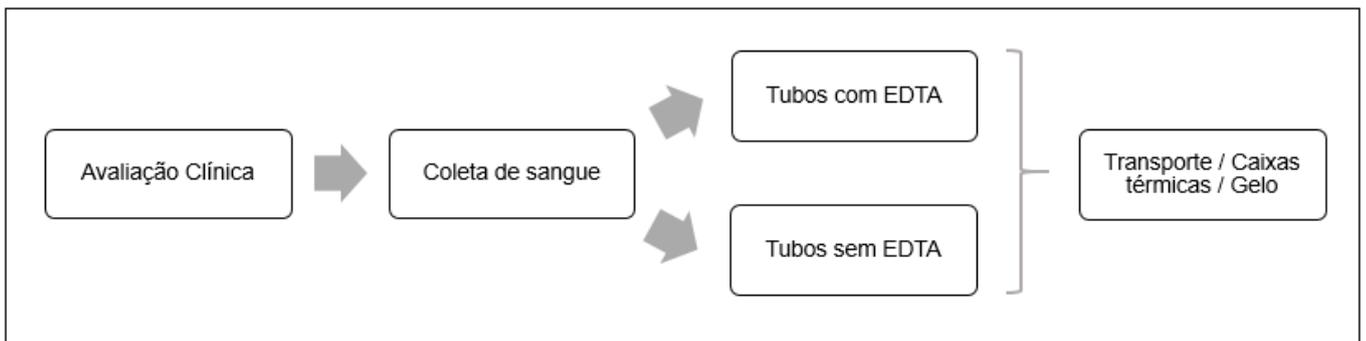


Figura 7. Fluxograma da avaliação clínica e coleta. Fluxograma utilizado nas atividades da equipe para as avaliações clínicas e amostras de sangue dos animais dos estudos.

4.4 PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS

O processamento das amostras foi sempre feito em no máximo 12 horas após a coleta.

As amostras em tubo com anticoagulante EDTA foram utilizadas para a o hemograma completo, obtenção de sangue total, papa de leucócitos e separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). O PBMC foi obtido apenas das

amostras de asininos da FPR. As amostras de sangue total, papa de leucócitos e PBMC foram armazenadas em freezers e a -20°C , sendo distribuídas em alíquotas em tubos de 1,5 mL que posteriormente foram utilizados em testes moleculares para a detecção de EIAV (Figura 8).

As amostras em tubos sem anticoagulante foram centrifugadas por 10 minutos à 1.000 g, para separação dos componentes do sangue, com a retração total do coágulo. Foi coletado apenas o sobrenadante correspondente ao soro sanguíneo. O soro foi transferido para microtubos de 1,5 mL, armazenados a -20°C e posteriormente utilizados para avaliação de níveis de enzimas bioquímicas séricas e para os testes de ensaios imunológicos de EIAV, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 (Figura 9).

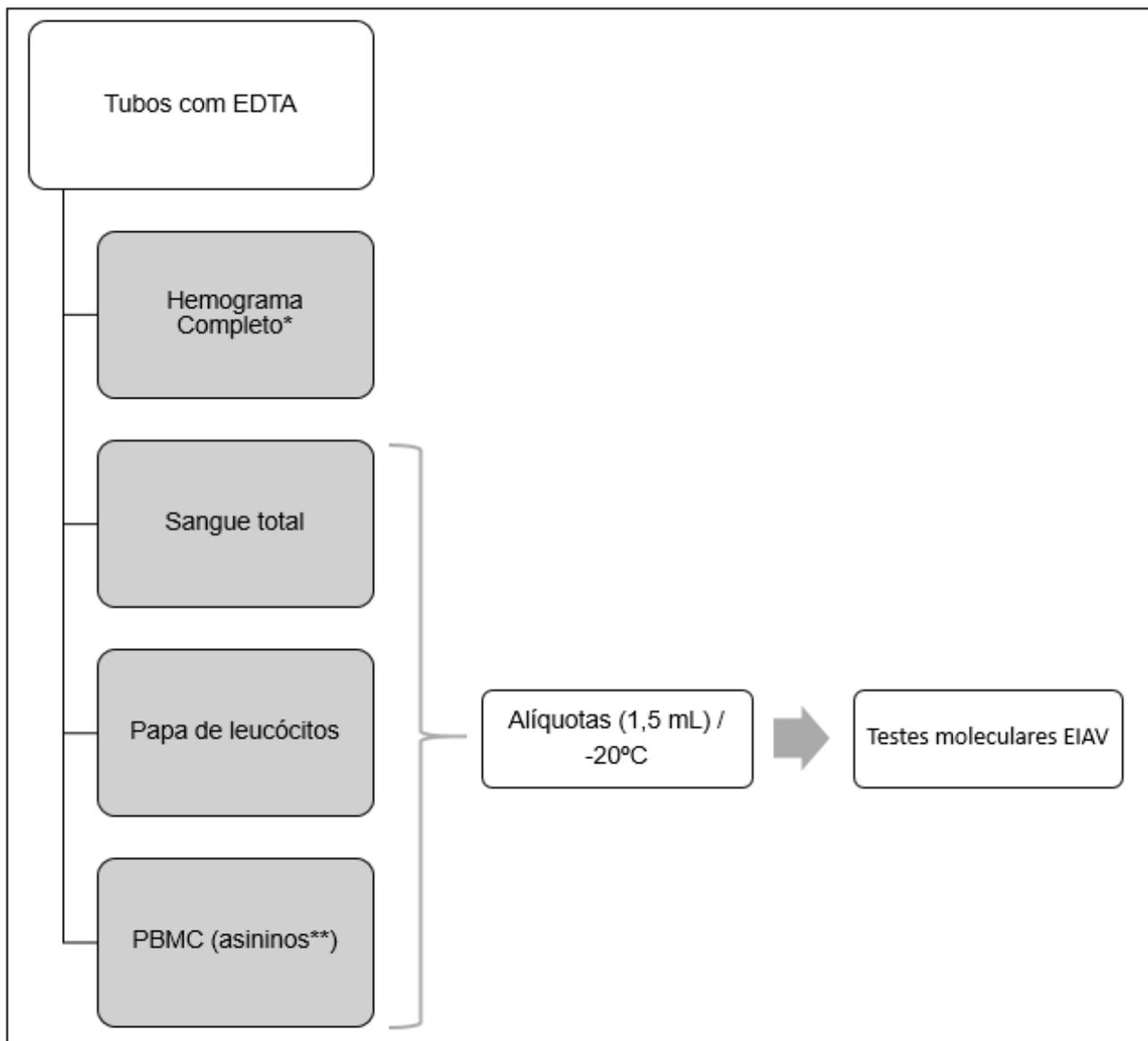


Figura 8. Fluxograma do processamento inicial das amostras sanguíneas coletadas em tubos com EDTA.

Destino das amostras sanguíneas coletadas em tubos com EDTA. *Não foi possível realizar hemograma completo dos asininos. **PBMC foi obtido apenas das amostras de sangue dos asininos da FPR.

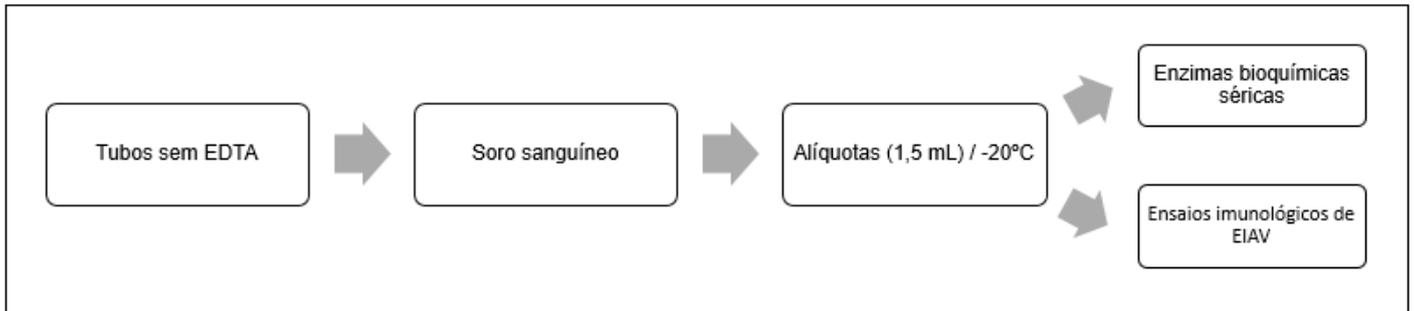


Figura 9. Fluxograma do processamento inicial das amostras sanguíneas coletadas em tubos sem EDTA. Destino das amostras sanguíneas coletadas em tubos sem anticoagulante EDTA, usadas para a obtenção de soro sanguíneo.

4.5 AVALIAÇÕES CLÍNICAS

Foram feitos exames clínicos dos animais por meio de avaliação semiológica completa, sendo avaliados em relação ao estado geral e as condições físicas, através das técnicas de inspeção e auscultação (Figura 10).

Com a técnica de inspeção foram avaliados:

- Pelagem do animal;
- Escore corporal do animal através do sistema de avaliação proposto por Carrol & Huntington (1988), que considera a avaliação visual e palpação do acúmulo de gordura no pescoço, tronco (dorso lombo e costelas) e garupa. O sistema adota classificação de 0 animal muito magro, 1 magro, 2 moderado, 3 bom, 4 gordo e 5 muito gordo;
- Avaliação de mucosas: Coloração das mucosas oral e ocular;
- Tempo de preenchimento capilar (TPC): Avaliado por pressão digital da gengiva do animal, estimar-se o preenchimento sanguíneo completo do local pressionado;
- Aferição de temperatura retal: Foram considerados valores de referência para equídeos jovens 37,2 – 38,9 °C e adultos 37,5 – 38,5 °C;
- Avaliação dos linfonodos mandibulares e pré-escapulares.

Com a técnica de auscultação foram avaliados:

- Frequência cecal: Avaliado na fossa paralombar direita durante 5 minutos;

- Frequência cardíaca (FC): Avaliada por um minuto no lado esquerdo do animal na região torácica nos espaços intervertebrais (3^o-5^o espaço intercostal), valores de referência de 28 – 40 bpm;
- Frequência respiratória (FR): Avaliado na região cervical. Valor de referência 8-20 mpm.

Nesse tópico, deve-se destacar que animais de vida livre, podem se tornar animais ferais, a exemplo dos asininos da FPR que eram animais abandonados que viviam livremente nas estradas. O contato com os animais ferais foi cauteloso, pois pode prejudicar os animais causando desordem metabólicas por conta do estresse, além de ser um risco para a equipe de trabalho. Assim, pensando no bem-estar dessa população e da equipe, não foram realizadas a avaliação clínica completa desses animais.



A



B

Figura 10. Avaliação clínica dos animais. A. Dia de avaliação clínica e coleta de asininos da FPR. B. Dia de avaliação clínica e coleta de equinos da Vila de Jericoacoara, também foram feitas

orientações aos proprietários sobre a pesquisa e os resultados esperados. Fonte: COSTA, V. M. D., 2023.

4.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E FRACIONAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

A separação da papa sanguínea, soro sanguíneo e PBMCs foi feito durante o processamento inicial da amostra de sangue, em no máximo 12 horas após a coleta. Primeiramente, uma amostra em tubo com EDTA e uma amostra em tubo sem EDTA foram centrifugados por 10 minutos à 1.000 g, para separação dos componentes do sangue. Nos tubos com anticoagulante, foram retiradas a fase intermediária, entre o plasma e as células vermelhas, a papa de leucócitos, fase composta principalmente pelos glóbulos brancos presentes no sangue. Já nos tubos sem anticoagulantes, com a retração total do coágulo, foi coletado apenas o sobrenadante correspondente ao soro sanguíneo. O soro foi transferido para microtubos de 1,5 mL, e armazenados a -20 °C até as próximas análises.

Para o fracionamento do PBMC, as amostras de sangue coletadas em tubos a vácuo com anticoagulantes EDTA foram centrifugadas por 10 minutos à 250 g. Após a centrifugação foi coletada a fase intermediária, correspondente a papa de leucócitos, a qual foi diluída em igual volume de PBS 1X (tampão fosfato-salino). A mistura foi depositada, cuidadosamente, em um tubo cônico, contendo volume igual de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcar, Suécia), e centrifugada a 500 g por 30 minutos. Após a centrifugação, foi coletado o anel de PBMCs da fase intermediária entre o ficoll e o plasma sanguíneo, e transferido para outro tubo cônico, contendo volume igual de PBS 1X. A mistura resultante foi centrifugada por 10 minutos à 400 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células obtido foi homogeneizado em 3 mL de PBS 1X. Em seguida, a mistura foi centrifugada novamente 10 minutos à 400 g. Ao final o sedimento obtido foi homogeneizado em 1 mL de PBS 1X e armazenado em freezer a -20°C até extração de ácido nucleico para os testes moleculares.

4.7 HEMOGRAMA COMPLETO

Os hemogramas completos foram feitos em no máximo 12 horas após a coleta, a partir das amostras de sangue coletadas em tubos com anticoagulante EDTA. Essas

amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e homogeneizadas, por 2 minutos, antes do processamento dos testes hematológicos.

Os hemogramas completos foram processados por metodologia manual, onde o exame é dividido em três partes: 1. Eritrograma, que compreende o hematócrito (Ht), dosagem de hemoglobina (Hb) e a avaliação morfológica e contagem total de eritrócitos; 2. Leucograma, composto pela contagem total dos leucócitos (GL) e avaliação morfológica e contagem diferencial de leucócitos; 3. Contagem de plaquetas (Pt) e sua avaliação morfológica (SCHALM; JAIN, 2010).

O hematócrito (Ht) foi obtido pela técnica do microhematócrito, que tem como princípio a sedimentação dos elementos figurados do sangue, obtendo-se a proporção destes elementos em relação ao plasma. Utiliza um tubo capilar preenchido com sangue (2/3 do tubo), fechado em uma extremidade com massinha atóxica e submetido à centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Os demais valores do eritrograma foram obtidos por cálculos de estimativa descritos na literatura (SCHALM; JAIN, 2010). Para o leucograma, o valor total de leucócitos (GL) foi obtido através contagem em câmara de Neubauer, a contagem específica / diferencial leucocitária, contagem de plaquetas (Pt) e avaliações morfológicas das células foi realizada por microscopia óptica pela leitura do esfregaço sanguíneo corados com panótico rápido (Laborclin, Pinhais/PR) seguindo as normas do fabricante.

Destaca-se que devido as limitações em manusear os asininos, para interferir o mínimo possível no bem-estar dos animais, foram selecionados o máximo de animais para a pesquisa de AIE. Assim, a coleta foi feita por horas seguidas em um único dia, muitas vezes além de 10 horas a campo, o que inviabilizou muitas amostras para a realização de hemogramas ou nem sempre foi era possível a coleta de 20 mL de sangue, o que impossibilitou a realização de hemograma completo de todos os asininos. Assim, amostras de apenas 20 jumentos dos 124 jumentos foram analisadas quanto ao hematócrito, proteína plasmática total e fibrinogênio para avaliar o estado hematológico mediano dessa população.

4.8 A CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (PPT) E FIBRINOGENIO

As concentrações das proteínas plasmáticas totais (PPT) e fibrinogênio plasmático foram obtidas pelas técnicas de precipitação pelo calor e refratometria (SCHALM; JAIN, 2010). As amostras de sangue em tubos contendo o anticoagulante

EDTA foram aspiradas em dois tubos capilares, depois foram fechados em uma das extremidades com massinha atóxica e centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, um tubo foi quebrado na altura do plasma e foi retirada uma gota e depositada em um refratômetro portátil Biobrix® modelo S/N: 10062508, assim foi obtido a concentração das PPT. O segundo tubo foi aquecido em banho-maria a 56° C, durante 3 minutos, e, então, novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos para a separação do fibrinogênio das demais proteínas plasmáticas. Após, o tubo foi quebrado na altura do plasma e foi retirada uma gota e depositada no refratômetro limpo. Os valores das concentrações do fibrinogênio foram obtidos pela diferença entre os resultados das PPT de cada animal, a partir dos dois tubos, com e sem aquecimento.

4.9 PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DOS EQUÍDEOS DO EQUÍDEOS DO PARQUE NACIONAL DE JERICOACOARA

Para determinação dos parâmetros bioquímicos foi utilizado o analisador automático *Labmax Plenno* (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil) e kits comerciais Labtest Diagnóstica, todos cedidos pelo professor Isaac Neto Goes da Silva, da Faculdade de Veterinária (FAVET), na Universidade Estadual do Ceará (UECE). Para cada amostra soro sanguíneo foram determinadas as concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT), albumina, aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), creatinina, fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (GGT), proteínas totais e ureia. Ainda, os valores de globulinas foram calculados pela diferença entre albumina e proteínas totais.

4.10 DIAGNÓSTICOS IMUNOLÓGICOS PARA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

4.10.1 Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

O IDGA foi feito de acordo com Coggin e Norcross,(1970), com algumas modificações, de acordo com a portaria Nº 84, de 19 de outubro de 1992 do MAPA. Foi utilizado gel de agarose (Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) a 1% preparado tampão borato (NaOH 2 g, H₃BO₃ 9 g, água destilada 1.000 mL; pH = 8,5 - 8,7), em lâminas para microscopia medindo 25 X 75 mm (Figura 11). Foi utilizado *kit* comercial (Bruch, São Paulo, Brasil), contendo antígeno da proteína p26 e

processamento de acordo com as indicações do fabricante. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, por 48 horas, em temperatura ambiente e a leitura realizada a olho nu com auxílio de uma fonte de luz indireta sob fundo escuro, para a verificação da presença de linhas de precipitação entre o antígeno e o soro teste, que tem identidade com a linha formada entre o antígeno e o soro controle positivo (BRASIL, 1992). O teste foi feito no Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular plicada (NUBEM) do Centro Universitário INTA (UNINTA), com autorização prévia do MAPA.



Figura 11. Lamina de gel de agarose para IDGA. Lâminas com gel de agarose solidificado, perfurada com furador padrão, contendo 07(sete) furos, medindo 4 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre os mesmos, reação positiva onde foi verificada a presença de linhas de precipitação entre o antígeno e o soro teste.

4.10.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As amostras de soro de cada um dos animais dos estudos foram testadas em ELISA para a proteína gp90 utilizado o kit comercial (VetLISA AIE IgG, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil) e ELISA para a proteína p26 (Viriontech do Brasil, Brasil) (ainda em padronização / dados não publicados). O ELISA contendo a proteína recombinante gp90 foi feito de acordo com as normas indicadas pelo fabricante. Os ensaios se baseiam no princípio de imunocaptura para detecção qualitativa de anticorpos IgG contra o vírus da anemia infecciosa equina em soro de equinos. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas (*Spectra Max, Molecular devices*) em filtro duplo de 450 nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário). Os dois testes foram

realizados na empresa Viriontech do Brasil Indústria de Insumos e Serviços em Biotecnologia (Belo Horizonte/MG, Brasil).

4.11 SOROLOGIA PAREADA

Após o estudo epidemiológico e triagem entre animais negativos e positivos para AIE foi feita avaliação sorológica pareada de alguns animais da Vila de Jericoacoara, positivos e indeterminados nos testes sorológicos (AGID, ELISA p26 e ELISA gp90).

Para isso, a equipe retornou para a Vila periodicamente para realizar avaliações clínicas e coletas sanguíneas dos equídeos da Vila de Jericoacoara considerados positivos e indeterminados nos testes sorológicos para AIE. A frequência dos retornos variaram de acordo com a disponibilidade dos proprietários em autorizar as avaliações clínicas e coletas, trimestral, semestral ou anual.

Para a realização do estudado foram selecionados, por conveniência, um total de 34 animais. Em 13 animais foram feitas três avaliações e em 21 equídeos duas avaliações.

4.12 AVALIAÇÕES MOLECULARES

4.12.1 Extração de ácido nucleico

As extrações de DNA proviral foram feitas a partir de amostras de papa de leucócitos, sangue total ou de PBMC com a utilização de Kit comercial - *Wizard Genomic DNA Purification Kit* – A1125 Promega-USA, seguindo as recomendações do fabricante.

Uma alíquota de 300 μ L da amostra foi transferida para um novo tubo, contendo *Cell Lysis Solution*. O tubo foi invertido de 5 a 6 vezes para misturar e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente para lisar as células sanguíneas vermelhas e o material foi centrifugado por 20 segundos a 13.000-16.000 g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com cuidado. Utilizando a solução resultante da amostra e *cell lysis solution* foram adicionados 600 μ L de *nucleic lysis solution*, a solução foi pipetada para lisar as células até não permanecer nenhum grumo de células visível. Em seguida foram adicionados 3 μ L de *RNase solution*, e a solução foi homogeneizada por inversão do tubo de 2 a 5 vezes. Em seguida incubada por 15 a

30 minutos a 37°C, e depois mantida a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL de *protein precipitation solution*, a solução foi homogeneizada em Vortex por 20 segundos, e depois incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 13.000-16.000 g por 4 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi removido cuidadosamente, e transferido para um microtubo de 1,5 mL, contendo 600 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão do tubo e centrifugada a 13.000-16.000 g por 1 minuto. O isopropanol foi removido cuidadosamente e foram adicionados 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente, o tubo foi homogeneizado por inversão e a amostra foi centrifugada a 13.000-16.000 g por 1 minuto. Após a centrifugação o etanol foi descartado cuidadosamente e o tubo foi invertido e colocado para secar por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Após o etanol ter evaporado completamente foram adicionados 50 µL de *DNA rehydration solution* e incubado a 65°C por 1 hora e armazenado a -20 °C.

4.12.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Foram feitas semi-nested PCR (snPCRs) para amplificação de duas regiões diferentes do genoma do EIAV descritas por Cursino et al., (2018, 2020) Para cada PCR foi utilizado o kit *GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix* (Promega) e as concentrações dos reagentes foram utilizadas de acordo com o recomendado pelo fabricante. Para uma reação foram utilizadas as seguintes condições: 1X de *GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix* (tampão 10X contendo a enzima), 0,5 µM de cada iniciador senso e anti-senso, água livre de nucleases para completar o volume final da reação, 10% de DNA molde do volume total da reação. Para a segunda reação da snPCR, foram utilizados os mesmos reagentes, na mesma reação, mas foi empregado 10% do produto da primeira reação de PCR.

O controle de reação foi feito utilizando os mesmos reagentes, nas mesmas concentrações, como controle positivo em todas as PCRs com combinações diferentes de iniciadores. Foi utilizada uma amostra de um cavalo do Pantanal, sabidamente positiva em testes sorológicos (IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26) e já com sequencias publicadas e armazenadas no Genbank, esta amostra está identificada como POCONE-BR (CURSINO et al., 2018) e como controle negativo foi utilizado água no lugar de DNA.

As condições cíclicas das reações, como temperatura de desnaturação, pareamento e extensão, variavam a depender do tamanho do fragmento alvo a ser

amplificado e a composição de bases do iniciador. Assim, foram feitas ampliações para da região tat-gag do genoma do EIAV, amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região 5’LTR ao gene *gag* – snPCR LTR-gag – iniciadores EIAV-LTR-28-F, EIAV-TAT-380-F e EIAV-gag-672-R, as condições das reações e tamanhos dos fragmentos alvos estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores para amplificação do DNA proviral do EIAV

INICIADOR*/TM	CONDIÇÕES PCR	DNA (bp)
LTR-28-F (52.9°C) GAG-672-R (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 56°C 30'', 72°C 30''; 72°C 10'	664
TAT-380-F (53.6°C) GAG-672-R (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 56°C 30'', 72°C 30''; 72°C 3'	312

*A posição no genoma de todos os iniciadores está de acordo com a sequência Miyazaki (JX003263.1).

4.12.3 Eletroforese em géis de poliacrilamida – PAGE

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de 1,5 mm utilizando 10 µL do produto da segunda reação. O gel de poliacrilamida 12% é constituído dos seguintes reagentes: 1,4 mL de tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 5X (Tris 0,0445 M, ácido bórico 0,0445 M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,001 M pH 8.0), 2,79 mL de Bis/Acrilamida 29:1, 7 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1%, 100 µL de persulfato de amônio (APS) 10%, e 2,81 mL de água.

Para inferência do tamanho dos fragmentos amplificados na PCR foi aplicado no gel um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Promega®, Madison, WI, EUA). As amostras foram submetidas ao fracionamento eletroforético a 100 V utilizando tampão TBE 1X (Tris 4,5 mM, ácido bórico 4,5 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM pH 8.0), por aproximadamente uma hora. O gel foi corado com *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain* (Invitrogen, UK) de acordo com as normas do fabricante, na diluição 1:10.000 em água deionizada, por 30 min ao abrigo da luz, e depois foi observado em transiluminador de luz azul (*Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator*).

4.12.4 Purificação do produto de PCR

Após a leitura da eletroforese, os fragmentos de tamanho esperado, [1] 185 pb e [2] 312 pb, foram recortados do gel, com lâminas de bisturi, e transferidos para microtubo de 0,6 mL com uma abertura no fundo e encaixado em um microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 100 µL de água de injeção a cada amostra. O tubo foi centrifugado a 13.000 g por 1 minuto. A amostra foi incubada *overnight* a 4 °C, para eluição do DNA do gel. Após o período de incubação a amostra foi homogeneizada com *Vortex*, centrifugada a 13.000 g por 1 minuto e o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C até o preparo da reação de sequenciamento.

4.12.5 Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas usando os mesmos iniciadores da PCR. As sequências de nucleotídeos foram determinadas de acordo com o método de sequenciamento didesoxi (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) em um sequenciador capilar automático "ABI 3730 DNA Analyzer" (Applied Biosystems, CA, EUA), utilizando o kit "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequenciamento (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Para cada amostra foram feitas duas reações de sequenciamento, uma para o iniciador senso e outra para o anti-senso. Para cada reação foi utilizada 6,5 µL do produto purificado (DNA + água de injeção) e 1 µL do iniciador a 5 µM.

4.12.6 Análise do sequenciamento

Após o sequenciamento, as sequências foram analisadas, montadas e obtida a sequencia consenso usando o SeqTrace 0.9.0 (STUCKY, 2012). A sequência obtida foi comparada com sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], através da ferramenta nucleotide BLAST (nBLAST) do programa Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

4.12.7 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas pelo Clustal W, no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), com as sequências de genoma completo brasileiras (MALOSSI *et al.*, 2020) e sequencias parciais do EIAV descritas no Brasil

(CURSINO *et al.*, 2018, 2020), disponíveis no GenBank correspondentes as mesmas regiões do genoma de EIAV.

As estimativas de similaridade de nucleotídeos entre as sequências foram feitas na versão X do programa MEGA (KUMAR *et al.*, 2018), com base em estimativas de divergência evolutiva entre sequências. Essas análises foram feitas por meio do modelo de máxima verossimilhança composta; a variação da taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 5). As análises filogenéticas foram feitas por meio do método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Tamura-Nei de distribuição gama (5 categorias), com sítios invariáveis e valores de *bootstrap* determinados com base em 1.000 repetições.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo com os animais da FPR, foi adotada distribuição normal para obter um número amostral válido, com 5% de significância, estimado em $10\% \pm 2\%$, baseado em estudo piloto na propriedade. Assim, para ser representativo, o número amostral variou de 114 a 163 animais. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando Epitools - Epidemiological Calculators (<https://epitools.ausvet.com.au/>), com intervalo de confiança (IC) de 95%, para avaliar os fatores associados à infecção pelo EIAV. Os resultados clínicos foram comparados entre animais infectados e não infectados com EIAV usando o teste Qui-Quadrado. Os animais que apresentaram qualquer alteração clínica no momento da coleta foram considerados positivos para doença clínica. Parâmetros hematológicos também foram comparados entre animais positivos e negativos para o vírus. O teste de rejeição da hipótese nula será de 0,05 (probabilidade alfa de 5%) (SAMPAIO, 2002).

As análises estatísticas dos estudos com os equídeos de Vila de Jericoacoara foram feitas usando o software estatístico STATA, e o Software Excel versão 2013, onde os resultados clínicos e sorológicos dos equídeos foram comparados entre os animais infectados e não infectados pelo EIAV. Foram considerados positivos para alteração clínica os animais que apresentaram alguma alteração em qualquer coleta realizada no período do estudo. Parâmetros bioquímicos e hematológicos foram também comparados entre os animais positivos e negativos para a presença do vírus. O teste de rejeição de hipótese de nulidade será de 0,05 (probabilidade alfa de 5%).

5 RESULTADOS

Serão apresentados em separado os resultados para os animais das duas origens geográficas.

5.1 ANIMAIS DA FAZENDA PAULA RODRIGUES (FPR)

5.1.1 Ensaios imunológicos para diagnóstico de AIE

Foram coletadas amostras de sangue de 124 jumentos aleatoriamente selecionados dentre os animais de fazenda, em torno de 1000 animais. Destas amostras apenas uma amostra foi positiva no IDGA (0,81% - 1/124). No ELISA gp90, 27 foram positivas (22% - 27/124) e no ELISA p26, 13 amostras foram positivas (10,6% - 13/124). Houve uma concordância entre os três testes sorológicos em 90/124 das amostras testadas, que foram negativas nos três testes sorológicos. Apenas uma amostra foi positiva nos três testes. Das outras 33 amostras de soro, 6/33 foram positivos nos dois ELISAs (4,8% - 6/123) (Figura 12). Foi feita também a coleta de sangue de três cavalos da FPR que foram positivos em IDGA e ELISA p26, mas apenas dois (2/3) foram positivos em ELISA gp90.

5.1.2 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética

Das 124 amostras de asininos testadas foi amplificado o DNA de 312 bp por PCR empregando os iniciadores tat-gag. O DNA foi detectado em PBMCs de 11 jumentos (8,8% - 11/124) e em um dos três cavalos (33,3% - 1/3). Destas, foram obtidas seis sequências com identidade com outras sequências de EIAV disponíveis no *GenBank*. Cinco de asininos - CE-BR-J272-10AZ (MZ622019), CE-BR-J488-AM (MZ622020), CE-BR-J518-20AZ (MZ622021), CE-BR-J554-AZ (MZ622022), CE-BR-J821-49 (MZ622023), e uma de cavalo - CE-BR-C179 (MZ622018).

A análise filogenética mostrou que as seis sequências de EIAV do Ceará agruparam-se no clado das sequências brasileiras, juntamente com as sequências POCONE-BR-01 (MN560970) e POCONE-BR-02 (MN560971) (MALOSSI *et al.*, 2020). Neste mesmo clado são encontradas também as amostras de EIAV detectadas no Pantanal/Brasil por Cursino *et al.*, 2020. No entanto, a sequência do cavalo (MZ622018) está agrupada em um ramo diferenciando-se das outras

sequências brasileiras. Os clados do Japão, EUA, China e Irlanda e Itália estão bem definidos na árvore usando esta região do genoma tat-gag (Figura 13).

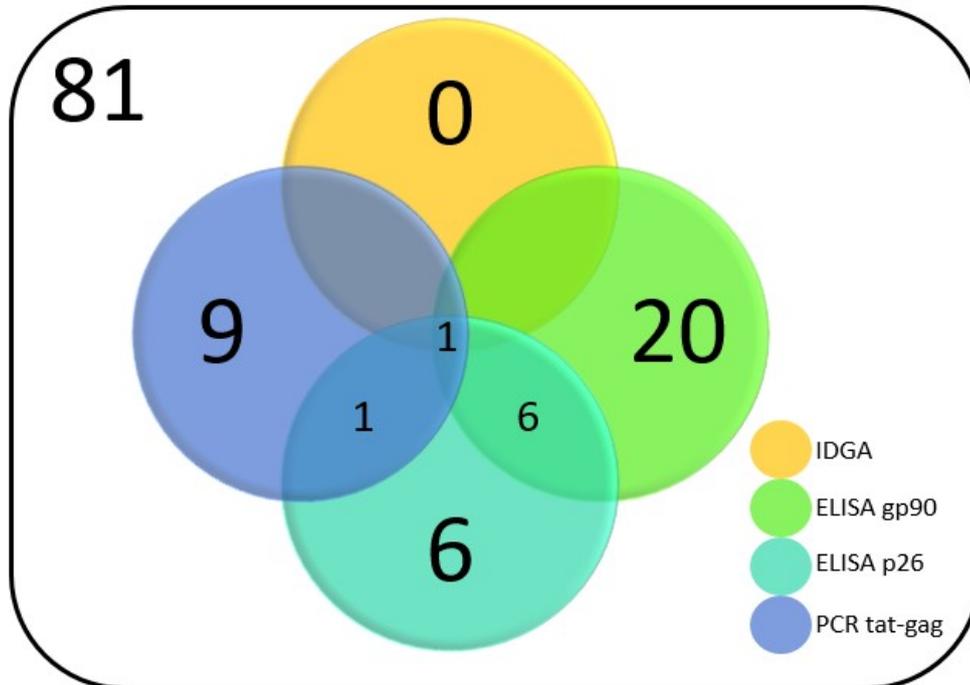


Figura 12. Testes diagnósticos para AIE dos asininos. Gráfico apresentando resultados dos testes imunológicos e moleculares - IDGA, ELISA gp90, ELISA p26 e PCR tat-gag das 124 amostras de asininos.

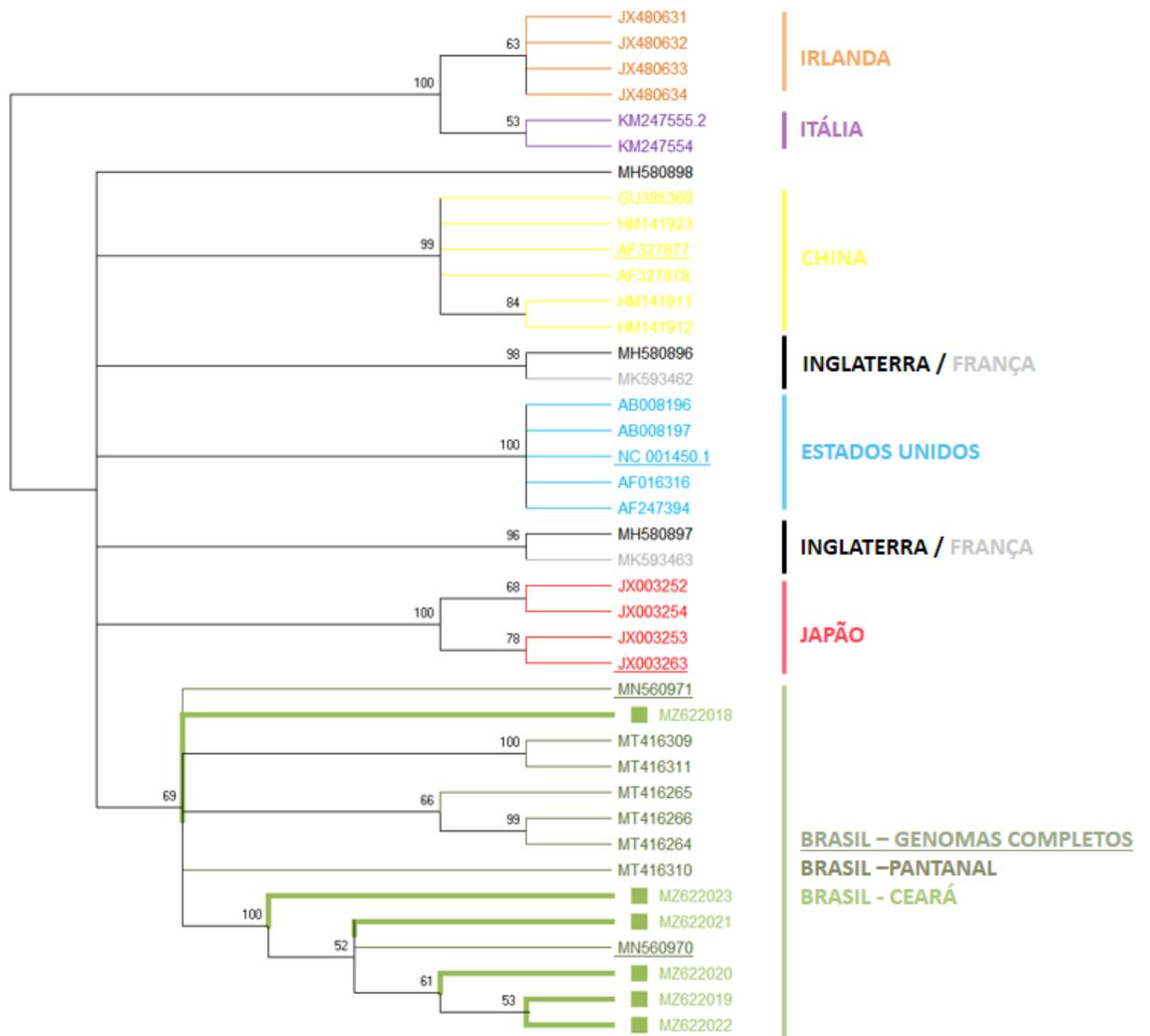


Figura 13. Análise filogenética das sequências de EIAV circulante na FPR com 34 sequências parciais da região *tat-gag*. A árvore filogenética foi inferida a partir da análise das seis sequências de nucleotídeos de equídeos da FPR no Ceará, com outras seis sequências do Pantanal brasileiro e mais 28 sequências do EIAV de todo o mundo. A identificação de cada sequência é o número de acesso do GenBank. Apenas valores de *bootstrap* acima de 50 são exibidos na árvore. A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a maior probabilidade de log (-2095,28) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada ao lado dos ramos. A(s) árvore(s) inicial(is) para a busca heurística foi(m) obtida(s) automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmico superior. Uma distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre sites (5 categorias (+G, parâmetro = 0,5806)). O modelo de variação de taxa permitiu que alguns sites fossem evolutivamente invariáveis ([+], 25,90% sites). Esta análise envolveu 40 sequências de nucleotídeos. Havia um total de 278 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

5.1.3 Avaliações clínicas

Foi feita a avaliação clínica dos animais utilizando o escore corporal (EC) de 102 dos 124 jumentos e apenas 32,4 % (33/102) dos animais apresentaram EC de bom a ótimo (3 a 4) e 67,6 % (69/102) dos animais apresentaram um EC ruim ou muito magro (0 a 2,5) (Tabela 2). Dentre os animais que apresentaram um EC 0 a 2,5, 29% (20/69) apresentou um dos testes sorológicos para detecção de AIE positivos. Já entre os animais que apresentaram um EC 3 a 4, 27,3% (9/33) apresentou um dos testes sorológicos para detecção de AIE positivos

Dos 124 asininos da FPR que foram estudados 66 animais (52% - 66/124) apresentavam sinais macroscopicamente evidentes de doença, como diarreia, lesões de pele, secreção nasal ou ocular, alopecia, edema, apatia, decúbito lateral, ataxia, alterações urogenitais e presença de ectoparasitas. Destes 66 foram avaliados 53 quanto ao EC, onde 30,2% (16/53) apresentaram EC de bom a ótimo (3 a 4) e 69,8% (37/53) apresentaram um EC ruim ou muito magro (0 a 2,5). Dos 66 estes animais 15 (22,7%) apresentaram um dos testes sorológicos para detecção de AIE positivos. É importante destacar que alguns animais apresentavam mais de um sinal, sendo as alterações macroscópicas as mais frequentes nesses a presença de secreções ocular e nasal e lesões cutâneas.

Ainda entre os animais que apresentaram sinais macroscópicos, dentre os animais que apresentaram um EC 0 a 2,5, 27% (10/37) apresentou um dos testes sorológicos para detecção de AIE positivos. Enquanto, entre os animais que apresentaram um EC 3 a 4, 18,8% (3/16) apresentou um dos testes sorológicos para detecção de AIE positivos.

Dentre as alterações macroscópicas, as mais evidentes nos asininos foram as secreções ocular e lesões cutâneas, em 27/124 e 28/124 animais, respectivamente. Em um grande número de animais foi observada alopecia (12/124), diarreia (10/124) e secreção nasal (9/124). Três animais apresentaram edema, três com apatia, um com ataxia, uma fêmea com alterações urogenitais e seis jumentos apresentaram infestações por ectoparasitas. Sete animais foram encontrados em estado de grande enfraquecimento, já se encontrando em decúbito lateral (Tabela 2).

Foi possível avaliar a mucosa ocular de 74/124 animais, sendo que desses 47,3% (35/74) apresentaram mucosas com coloração normocoradas (rosa clara), 50% (37/74) apresentaram mucosas hipocoradas e 2,7% (2/74) apresentaram mucosas hiperacoradas (Tabela 2). Dentre os 35 animais que apresentaram mucosa

normocoradas, 25,7% (9/35) foram positivos em um dos testes sorológicos, enquanto 24,3% (9/37) foram positivos entre os que apresentavam mucosas hipocoradas. Os dois animais que apresentaram mucosa hiperacoradas foram negativos em todos os testes.

Tabela 2. Avaliações clínicas dos asininos: escore corporal (EC) e coloração da mucosa ocular.

Sinais clínicos	Nº Animais	% (66/124)
Diarreia	10	8,1
Lesões cutâneas	27	21,8
Secreção nasal	9	7,3
Secreção ocular	28	22,6
Alopecia	12	9,7
Edema	3	2,4
Apatia	3	2,4
Decúbito lateral	7	5,6
Ataxia	1	0,8
Alterações urogenitais	1	0,8
Presença de ectoparasitas	6	4,8

EC	Nº Animais	% (102/124)
RUIM (0-2)	68	66,7
BOM/ÓTIMO (3-4)	34	33,3
GORDO (4,5-5)	0	0

Mucosa ocular	Nº Animais	% (74/124)
Hipocoradas	37	50,0
Normocoradas	35	47,3
Hiperacoradas	2	2,7

EC – escore corporal

5.1.4 Avaliação hematológica

Para avaliar o status hematológico da população de jumentos, foram quantificados hematócrito (Ht), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio de 20 animais (Tabela 3). Dentre estes animais com avaliação hematológica, 4/20 foram positivos em ELISA gp90 (20%), 2/20 positivos em ELISA p26 (10%) e o DNA proviral foi amplificado em 1/20 amostras. O Ht médio foi de 31,75 % ($\pm 8,2$), a PPT média de 6,5 g/dL ($\pm 1,6$) e o fibrinogênio médio de 290 g/dL (± 121).

Apenas 3/20 animais positivos em ELISA gp90 apresentaram alterações, três (J301-AM, J461-VD e J507-BR) animais apresentaram concentração de PPT com valores a baixo que os considerados normais e um asinino (J461-VD) exibindo Ht abaixo dos valores de referência da literatura, sendo importante destacar que na avaliação clínica também apresentou mucosas hipocoradas.

Os 4/20 animais que foram positivos no ELISA gp90, apresentaram valor médio de 31,5% de hematócrito, 6,2 mg/dL de proteína plasmática e 250 mg/dL de fibrinogênio. Os 2/20 animais positivos no ELISA p26 apresentaram valor médio de 35,5% de hematócrito, 9,3 mg/dL de proteína plasmática e 200 mg/dl de fibrinogênio. Nenhum dos 20 asininos nos quais foi feita a avaliação hematológica foi positivo em IDGA.

Com relação aos três cavalos presentes na FPR, apresentaram um valor médio de 36,6% de hematócrito, 7,4 mg/dL de proteína plasmática, 400 mg/dL de fibrinogênio. Nestes cavalos adicionalmente foi feita a contagem total de plaquetas e de leucócitos, que apresentaram valores médios de $94 \times 10^3 /\text{mm}^3$ e $10,5 \times 10^3 /\text{mm}^3$, respectivamente.

5.1.5 Acompanhamento clínico e laboratorial de um asinino naturalmente infectado pelo EIAV

Dos 124 asininos do estudo, apenas um animal foi positivo em IDGA (J.269), e deste animal foi possível realizar avaliações clínicas e coletas de amostras sanguíneas semanais, para acompanhar e descrever a evolução clínica e laboratorial de um jumento naturalmente infectado por EIAV.

O jumento (Figura 14), uma fêmea que vivia no abrigo, foi avaliado clinicamente semanalmente, por quatro semanas seguidas. Durante a primeira avaliação (dia 1), o animal apresentou diarreia, hemoconcentração, anemia microcítica normocrômica, neutrofilia e presença de linfócitos atípicos (Tabela 4). O EC estava na faixa normal de 2,5. No diagnóstico laboratorial para AIE foi positivo em IDGA (Figura 15), ELISA gp90, ELISA p26 e tat-gag PCR.

Tabela 3. Avaliações hematológicas e de diagnóstico de EIA dos 20 asininos selecionados da FPR

	IDENTIFICAÇÃO	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26	PCR tat-gag	Ht (%)	PPT g/dL	FIBRINOGENIO g/dL
1	J103-VM	N	P	N	N	34,00	7,40	400,00
2	J194-VD	N	P	N	N	41,00	6,60	200,00
3	J301-AM	N	P	N	N	27,00	5,60	200,00
4	J461-VD	N	P	N	N	24,00	5,20	200,00
5	J556-AZ	N	N	P	N	33,00	7,60	200,00
6	J574-BR	N	N	P	N	38,00	11,00	200,00
7	J507-BR	N	N	N	P	36,00	5,20	200,00
8	J062-AM	N	N	N	N	24,00	5,00	200,00
9	J105-AZ	N	N	N	N	32,00	8,00	400,00
10	J-107-AM	N	N	N	N	27,00	5,80	200,00
11	J121-Filhote	N	N	N	N	17,00	4,40	400,00
12	J158-AZ	N	N	N	N	23,00	6,60	600,00
13	J280-AZ	N	N	N	N	30,00	6,60	400,00
14	J284-112-AZ	N	N	N	N	33,00	7,40	400,00
15	J319-AM	N	N	N	N	24,00	5,40	400,00
16	J398-AM	N	N	N	N	35,00	5,20	200,00
17	J509-BR	N	N	N	N	40,00	6,20	200,00
18	J538-BR	N	N	N	N	36,00	6,40	400,00
19	J542-AZ	N	N	N	N	54,00	8,60	200,00
20	J596-VD	N	N	N	N	27,00	4,80	200,00
	Valor de Referência					27-42	6,0-8,0	100 – 400
	Média					31,75	6,50	290,00
	Desvio Padrão					8,23	1,57	120,96
	Média N					30,92	6,18	323,08
	Desvio Padrão N					9,34	1,27	130,09
	Média P					33,29	6,94	228,57
	Desvio Padrão P					5,99	2,05	75,59

* Negativos em todos os testes, incluindo PCR **Positivo em um ou mais testes, incluindo PCR;
N=Negativo; P=Positivo



Figura 14. Asinino com todos os testes de diagnóstico positivos. Asinino naturalmente infectado pelo EIAV, identificado durante estudo epidemiológico de 124 asininos da FPR e acompanhado por quatro semanas.

Na segunda avaliação clínica (dia 7), o jumento continuou apresentando diarreia, porém agora com mucosa hipocrômica. A avaliação laboratorial mostrou as mesmas alterações do dia 1, apresentando trombocitopenia adicional ($69 \times 10^3/\mu\text{L}$), monocitose e aumento na contagem de leucócitos. Todos os ensaios imunológicos feitos permaneceram positivos.



Figura 15. Fotografia de lâmina de IDGA. Lâmina de teste sorológico IDGA para AIE, nos três espaços para os soros teste foram preenchidos com soro do animal positivo de cada semana de

acompanhamento, sendo possível a observação das linhas de precipitação com linhas claras e curvas de identidade.

Na terceira avaliação (dia 14), o animal não apresentou diarreia, mas apresentou febre e edema torácico (Figura 16). Os dados laboratoriais mostraram, além dos descritos anteriormente, um aumento do fibrinogênio plasmático (800 g/dL), com baixa relação PP:F. No hemograma foi identificado leucocitose (15.724 células/ μ L), que aumentou em relação ao dia 7, além da presença de neutrófilos segmentados e eosinófilos e leucocitose com neutrofilia e desvio regenerativo à esquerda, e trombocitopenia (87×10^3 / μ L). Na avaliação do esfregaço sanguíneo em lâmina de microscopia foi observada a presença de linfócitos atípicos, monócitos ativados, alteração tóxica em neutrófilos (grânulos eosinofílicos) e macroplaquetas (Tabela 4). Os ensaios imunológicos para o diagnóstico de AIE permaneceram positivos.

Na última semana (dia 21), os sinais clínicos do animal evoluíram para secreção nasal, diarreia, febre e edema torácico, reduzindo o EC para 1,5. Nos ensaios hematológicos foi observado que o fibrinogênio permanecia aumentado (800 g/dL), com leucocitose (16.853 células/ μ L), neutrofilia e trombocitopenia (67×10^3 / μ L). No leucograma apresentou leucocitose neutrofílica, linfopenia e eosinopenia. Foi observada agregação plaquetária. Os ensaios imunológicos para AIE permaneceram positivos. Também foi feito PCR para amplificação do DNA proviral por PCR do EIAV, sendo positivo. O animal morreu no 26º dia após primeira avaliação.

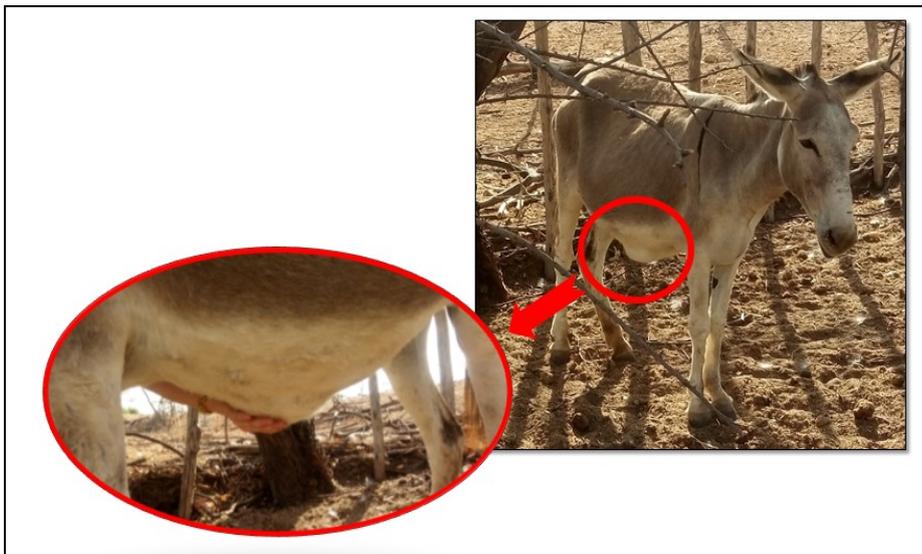


Figura 16. Asinino sintomático da FPR acompanhado por quatro semanas antes da morte aos 26 dias. Animal apresenta edema torácico conforme mostrado no detalhe da figura.

Tabela 4. Avaliações clínicas do asinino da FPR acompanhado por quatro semanas antes da morte aos 26 dias.

CARACTERÍSTICAS	DIAS DE EVOLUÇÃO				VR*
	1	7	14	21	
Escore Corporal (EC)	NA	2.5	2.0	1.5	-
Mucosa ocular	Normocoradas	Hipocoradas	Hipocoradas	Hipocoradas	-
Tugor de pele (seg)	NA	1.0	1.5	1.5	-
Tempo de preenchimento capilar (seg)	NA	1.5	1.5	1.5	(1.0 – 2.5)
Sinais Clínicos	Diarréia	Diarréia	Febre e Edema de tórax	Febre, Edema de tórax, diarréia e secreção nasal	-
Proteína Plasmática Total (mg/dL)	8.4	7.0	7.4	7.2	(6.0- 8.0)
Fibrinogênio (mg/dL)	200	400	800	800	(100-400)
Razão PP:F	41	16.5	8.25	8.0	-
Hematocrito (%)	38	35	35	37	(27-42)
Hemoglobina (g/dL)	12.7	11.6	11.6	12.3	(8.9 -14.7)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	9.0	8.3	8,3	8.8	(4.4- 7.1)
MCV (fl)	42	42.2	42	42	(53-67)
MCHC (%)	33.3	33.1	33.1	32.2	(31-37)
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	114	69	87	67	(95 -384)
Contagem total de leucócitos (células/ μL)	11.813	11.288	15.724	16.853	(6.200 -15.000)
Neutrófilos bastões mm³ (%)	0 (0)	113 (1)	314 (2)	0 (0)	-
Neutrófilos segmentados mm³ (%)	7.442 (63)	7224 (64)	10.612 (68)	13.819 (82)	(2.400- 6.300)
Eosinófilos mm³ (%)	354 (3)	339 (3)	943 (6)	0 (0)	(100 – 900)
Basófilos mm³ (%)	0 (0)	0 (0)	157 (1)	169 (1)	(0-700)
Monócitos mm³ (%)	709 (6)	1.242 (11)	943 (6)	674 (4)	(0-750)
Linfócitos mm³ (%)	3.308 (28)	2.370 (21)	2.673 (17)	2.022 (12)	(2.200 -9.600)
Morfologia celular	Linfócitos atípicos	Nenhuma alteração	Monócitos ativados, Neutrófilos com grânulos	Agregados plaquetários	-

	eosinofílicos e macroplaquetas				
IDGA	P	P	P	P	N
ELISA gp90	P	P	P	p	N
ELISA p26	P	P	P	P	N
PCR	P	P	P	P	N

NA – não avaliado, P- positivo, N – negativo, MCV – volume corpuscular médio, MCHC – concentração corpuscular média de hemoglobina. *VR=Valores de referência: Evans&Crane, 2018.

O DNA proviral amplificado foi sequenciado, e a sequência de nucleotídeos obtida BRA-CE-J269 (ASININO) foi alinhada e comparada com 23 sequências depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), dois genomas completos brasileiros POCONE-BRA1 e POCON-BRA2 (MN560970 e MN560971), três sequências de nucleotídeos já descritas anteriormente no Ceará, sendo uma em equino (CE-BR-C179/ MZ622018) e dois em asininos (CE-BR-J272-10AZ / MZ622019 e CE-BR-J488-AM / MZ622020), três sequências de nucleotídeos de genomas de isolados na China, Liaoning (AF327877.1), Vaccine (AF327878) e DLV18-8 (HM141923.1), quatro sequências de genomas de isolados dos Estados Unidos, WSUS (AF247394.1), V26 (AB008197.1), V70 (AB008196.1) e EIAVuk (AF016316.1), quatro sequências de genomas de isolados no Japão Miyazaki2011-A (JX003263.1), Miyazaki2011-5 (JX003252.1), Miyazaki2011-25 (JX003253.1) e Miyazaki2011-29 (JX003254.1), duas sequências de genomas parciais de isolados na Itália SA(KM247555.2) e DE(KM247554.1) e quatro sequências de genomas de isolados da Irlanda H3(JX480634.1), F2(JX480631.1), F3(JX480632.1) e F4(JX480633.1).

No alinhamento foram observadas regiões conservadas e variáveis nas sequências analisadas. Foram consideradas substituições de nucleotídeos apenas quando a troca de base foi exclusiva da sequência BRA-CE-J269 (ASININO). Foram observadas cinco substituições de nucleotídeos na sequência. O fragmento de 80 pb inicial apresentou apenas uma substituição de nucleotídeo, sendo uma transição na posição 31 no alinhamento (Figura 17). No fragmento das posições 91 a 160, foi observado uma transição na posição 104 (Figura 18), enquanto no fragmento das posições 161 a 240, foi observado uma transversão na posição 181 e uma transição na posição 215 (Figura 19). Na posição 269 a sequência BRA-CE-J269 (ASININO)

apresentou uma transversão dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV é comparada ou transição se comparada a sequência de cavalo do Ceará CE-BR-C179 (MZ622018.1) (Figura 20).

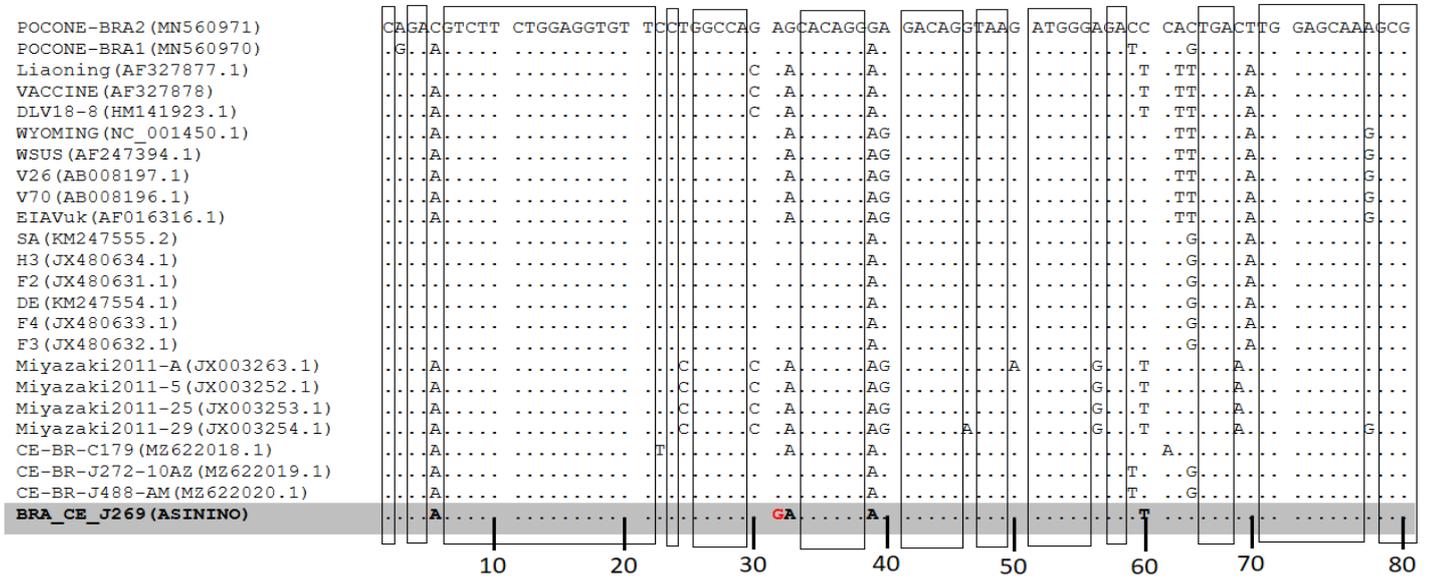


Figura 17. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de BRA-CE-J269, posição 1-80 do alinhamento. O alinhamento foi feito no programa MEGA X, utilizando o Clustal W (TAMURA; NEI, 1993). Regiões conservadas em todas as sequências estão identificadas por retângulos pretos, em destaque cinza a sequências de EIAV do BRA-CE-J269 (ASININO) e em vermelho as substituições de nucleotídeos observadas e o número de nucleotídeos da sequência estão identificados na base da figura.

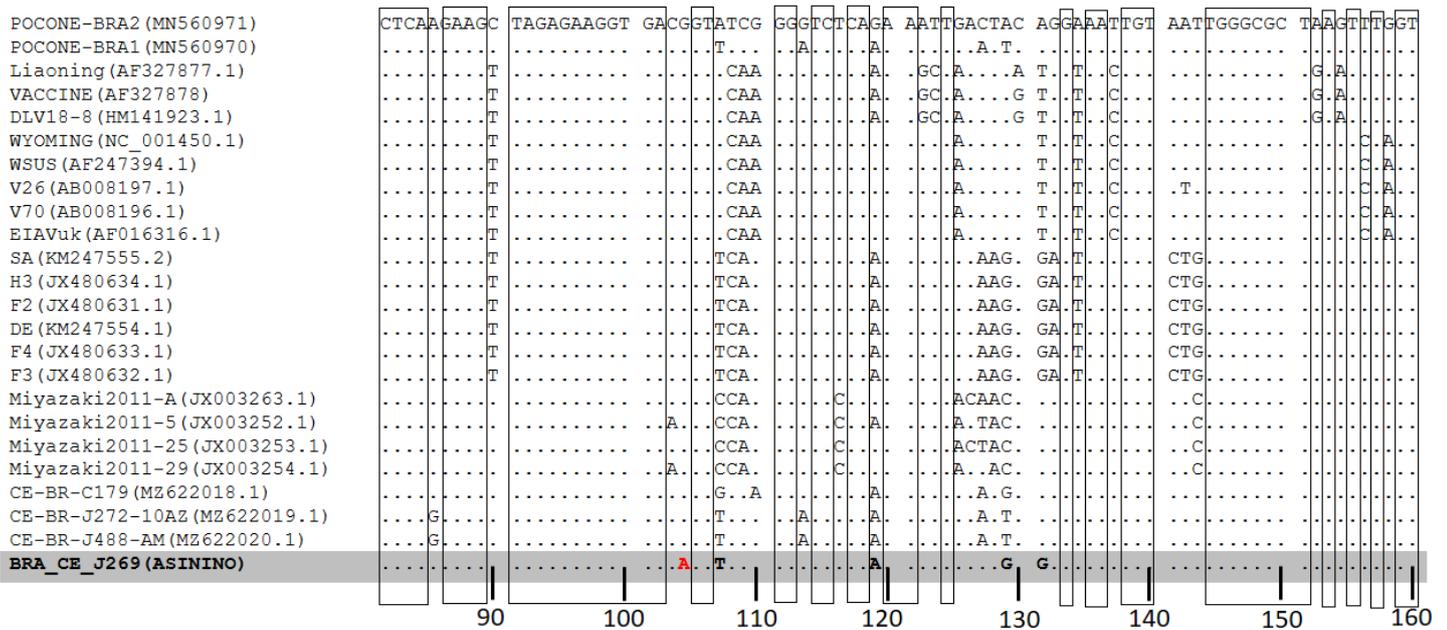


Figura 18. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de BRA-CE-J269,, posição 81-160 do alinhamento. O alinhamento foi feito no programa MEGA X, utilizando o Clustal W (TAMURA; NEI, 1993). Regiões conservadas em todas as sequências estão identificadas por retângulos pretos, em destaque cinza a sequências de EIAV do BRA-CE-J269 (ASININO) e em vermelho as substituições de

nucleotídeos observadas e o número de nucleotídeos da sequência estão identificados na base da figura.

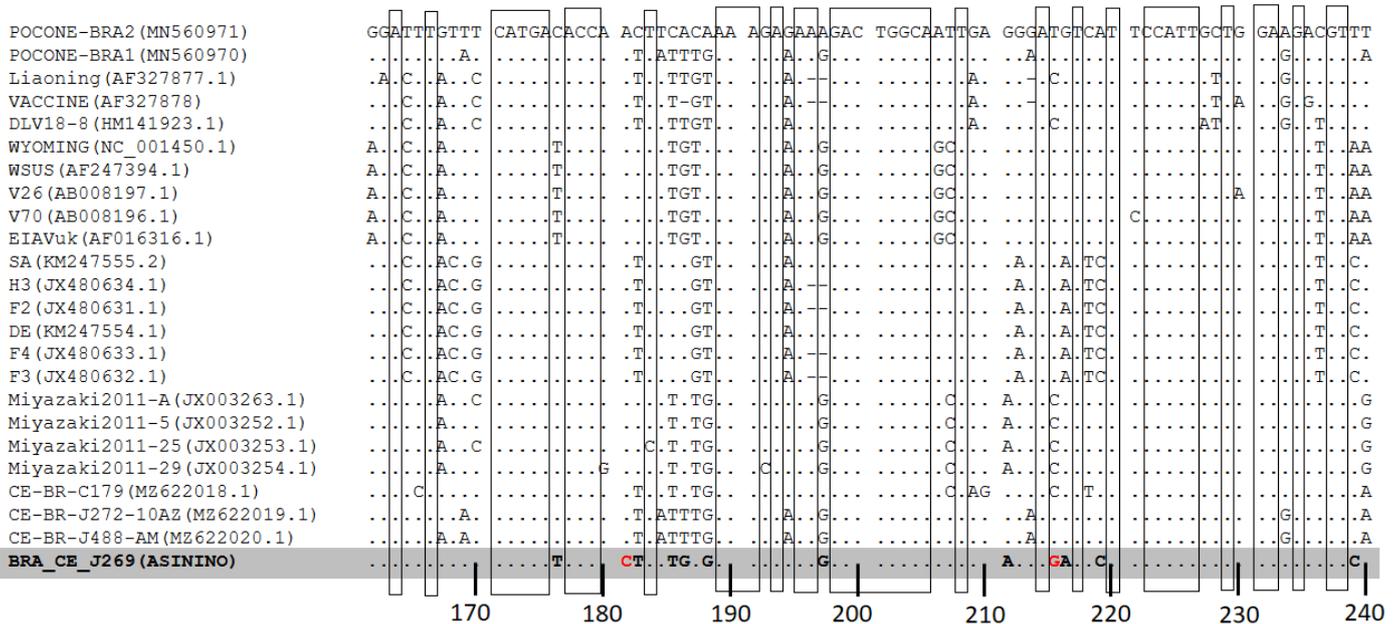


Figura 19. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de BRA-CE-J269,, posição 161-240 do alinhamento. O alinhamento foi feito no programa MEGA X, utilizando o Clustal W (TAMURA; NEI, 1993). Regiões conservadas em todas as seqüências estão identificadas por retângulos pretos, em destaque cinza a seqüências de EIAV do BRA-CE-J269 (ASININO) e em vermelho as substituições de nucleotídeos observadas e o número de nucleotídeos da seqüência estão identificados na base da figura.

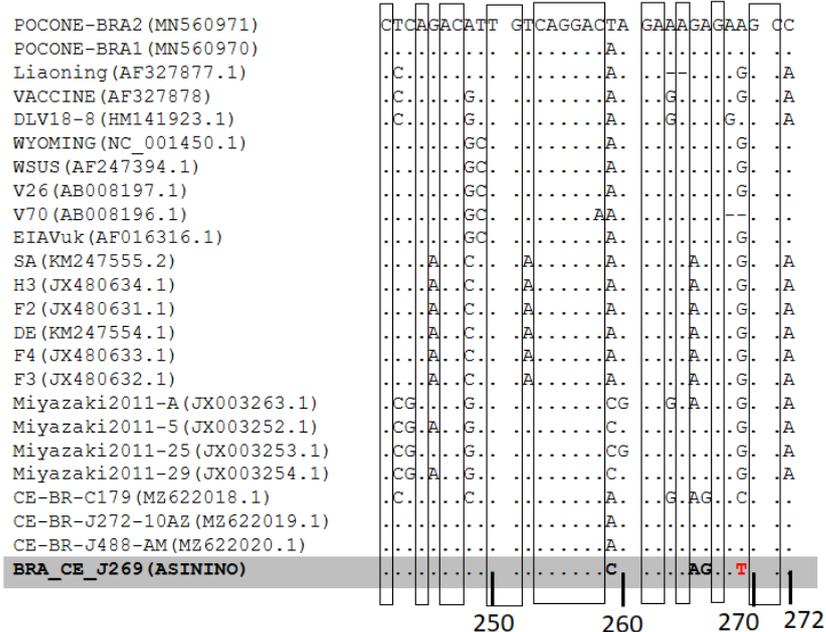


Figura 20. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de BRA-CE-J269,, posição 241-272 do alinhamento. O alinhamento foi feito no programa MEGA X, utilizando o Clustal W (TAMURA; NEI, 1993). Regiões conservadas em todas as seqüências estão identificadas por retângulos pretos, em destaque cinza a seqüências de EIAV do BRA-CE-J269 (ASININO) e em vermelho as substituições de nucleotídeos observadas e o número de nucleotídeos da seqüência estão identificados na base da figura.

Na análise da similaridade de nucleotídeos somente entre as sequências BRA-CE-J269 (ASININO) e as demais sequências de equídeos do Ceará foi observado que esta apresentava variação de 88,2% a 89,2%. Já a similaridade entre a sequência do BRA-CE-J269 (ASININO) e os genomas brasileiros foi 88,6% com POCONE-BRA1 (MN560970) e 90,6 % com POCONE-BRA2 (MN560971), sendo a de maior similaridade observada (Figura 21).

Na análise de similaridade de nucleotídeos entre a sequência de BRA-CE-J269 (ASININO) e as sequências de EIAV mundiais os valores foram variáveis. A sequência de BRA-CE-J269 (ASININO) apresentou similaridade de 80,2% com Liaoning, 79,7% com VACCINE, 79,8% com DLV18-8, 81% com Wyoming, WSUS e EIAVuk, 79,9% com V26 e V70, 83,1% com AS, H3, F2, DE, F4 e F3, 82,4% a 84,5% com Miyazaki 2011 – A, Miyazaki 2011 – 5, Miyazaki 2011 – 25 e Miyazaki 2011 – 29 (Figura 21).

A análise filogenética empregando as 24 sequências de nucleotídeos mostrou que as seis sequências brasileiras se agrupam em um mesmo clado, enquanto que dentro deste clado, a sequência do jumento BRA-CE-J269 (ASININO) agrupa apenas com o genoma POCONE-BRA2. As seis sequências Brasil / Ceará agrupam próximas do clado da sequência do Japão – Miyazaki, com um valor de *bootstrap* de 59. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DLV18-8), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Japão (Miyazaki 2011 – A, Miyazaki 2011 – 5, Miyazaki 2011 – 25 e Miyazaki 2011 – 29), Irlanda (H3, F4, F3, F2) junto com três sequências da Itália (SA, DE, Ita1), formam quatro cladogramas separados, com elevados valores de *bootstrap* (Figura 22).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 BRA_CE_J269(ASININO)																							
2 POCONE-BRA2(MN560971)	90,6																						
3 POCONE-BRA1(MN560970)	88,6	91,8																					
4 Liaoning(AF327877.1)	80,2	84,0	82,2																				
5 VACCINE(AF327878)	79,7	83,0	82,2	97,3																			
6 DLV18-8(HM141923.1)	79,8	82,6	81,8	97,7	98,1																		
7 WYOMING(NC_001450.1)	81,0	86,0	83,5	86,1	87,0	87,5																	
8 WSUS(AF247394.1)	81,0	86,0	83,5	86,1	87,0	87,5	100,0																
9 V26(AB008197.1)	79,9	85,0	82,4	85,1	87,0	86,5	99,2	99,2															
10 V70(AB008196.1)	79,9	85,1	82,4	85,1	86,1	86,5	99,2	99,2	98,5														
11 EIAVuk(AF016316.1)	81,0	86,0	83,5	86,1	87,0	87,5	100,0	100,0	99,2	99,2													
12 SA(KM247555.2)	83,1	83,6	83,1	81,8	81,2	81,7	80,5	80,5	80,6	79,4	80,5												
13 H3(JX480634.1)	83,1	83,6	83,1	81,8	81,2	81,7	80,5	80,5	80,6	79,4	80,5	100,0											
14 F2(JX480631.1)	83,1	83,6	83,1	81,8	81,2	81,7	80,5	80,5	80,6	79,4	80,5	100,0	100,0										
15 DE(KM247554.1)	83,1	83,6	83,1	81,8	81,2	81,7	80,5	80,5	80,6	79,4	80,5	100,0	100,0	100,0									
16 F4(JX480633.1)	83,1	83,6	83,1	81,8	81,2	81,7	80,5	80,5	80,6	79,4	80,5	100,0	100,0	100,0	100,0								
17 F3(JX480632.1)	83,1	83,6	83,1	81,8	81,2	81,7	80,5	80,5	80,6	79,4	80,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0							
18 Miyazaki2011-A(JX003263.1)	83,4	84,5	82,6	80,2	80,3	80,8	80,9	80,9	79,8	79,9	80,9	77,5	77,5	77,5	77,5	77,5	77,5						
19 Miyazaki2011-5(JX003252.1)	84,5	85,5	84,0	81,3	81,4	81,9	82,0	82,0	80,9	81,0	82,0	78,5	78,5	78,5	78,5	78,5	78,5	96,5					
20 Miyazaki2011-25(JX003253.1)	83,1	85,0	82,6	80,8	80,9	81,4	81,6	81,6	80,5	80,5	81,6	76,4	76,4	76,4	76,4	76,4	76,4	98,5	97,3				
21 Miyazaki2011-29(JX003254.1)	82,4	84,4	81,4	79,1	79,2	79,8	81,9	81,9	80,8	80,9	81,9	75,7	75,7	75,7	75,7	75,7	75,7	95,2	97,7	95,7			
22 CE-BR-C179(MZ622018.1)	89,2	89,3	90,1	81,9	81,5	82,0	82,7	82,7	81,7	81,7	82,7	81,2	81,2	81,2	81,2	81,2	81,2	84,9	85,3	83,9	82,8		
23 CE-BR-J272-10AZ(MZ622019.1)	88,6	91,8	99,2	82,2	82,2	81,8	83,5	83,5	82,4	82,4	83,5	83,1	83,1	83,1	83,1	83,1	83,1	82,6	84,0	82,6	81,4	90,1	
24 CE-BR-J488-AM(MZ622020.1)	88,2	91,4	98,9	82,7	82,7	82,3	84,0	84,0	82,9	82,9	84,0	83,6	83,6	83,6	83,6	83,6	83,6	83,1	84,5	83,1	81,9	89,7	99,6

Figura 21. Similaridade de nucleotídeos entre a sequência de BRA-CE-J269 (ASININO) e 23 sequências de EIAV depositadas no Genbank*. *Estimativa da similaridade de nucleotídeos entre 24 sequências de nucleotídeos de 272 pb do EIAV: 1 sequências de nucleotídeos de EIAV de equídeos do Ceará e outras sequências mundiais já publicadas, entre elas POCONE-BRA1, POCONE-BRA2 (MN560970 e MN560971) dois genomas completos brasileiros e três sequências de nucleotídeos já descritas anteriormente no Ceará, sendo uma em equino (CE-BR-C179/ MZ622018) e dois em asininos (CE-BR-J272-10AZ / MZ622019 e CE-BR-J488-AM / MZ622020). Ainda, sequências de genomas de isolados na China, nos Estados Unidos, no Japão, na Irlanda e sequências retiradas de genomas parciais de isolados na Itália.

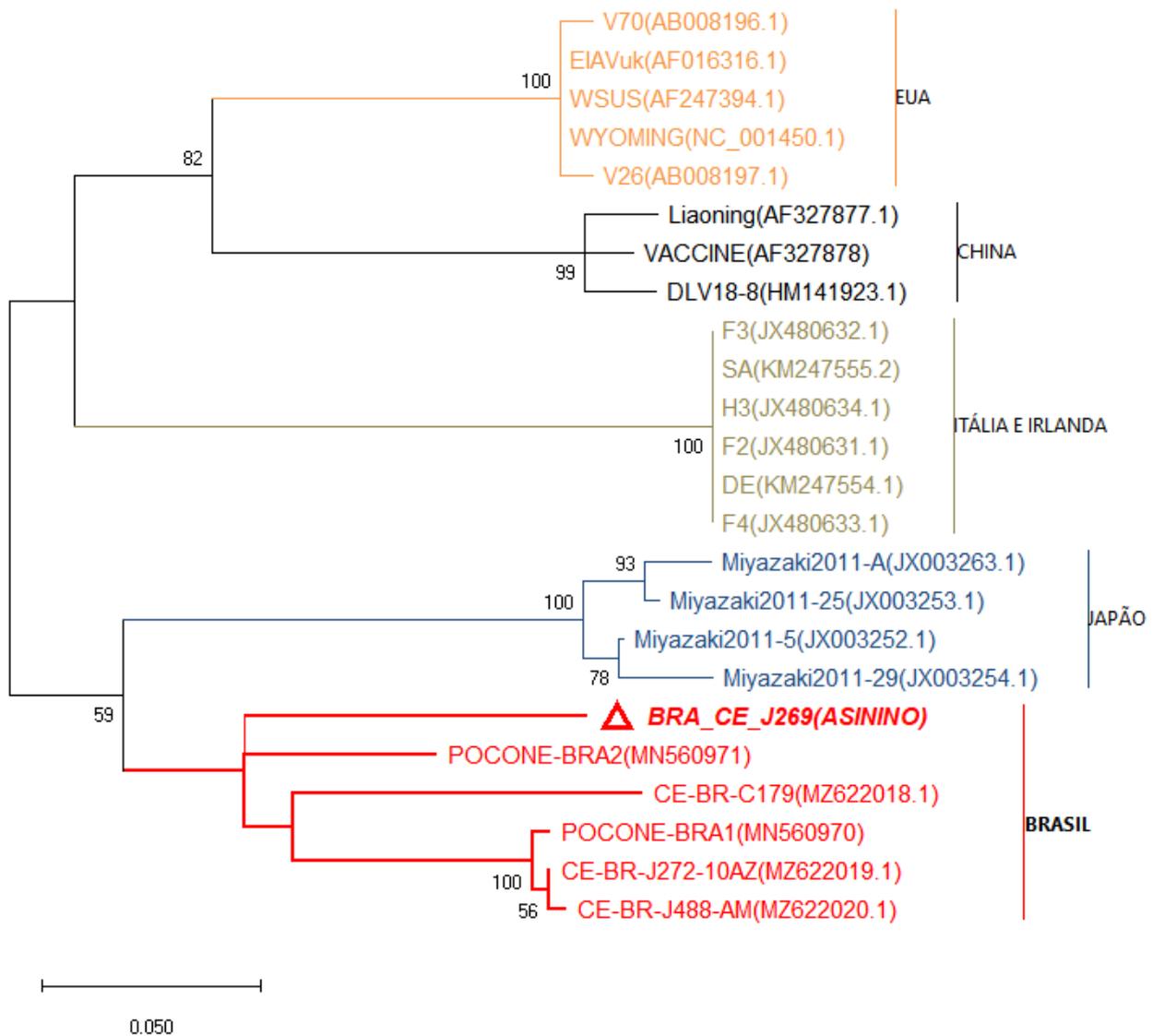


Figura 22. Análise filogenética da sequência de nucleotídeos de BRA-CE-J269 (ASININO) e 23 sequências de EIAV depositadas no Genbank. Análise filogenética baseada em 24 sequências de nucleotídeos do EIAV, 4 sequências de nucleotídeos obtidas a partir do DNA proviral de equídeos do Ceará, BRA_CE_J269 (ASININO), CE-BR-C179, CE-BR-J-272-10AZ, CE-BR-J488-AM, 2 sequências de genomas completos brasileiros, POCONE-BRA1, POCONE-BRA2. E 18 sequências mundiais: H3, F4, F3, F2, SA, DE Liaoning, Vaccine, DLV18-8, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, Miyazaki 2011 – A, Miyazaki 2011 – 5, Miyazaki 2011 – 25 e Miyazaki 2011 – 29. Os cinco clados na árvore estão destacados por cores: sequências brasileiras em vermelho, da China em preto, dos Estados Unidos em laranja, da Irlanda e Itália em cinza, e do Japão em azul. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a probabilidade de log mais alta (-1284,74) é mostrada. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,4577)). O modelo de taxa de variação permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 6,05% sítios). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificação medidos no número de substituições por site. Esta análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1st+2nd+3rd+Noncoding. Havia um total de 272 posições no conjunto de dados final.

5.2 ANIMAIS DO PARQUE NACIONAL DE JERICOACOARA

5.2.1 Análises imunológicas para AIE

Os resultados das avaliações do estado imunológico dos equídeos de Jericoacoara para AIE, mostraram que dentre os soros de 112 equídeos (104 cavalos e 8 muares) 11,6% (13/112) foram positivos no IDGA (12 cavalos e 1 luar), 25,9% (29/112) no ELISA p26 (24 cavalos e 5 muares), 1,8% (2/112) indeterminados e no ELISA gp90 36,6% (41/112) dos animais (38 cavalos e 3 muares) foram positivos, 7,1% (8/112) indeterminados. Todos os 13 animais positivos em IDGA também foram positivos em ELISA p26 e ELISA gp90. Além disso, 7 animais foram positivos em ELISA p26 e ELISA gp90, mas negativos em IDGA (tabela 5).

Tabela 5. Testes imunológicos para AIE dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

Resultados	Testes Imunológicos		
	IDGA	ELISA p26	ELISA gp90
+	13 (11,6%)	29 (25,9%)	41 (36,6%)
-	99 (88,4%)	81 (72,5%)	63 (56,3%)
INDETERMINADOS	0 (0%)	2 (1,6%)	8 (7,1%)

+ Positivos, - Negativos

5.2.2 Avaliações clínicas

Dos animais estudados 95% (106/112) eram machos. A avaliação clínica completa foi feita em 102/112 dos cavalos estudados na Vila de Jericoacoara. Esta avaliação clínica mostra que os animais apresentaram uma boa condição corporal com peso médio de $319,3 \pm 54,2$ kg e EC de moderado a bom ($2,5 \pm 0,68$). Também foi possível estimar valores médios de frequência cardíaca = $40,6 \pm 8$ bmp, frequência respiratória = $24 \pm 8,58$ mpm e temperatura retal $37,5 \pm 0,5$ °C.

Foi feita uma análise comparativa da população de animais não infectados (negativos em todos os testes diagnósticos sorológicos) com a população de animais infectados por EIAV (positivos nos três testes diagnósticos sorológicos). Na população negativa, de 52 animais, foi possível fazer a avaliação clínica completa de 46 animais. Esta avaliação mostrou que os animais tinham uma condição corporal com peso médio de $317,4 \pm 14,6$ kg com EC médio de $2,5 \pm 0,17$, frequência cardíaca média

= $41 \pm 2,6$ bmp, respiração média frequência = $26,4 \pm 2,36$ mpm e temperatura retal média $37,5 \pm 0,14$ °C.

Na população positiva, foi possível fazer uma avaliação clínica completa de todos os 13 animais, que apresentaram peso médio de $307,5 \pm 18,4$ kg com EC médio de $2,15 \pm 0,36$, frequência cardíaca média = $38,77 \pm 3,6$ bpm, frequência respiratória média = $24 \pm 3,3$ mpm e temperatura retal média $37,6 \pm 0,21$ °C. Todos os valores médios são apresentados na tabela 6. Não foram observadas associações entre alterações nos parâmetros da avaliação clínica e a presença da infecção por EIAV.

Tabela 6. Parâmetros de avaliação clínica dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

Avaliação Clínica					
População total (n=102)					
Valores de referência	Frequência Cardíaca	Frequência Respiratória	Temperatura Retal	Peso	ECC**
	32 – 44 bpm	8 - 20 mpm	37,2 - 38,5 °C	311 – 350 Kg	0 - 5
Média	40,65	24,07	37,52	319,27	2,54
Desv. Padrão	8,04	8,58	0,49	54,24	0,68
Interv. Confiança	1,55	1,65	0,10	10,53	0,13
Valor Máximo	69,00	48,00	38,90	461,00	4,00
Valor Mínimo	21,00	2,00	36,20	200,00	1,00
População Positivos (n=13)					
Média	38,77	24,00	37,60	307,54	2,15
Desv. Padrão	6,64	6,01	0,49	33,89	0,66
Interv. Confiança	3,61	3,27	0,21	18,43	0,36
Valor Máximo	50,00	38,00	38,40	368,00	3,00
Valor Mínimo	30,00	15,00	36,80	250,00	1,00
População Negativos (n=52)					
Média	40,98	26,39	37,50	317,40	2,49
Desv. Padrão	9,25	8,15	0,49	51,63	0,58
Interv. Confiança	2,64	2,36	0,14	14,60	0,17
Valor Máximo	69,00	48,00	38,90	450,00	4,00
Valor Mínimo	25,00	12,00	36,50	205,00	1,00
p-value*	0,4248	0,3303	0,4599	0,5185	0,0745

* Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias das populações de animais infectados / positivos e não infectados / negativos ** ECC- Escore corporal: 0 animal muito magro, 1 magro, 2 moderado, 3 bom, 4 gordo e 5 muito gordo

5.2.3 Avaliação hematológica

Foi feito hemograma completo dos 112 equídeos do estudo, e traçado um perfil hematológico dos animais avaliados, onde os valores médios da população total, dos

animais positivos nos testes sorológicos para AIE (IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26) e os negativos em todos os testes de diagnóstico estão demonstrados nas Tabelas 7, 8 e 9.

As médias apresentaram-se bem pareadas, entre a população infectada e a população não infectada, e não foram observadas associações entre alterações nos valores a presença de infecção pelo EIAV. Com isso, a população total apresentou como valores médios da série vermelha do sangue (eritrograma), $7,58 \pm 1,16 \times 10^6$ células/ μL de hemácias, hematócrito de $31,79 \pm 4,82 \%$ e hemoglobina de $10,59 \pm 1,61 \text{ g/dL}$. Nos cavalos positivos, não foram observadas grandes alterações nos valores hematológicos médios (hemácias $7,74 \pm 1,36 \times 10^6$ células/ μL , hematócrito $32,54 \pm 5,68\%$ e hemoglobina $10,84 \pm 1,90 \text{ g/dL}$), mas alguns animais apresentaram alterações importantes, baixas concentrações de hemácias em 3 animais, hematócrito em 6 e hemoglobina em 8 cavalos, dos quais 3 apresentaram baixas concentrações nos três parâmetros simultaneamente caracterizando anemia. Em relação aos animais não infectados, os valores médios foram de hemácias $7,59 \pm 1,02 \times 10^6$ células/ μL , hematócrito $31,79 \pm 4,22 \%$ e hemoglobina $10,59 \pm 1,41 \text{ g/dL}$ (Tabela 7). Destes animais 28 animais apresentaram baixas concentrações de hemoglobina, 17 em eritrócitos e 22 em hematócrito e 17 apresentaram baixas concentrações nos três parâmetros que caracterizam simultaneamente a anemia.

Na avaliação hematológica, também foram calculados os valores médios da série branca das células sanguíneas (leucograma), onde foi observada para a população total uma média de $10.144,25 \pm 2.603,61$ leucócitos/ μL , com $5.277,21 \pm 1.902,72$ neutrófilos/ μL , $726,08 \pm 563,19$ eosinófilos / μL de, $32,61 \pm 59,24$ basófilos/ μL de basófilos, $3.555,81 \pm 1.408,56$ linfócitos / μL e $387,13 \pm 272,71$ monócitos/ μL de monócitos, conforme mostrado na tabela 8. Enquanto as médias da população de animais positivos nos três testes sorológicos ($n=13$) foram $10.225,42 \pm 2.993,31$ leucócitos/ μL de leucócitos, com $5.256,66 \pm 2.175,18$ neutrófilos/ μL , $741,00 \pm 447,90$ eosinófilos/ μL , $29,76 \pm 45,97$ basófilos / μL , $3.475,88 \pm 1.067,14$ linfócitos/ μL e $367,79 \pm 246,58$ monócitos / μL . A média da população de equídeos que testaram negativo nos três testes sorológicos ($n=52$) foi de $9.884,08 \pm 2.77,58$ leucócitos/ μL , com $5.295,14 \pm 2.178,66$ neutrófilos/ μL , $687,63 \pm 602,46$ eosinófilos/ μL , $25,82 \pm 51,32$ basófilos/ μL , $3.390,78 \pm 1.374,71$ linfócitos/ μL e $380,94 \pm 245,23$ monócitos / μL

Tabela 7. Eritrograma dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

Eritrograma			
População total (n=112)			
Valores de Referência	Hemácias (X 10⁶ céls/μL)	Volume Globular (%)	Hemoglobina (g/dL)
	7,0 – 13,0	32 - 52	11 - 19
Média	7,58	31,79	10,59
Desv. Padrão	1,16	4,82	1,61
Interv. Confiança	0,21	0,89	0,30
Valor Máximo	11,40	48,00	16,00
Valor Mínimo	5,00	21,00	7,00
População Positivos (n=13)			
Média	7,74	32,54	10,84
Desv. Padrão	1,36	5,68	1,90
Interv. Confiança	0,74	3,09	1,03
Valor Máximo	10,50	44,00	14,70
Valor Mínimo	5,70	24,00	8,00
População Negativos (n=52)			
Média	7,59	31,79	10,59
Desv. Padrão	1,02	4,22	1,41
Interv. Confiança	0,28	1,15	0,38
Valor Máximo	9,50	40,00	13,30
Valor Mínimo	5,70	24,00	8,00
p-value*	0,6596	0,5956	0,5966

* Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias das populações de animais infectados / positivos e não infectados / negativos.

Considerando as avaliações individual dos animais, foi observado que 11 animais não infectados apresentavam leucocitose enquanto na população de animais infectados, 2 animais apresentavam leucocitose. Mas analisando os valores médios, ficou claro que não foram observadas alterações significativas dos valores médios entre as populações infectadas e não infectadas pelo EIAV.

Ainda nas avaliações hematológicas, foi estimada a contagem total de plaquetas de todos os animais. Os animais apresentaram valor médio de $126,01 \pm 37,67 \times 10^3$ plaquetas/ μ L. Separando a população em positivos e negativos, as médias permaneceram bem pareadas entre as populações ($118,69 \pm 27,83 \times 10^3$ plaquetas/ μ L para a população nos animais positivos e $127,48 \pm 36,19 \times 10^3$ plaquetas/ μ L nos animais negativos). Não foram observadas alterações significativas nos valores associados à infecção por EIAV, conforme Tabela 9.

Tabela 8. Leucograma dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

População total (n=112)						
	Leucócitos totais	Neutrófilos Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
VR (célis/ μ l)	6.000 – 12.500	2.700 – 7.000	100 – 1.000	0 - 290	1.500 – 6.000	100 – 1.000
Média	10.144,25	5.277,21	726,08	32,61	3.555,81	387,13
Desv. Padrão	2.603,61	1.902,72	563,19	59,24	1.408,56	272,71
Interv. Confiança	482,19	352,38	104,30	10,97	260,86	50,50
Valor Máximo	17.640,00	11.536,00	3.087,00	361,00	7.644,00	1.422,00
Valor Mínimo	3.143,00	2.150,00	0,00	0,00	807,98	0,00
População Positivos (n=13)						
Média	10.225,42	5.256,66	741,00	29,76	3.475,88	367,79
Desv. Padrão	2.993,31	2.175,18	447,90	45,97	1.067,14	246,58
Interv. Confiança	1.627,15	1.182,42	243,48	24,99	580,09	134,04
Valor Máximo	17.640,00	10.055,00	1.587,60	111,30	5.468,00	890,40
Valor Mínimo	6.300,00	2.961,00	0,00	0,00	1.134,00	78,75
População Negativos (n=52)						
Média	9.884,08	5.295,14	687,63	25,82	3.390,78	380,94
Desv. Padrão	2.772,58	2.178,66	602,46	51,32	1.374,71	245,23
Interv. Confiança	753,58	592,16	163,75	13,95	373,64	66,65
Valor Máximo	17.377,50	11.536,00	3.087,00	221,00	6.489,76	1.422,00
Valor Mínimo	3.143,00	2.150,00	0,00	0,00	807,98	57,23
p-value*	0,6972	0,9547	0,7675	0,8016	0,8362	0,8634

VR= Valores de referência; * Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias das populações de animais infectados / positivos e não infectados / negativos.

Tabela 9. Contagem total de plaquetas dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

Plaquetas (x 10 ³)					
População total (n=112)		População Positivos (n=13)		População Negativos (n=52)	
Média	126,01	Média	118,69	Média	127,48
Desv. Padrão	37,67	Desv. Padrão	27,83	Desv. Padrão	36,19
Interv. Confiança	6,98	Interv. Confiança	15,13	Interv. Confiança	9,84
Valor Máximo	246,00	Valor Máximo	187,00	Valor Máximo	243,00
Valor Mínimo	65,00	Valor Mínimo	80,00	Valor Mínimo	72,00
p-value* 0,4178					

* Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias das populações de animais infectados / positivos e não infectados / negativos. Valor de referência (X 10³ / μ L): 90 – 350.

Ainda das avaliações hematológicas, foi realizada a bioquímica sérica dos 112 equídeos e foram calculados os valores médios das reações de animais positivos e negativos para AIE (Tabela 10). As médias não apresentaram diferenças significativas, com exceção dos valores de GGT, pois a média dos animais positivos

apresentou valores elevados e as análises estatísticas confirmaram existir associação entre alteração nos níveis GGT e a presença da infecção por EIAV.

Na análise das enzimas hepáticas, os valores médios observados na população total foram ALT $12,87 \pm 1,15$ U/L, AST $311,61 \pm 10,98$ U/L, GGT $48,17 \pm 12,99$ U/L, ALP $342,73 \pm 30,49$ U/L e CK $529,05 \pm 37,63$ U/L. Entre os animais positivos nos três testes diagnósticos para AIE, as concentrações médias foram ALT $14,12 \pm 4,26$ U/L, AST $300,12 \pm 22,33$ U/L, GGT $74,35 \pm 39,15$ U/L, ALP $381,51 \pm 71,40$ U/L e CK $521,26 \pm 112,12$ U/L. Enquanto na população de animais negativos as concentrações médias foram ALT $13,47 \pm 1,72$ U/L, AST $320,41 \pm 16,57$ U/L, GGT $31,87 \pm 9,21$ U/L, ALP $309,26 \pm 37,01$ U/L e CK $541,61 \pm 51,12$ U/L (Tabela 10).

Também foram calculados os valores médios das enzimas hepáticas e renais dos grupos separados: animais positivos apenas em ELISA gp90, animais positivos apenas em ELISA p26 e animais positivos apenas nos dois ELISAS, tais análises confirmaram as associações estatísticas entre elevados valores de GGT e a presença da infecção por EIAV. Essas análises demonstraram também associações estatísticas entre os valores de fosfatase alcalina (FA) e a presença da infecção por EIAV, mas essa associação não foi observada quando são somados às análises os animais positivos também em IDGA (Tabela 10).

No perfil bioquímico das enzimas renais da população, foram observadas concentrações médias de ureia de $48,54 \pm 3,42$ mg/dL e de creatinina $1,92 \pm 0,10$ mg/dL. Entre os animais positivos em todos os testes diagnósticos para AIE, as concentrações médias foram de ureia $53,23 \pm 10,06$ mg/dL e creatinina $1,86 \pm 0,30$ mg/dL, enquanto na população de animais negativos ureia $47,07 \pm 5,35$ mg/dL e creatinina $1,92 \pm 0,14$ mg/dL.

Dos resultados de proteínas séricas totais, albuminas, globulinas e fibrinogênio, os valores médios permaneceram bem semelhantes entre a população de animais positivos e a população negativa, e não foram observadas associações de alterações nos valores e a presença de AIE, conforme demonstrado na Tabela 11.

Dos animais 25/112 animais apresentaram baixas concentrações de albumina, apenas dois animais foram positivos. Enquanto 17/112 apresentaram altas concentrações de albumina, e neste grupo cinco animais foram positivos nos três testes diagnósticos. Em 99/112 (88,4%) os cavalos apresentavam altas concentrações de globulinas. Ainda, toda a população apresentou baixa relação albumina/globulina.

Tabela 10. Enzimas hepáticas e marcadores renais dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

Bioquímica Sérica							
População total (n=112)							
	Alanina aminotransferase ALT (U/L)	Aspartato aminotransferase AST (U/L)	Creatina quinase CK (U/L)	Fosfatase alcalina FA (U/L)	Gama-glutamil transferase GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
VR	3 – 23	226 – 366	0 – 500	143 – 395	14 – 62	1,2 – 1,9	21,4 – 51,5
Média	12,87	314,42	529,05	342,73	48,17	1,92	48,54
Desv. Padrão	6,20	59,26	203,21	164,65	70,15	0,52	18,45
Interv. Confiança	1,15	10,98	37,63	30,49	12,99	0,10	3,42
Valor Máximo	40,00	421,00	1155,00	1079,50	485,50	3,97	103,50
Valor Mínimo	3,00	158,50	193,00	22,00	9,00	1,04	5,50
População Positivos (n=13)							
Média	14,12	300,12	524,92	381,51	74,35	1,86	53,23
Desv. Padrão	7,83	41,07	224,65	131,35	72,01	0,56	18,51
Interv. Confiança	4,26	22,33	122,12	71,40	39,15	0,30	10,06
Valor Máximo	34,00	380,00	931,00	605,50	288,50	2,82	92,50
Valor Mínimo	5,00	229,00	241,00	180,00	13,00	1,05	21,00
População Negativos (n=52)							
Média	13,47	320,41	541,61	309,26	31,87	1,92	47,07
Desv. Padrão	6,35	60,95	188,07	136,16	33,88	0,51	19,70
Interv. Confiança	1,72	16,57	51,12	37,01	9,21	0,14	5,35
Valor Máximo	40,00	421,00	1.155,00	742,00	257,00	3,97	103,50
Valor Mínimo	3,00	158,50	256,00	22,00	9,00	1,20	5,50
<i>p-value*</i>	0,7539	0,2610	0,7844	0,0899	0,0027	0,7110	0,3117
População Positivos apenas ELISA gp 90 (n=41)							
Média	13,54	308,72	488,16	381,65	73,93	1,91	49,77
Desv. Padrão	6,37	55,64	202,84	197,42	103,64	0,56	16,45
Interv. Confiança	1,95	17,03	62,09	60,43	31,72	0,17	5,04
Valor Máximo	34,00	408,00	931,00	1079,50	485,50	3,48	92,50
Valor Mínimo	5,00	164,00	193,00	144,50	11,00	1,05	21,00

p-value**	0,9581	0,3427	0,1920	0,0395	0,0072	0,9286	0,4827
População Positivos apenas ELISA p26 (n=29)							
Média	12,48	316,22	555,60	400,13	75,50	1,97	51,07
Desv. Padrão	6,25	54,87	234,43	181,24	94,71	0,58	18,69
Interv. Confiança	2,27	19,97	85,32	65,96	34,47	0,21	6,80
Valor Máximo	34,00	408,00	1027,00	1079,50	485,50	3,48	92,50
Valor Mínimo	5,00	190,50	193,00	144,50	13,00	1,05	21,00
p-value**	0,5007	0,7596	0,7699	0,0127	0,0035	0,6883	0,3751
População Positivos em ELISA gp 90 e ELISA p26 (n=20)							
Média	13,48	309,30	482,88	399,81	89,88	1,91	52,40
Desv. Padrão	6,79	53,08	214,73	199,44	110,36	0,62	17,56
Interv. Confiança	2,98	23,26	94,11	87,41	48,37	0,27	7,70
Valor Máximo	34,00	408,00	931,00	1079,50	485,50	3,48	92,50
Valor Mínimo	5,00	213,00	193,00	144,50	13,00	1,05	21,00
p-value**	0,9953	0,4760	0,2579	0,0306	0,0010	0,9443	0,2936

VR= Valores de referência; * Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias da população de animais positivos em todos os testes sorológicos e da população dos animais negativos em todos os testes. ** Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias das populações de animais positivos apenas em ELISA p90 / ELISA p26 / ELISA gp90+ELISA p26 e da população dos animais negativos em todos os testes.

Tabela 11. Dosagens das proteínas totais, albumina, globulinas e fibrinogênio dos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara

Concentrações das Proteínas Hematológicas					
População total (n=112)					
Valores de Referência (g/dL)	Proteínas Totais	Albumina	Globulina	Relação A:G	Fibrinogênio
	6,1 – 7,5	2,6 – 3,3	2,6 – 4,0	0,6 – 0,9	100 -400
Média	7,87	2,64	5,23	0,51	328,57
Desv. Padrão	1,58	0,64	1,14	0,11	164,44
Interv. Confiança	0,29	0,12	0,21	0,02	30,45
Valor Máximo	12,65	4,75	8,86	0,85	1000,00
Valor Mínimo	3,82	1,35	2,38	0,21	200,00
População Positivos (n=13)					
Média	8,58	2,88	5,70	0,51	384,62
Desv. Padrão	1,88	0,74	1,28	0,10	199,41
Interv. Confiança	1,02	0,40	0,70	0,05	108,40
Valor Máximo	11,96	3,95	8,10	0,72	800,00
Valor Mínimo	6,06	1,79	4,11	0,37	200,00
População Negativos (n=52)					
Média	7,77	2,65	5,12	0,52	330,77
Desv. Padrão	1,50	0,59	1,01	0,08	174,90
Interv. Confiança	0,41	0,16	0,28	0,02	47,54
Valor Máximo	12,65	4,12	8,53	0,67	1000,00
Valor Mínimo	4,21	1,35	2,62	0,37	200,00
p-value*	0,1031	0,2371	0,0844	0,6696	0,3379

* Calculado usando *T test calculator*, onde foram comparadas as médias da população de animais positivos em todos os testes sorológicos e da população dos animais negativos em todos os testes.

5.2.4 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética

O DNA amplificado do tamanho esperado na PCR tat-gag foi detectado em 26/112 (23, 2 %) das amostras de sangue total, sendo 25/104 cavalos (24%) e uma muar (12,5% -1/8). Desses amplificados foram obtidas 17/112 (15, 2%) sequências tat-gag EIAV, JERI_8_TATGAG, JERI_11_TATGAG, JERI_13_TATGAG, JERI_19_TATGAG, JERI_24_TATGAG, JERI_27_TATGAG, JERI_34_TATGAG, JERI_36_TATGAG, JERI_41_TATGAG, JERI_43_TATGAG, JERI_44_TATGAG, JERI_47_TATGAG, JERI_58_TATGAG, JERI_65_TATGAG, JERI_78_TATGAG, JERI_79_TATGAG e JERI_193_TATGAG. Destes animais foram 9/17 foram gp90 ELISA, p26 ELISA e AGID positivos, 4/17 destes animais foram gp90 ELISA e p26 ELISA positivos e AGID negativos e 4/17 animais foram positivos apenas no gp90 ELISA.

Foram comparadas as 17 sequências tat-gag do EIAV encontradas nos equídeos com outras sequências depositadas no Genbank, incluindo sequências de genomas brasileiros, POCONE-BRA1 e POCONE-BR2, outras sequências já descritas no Ceará, e outras sequências descritas no Japão, China, EUA, Itália e Irlanda. Foi observado que sequências brasileiras foram agrupadas no mesmo clado, com um valor de *bootstrap* de 58, onde 10 sequências de JERI agrupam com sequências de jumentos do Ceará e com a sequência do genoma brasileiro POCONE-BRA1, apoiadas por um valor de *bootstrap* de 99. Enquanto sequências do Japão, EUA, China e Irlanda e Itália, formam quatro cladros separados e bem definidos na árvore, apoiados por um elevado valor de *bootstrap* (Figura 23).

Na análise da similaridade de nucleotídeos somente entre as sequências de equídeos foi observada similaridade de 82,4% a 100%. Enquanto a similaridade entre as sequências do Ceará já depositadas no Genbank foi de 84,7% a 100% e entre as sequências dos genomas brasileiros que são cavalos do Pantanal foi 85,8% a 99,6%. As sequências de equídeos de Jericoacoara quando comparadas com as sequências de EIAV mundiais apresentaram valores variáveis de similaridade de nucleotídeos, variando de 71,8% a 85,3 (Figura 24).

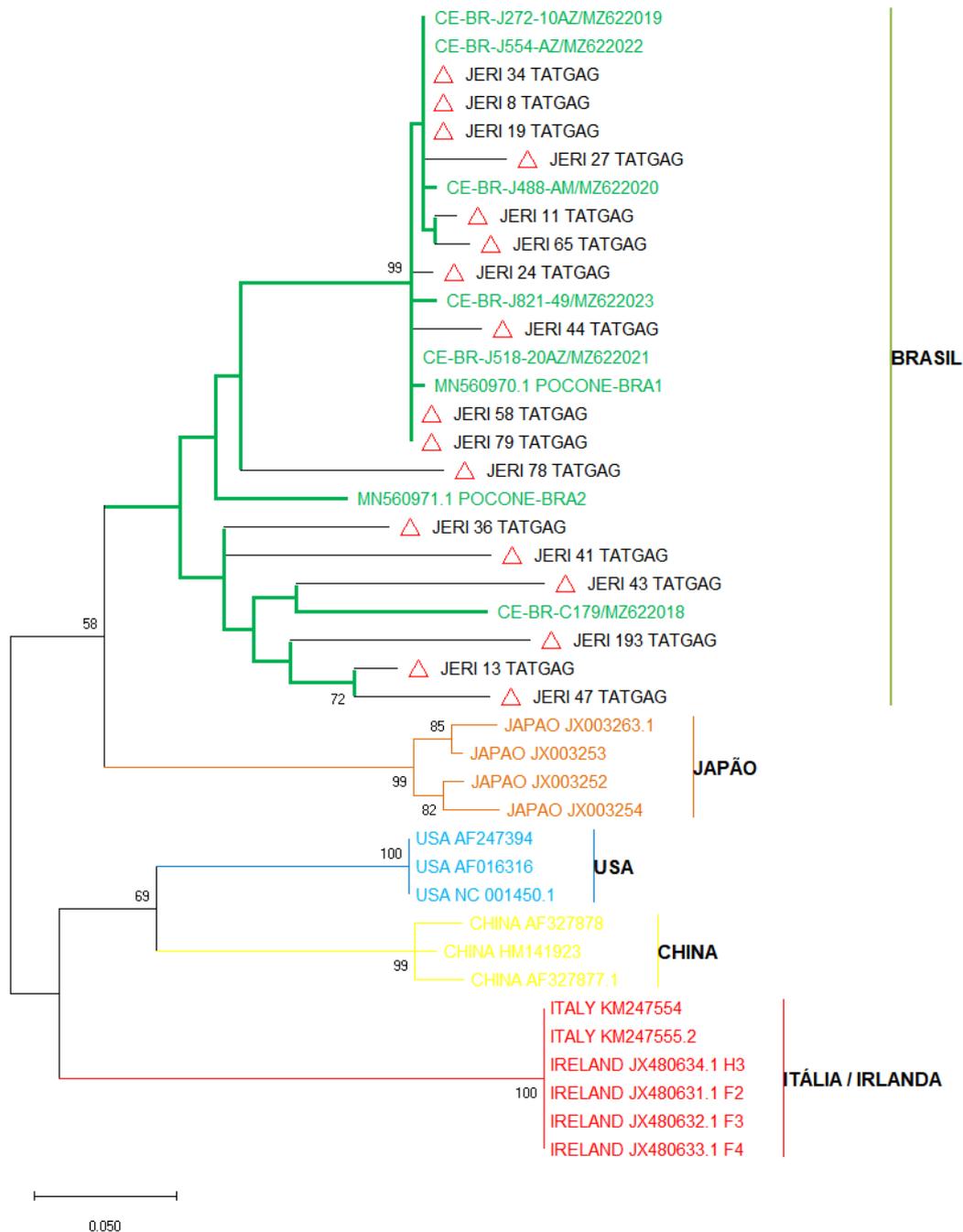


Figura 23. Análise filogenética das sequências de EIAV detectados nos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara, com 41 sequências parciais da região tat-gag. A análise foi feita empregando o método da Máxima Verossimilhança e do modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a probabilidade de log mais alta (-1793,12) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agrupam é mostrada ao lado dos ramos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de log verossimilhança superior. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,3802)). O modelo de taxa de variação permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 26,84% sítios). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramificação medidos no número de substituições por local. Esta análise envolveu 41 sequências de nucleotídeos. Havia um total de 272 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR et al., 2018).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	JAPAO_JX003263.1																			
2	JAPAO_JX003252	96,4																		
3	JAPAO_JX003254	96,0	98,5																	
4	JAPAO_JX003253	98,4	97,2	96,4																
5	USA_AF247394	78,4	79,8	81,0	79,1															
6	USA_AF016316	78,4	79,8	81,0	79,1	100,0														
7	CHINA_AF327878	78,4	78,5	77,3	77,9	84,5	84,5													
8	CHINA_HM141923	78,4	78,5	77,3	77,9	85,6	85,6	97,7												
9	CHINA_AF327877.1	77,7	77,8	76,6	77,2	83,9	83,9	96,9	97,7											
10	ITALY_RM247554	72,5	74,9	72,9	72,2	78,1	78,1	78,5	79,7	79,8										
11	ITALY_RM247555.2	72,5	74,9	72,9	72,2	78,1	78,1	78,5	79,7	79,8	100,0									
12	USA_NC_001450.1	78,4	79,8	81,0	79,1	100,0	100,0	84,5	85,6	83,9	78,1	78,1								
13	IRELAND_JX480634.1_H3	72,5	74,9	72,9	72,2	78,1	78,1	78,5	79,7	79,8	100,0	100,0	78,1							
14	IRELAND_JX480631.1_F2	72,5	74,9	72,9	72,2	78,1	78,1	78,5	79,7	79,8	100,0	100,0	78,1	100,0						
15	IRELAND_JX480632.1_F3	72,5	74,9	72,9	72,2	78,1	78,1	78,5	79,7	79,8	100,0	100,0	78,1	100,0	100,0					
16	IRELAND_JX480633.1_F4	72,5	74,9	72,9	72,2	78,1	78,1	78,5	79,7	79,8	100,0	100,0	78,1	100,0	100,0	100,0				
17	MN560970.1_POCONE-BRA1	79,7	81,3	79,6	79,5	80,8	80,8	77,2	77,1	77,6	79,9	79,9	80,8	79,9	79,9	79,9	79,9	79,9	79,9	79,9
18	MN560971.1_POCONE-BRA2	81,8	83,0	83,1	82,4	83,8	83,8	79,6	79,5	81,4	81,8	81,8	83,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	90,5
19	JERI_8_TATGAG	79,7	81,3	79,6	79,5	80,8	80,8	77,2	77,1	77,6	79,9	79,9	80,8	79,9	79,9	79,9	79,9	79,9	99,2	90,5
20	JERI_11_TATGAG	78,5	80,2	78,4	78,3	80,2	80,2	76,6	76,5	77,0	79,9	79,9	80,2	79,9	79,9	79,9	79,9	79,9	98,5	89,5
21	JERI_13_TATGAG	83,6	82,9	82,4	83,4	83,5	83,5	80,9	82,0	80,2	79,9	79,9	83,5	79,9	79,9	79,9	79,9	90,0	90,1	90,0
22	JERI_19_TATGAG	79,7	81,3	79,6	79,5	80,8	80,8	77,2	77,1	77,6	79,9	79,9	80,8	79,9	79,9	79,9	79,9	99,2	90,5	100,0
23	JERI_24_TATGAG	79,1	80,7	79,0	78,9	80,2	80,2	76,5	76,4	76,9	79,3	79,3	80,2	79,3	79,3	79,3	79,3	98,8	90,0	98,8
24	JERI_27_TATGAG	74,9	77,2	75,4	74,6	76,1	76,1	72,0	71,8	72,3	76,3	76,3	76,1	76,3	76,3	76,3	76,3	96,4	86,8	97,2
25	JERI_34_TATGAG	79,7	81,3	79,6	79,5	80,8	80,8	77,2	77,1	77,6	79,9	79,9	80,8	79,9	79,9	79,9	79,9	99,2	90,5	100,0
26	JERI_36_TATGAG	83,8	83,2	84,3	84,3	82,3	82,3	81,3	82,4	81,8	76,3	76,3	82,3	76,3	76,3	76,3	76,3	88,2	90,7	88,2
27	JERI_41_TATGAG	80,0	81,6	81,0	79,8	81,9	81,9	79,0	79,6	80,3	75,0	75,0	81,9	75,0	75,0	75,0	75,0	87,0	87,8	87,0
28	JERI_43_TATGAG	82,3	84,4	82,8	82,1	78,7	78,7	74,9	76,2	76,7	75,3	75,3	78,7	75,3	75,3	75,3	75,3	87,5	85,8	87,5
29	JERI_44_TATGAG	77,8	79,4	77,7	77,5	78,9	78,9	73,8	73,7	74,2	76,7	76,7	78,9	76,7	76,7	76,7	76,7	97,3	88,0	97,3
30	JERI_47_TATGAG	78,5	79,7	79,8	79,1	79,2	79,2	76,9	78,1	78,8	78,4	78,4	79,2	78,4	78,4	78,4	78,4	88,0	88,1	88,0
31	JERI_58_TATGAG	80,2	81,8	80,2	80,1	81,3	81,3	77,8	77,7	78,2	80,5	80,5	81,3	80,5	80,5	80,5	80,5	99,6	90,9	99,6
32	JERI_65_TATGAG	80,2	81,8	80,2	80,1	80,2	80,2	77,8	76,5	77,0	78,1	78,1	80,2	78,1	78,1	78,1	78,1	98,1	89,0	98,8
33	JERI_78_TATGAG	80,7	82,3	81,2	81,3	80,7	80,7	78,6	79,8	79,0	79,0	79,0	80,7	79,0	79,0	79,0	79,0	89,6	89,2	89,6
34	JERI_79_TATGAG	80,2	81,8	80,2	80,1	81,3	81,3	77,8	77,7	78,2	80,5	80,5	81,3	80,5	80,5	80,5	80,5	99,6	90,9	99,6
35	JERI_193_TATGAG	77,5	78,8	77,7	77,0	80,3	80,3	83,1	85,3	84,1	79,0	79,0	80,3	79,0	79,0	79,0	79,0	86,5	87,0	86,5
36	CE-BR-J272-10AZ/MZ622019	79,7	81,3	79,6	79,5	80,8	80,8	77,2	77,1	77,6	79,9	79,9	80,8	79,9	79,9	79,9	79,9	99,2	90,5	100,0
37	CE-BR-J488-AM/MZ622020	80,2	81,8	80,2	80,1	81,3	81,3	77,8	77,7	78,2	80,5	80,5	81,3	80,5	80,5	80,5	80,5	98,8	90,0	99,6
38	CE-BR-J518-20AZ/MZ622021	80,2	81,8	80,2	80,1	81,3	81,3	77,8	77,7	78,2	80,5	80,5	81,3	80,5	80,5	80,5	80,5	99,6	90,9	99,6
39	CE-BR-J554-AZ/MZ622022	79,7	81,3	79,6	79,5	80,8	80,8	77,2	77,1	77,6	79,9	79,9	80,8	79,9	79,9	79,9	79,9	99,2	90,5	100,0
40	CE-BR-J821-49/MZ622023	79,8	81,4	79,7	79,6	80,6	80,6	77,0	76,9	77,4	80,4	80,4	80,6	80,4	80,4	80,4	80,4	98,8	89,9	98,8
41	CE-BR-C179/MZ622018	82,9	83,4	81,7	81,6	80,3	80,3	79,1	80,2	80,2	78,0	78,0	80,3	78,0	78,0	78,0	78,0	88,6	88,6	88,6

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
1	JAPAO_JX003263.1																				
2	JAPAO_JX003252																				
3	JAPAO_JX003254																				
4	JAPAO_JX003253																				
5	USA_AF247394																				
6	USA_AF016316																				
7	CHINA_AF327878																				
8	CHINA_HM141923																				
9	CHINA_AF327877.1																				
10	ITALY_KM247554																				
11	ITALY_KM247555.2																				
12	USA_NC_001450.1																				
13	IRELAND_JX480634.1_H3																				
14	IRELAND_JX480631.1_F2																				
15	IRELAND_JX480632.1_F3																				
16	IRELAND_JX480633.1_F4																				
17	MN560970.1_POCCONE-BRA1																				
18	MN560971.1_POCCONE-BRA2																				
19	JERI_8_TATGAG																				
20	JERI_11_TATGAG																				
21	JERI_13_TATGAG																				
22	JERI_19_TATGAG	90,0																			
23	JERI_24_TATGAG	89,5	98,8																		
24	JERI_27_TATGAG	86,2	97,2	96,0																	
25	JERI_34_TATGAG	90,0	100,0	98,8	97,2																
26	JERI_36_TATGAG	91,0	88,2	87,7	84,3	88,2															
27	JERI_41_TATGAG	90,0	87,0	86,5	83,0	87,0	88,1														
28	JERI_43_TATGAG	88,6	87,5	87,0	84,2	87,5	86,4	85,2													
29	JERI_44_TATGAG	87,5	97,3	96,9	94,3	97,3	85,6	85,4	86,4												
30	JERI_47_TATGAG	94,2	88,0	87,4	85,1	88,0	87,5	88,5	87,9	85,3											
31	JERI_58_TATGAG	90,4	99,6	99,2	96,8	99,6	88,6	87,5	88,0	97,7	88,4										
32	JERI_65_TATGAG	88,5	98,8	97,7	96,0	98,8	86,7	85,5	87,0	96,0	86,5	98,5									
33	JERI_78_TATGAG	90,6	89,6	89,1	85,8	89,6	87,9	84,9	87,5	88,0	87,6	90,0	88,1								
34	JERI_79_TATGAG	90,4	99,6	99,2	96,8	99,6	88,6	87,5	88,0	97,7	88,4	100,0	98,5	90,0							
35	JERI_193_TATGAG	89,9	86,5	85,9	82,4	86,5	89,2	85,2	84,2	83,8	88,4	87,0	84,9	85,4	87,0						
36	CE-BR-J272-10AZ/MZ622019	90,0	100,0	98,8	97,2	100,0	88,2	87,0	87,5	97,3	88,0	99,6	98,8	89,6	99,6	86,5					
37	CE-BR-J488-AM/MZ622020	89,5	99,6	98,5	96,8	99,6	88,6	86,5	88,0	96,9	87,5	99,2	98,5	90,0	99,2	86,0	99,6				
38	CE-BR-J518-20AZ/MZ622021	90,4	99,6	99,2	96,8	99,6	88,6	87,5	88,0	97,7	88,4	100,0	98,5	90,0	100,0	87,0	99,6	99,2			
39	CE-BR-J554-AZ/MZ622022	90,0	100,0	98,8	97,2	100,0	88,2	87,0	87,5	97,3	88,0	99,6	98,8	89,6	99,6	86,5	100,0	99,6	99,6		
40	CE-BR-J821-49/MZ622023	89,4	98,8	98,4	96,0	98,8	87,6	86,5	87,4	96,8	88,4	99,2	97,7	89,0	99,2	85,9	98,8	98,5	99,2	98,8	
41	CE-BR-C179/MZ622018	89,1	88,6	88,0	84,7	88,6	88,6	88,0	87,5	86,0	85,2	89,0	87,1	85,5	89,0	87,5	88,6	88,1	89,0	88,6	88,0

Figura 24. Similaridade de nucleotídeos entre das sequências de EIAV detectados nos equídeos do Parque Nacional de Jericoacoara e 24 sequências de EIAV depositadas no Genbank da região tat-gag. *Estimativa da similaridade de nucleotídeos entre 41 sequências de nucleotídeos de 272 pb do EIAV: 17 sequências tat-gag do EIAV encontradas nos equídeos com sequências parciais retidas de genomas brasileiros, POCONE-BRA1 e POCONE-BR2, outras sequências já descritas no Ceará, e outras sequências descritas no Japão, China, EUA, Itália e Irlanda.

5.2.5 Acompanhamento clínico e sorológico de equídeos infectados pelo EIAV

5.2.5.1 Sorologia pareada

Foi feita a sorologia pareada de 34 equídeos, sendo que em 21/34 animais foram feitas duas coletas e de 13/34 animais foram feitas três coletas. Nove animais foram positivos em IDGA em todas as coletas e um animal (19) apresentou seroconversão na segunda coleta, passando a testar positivo em IDGA seis meses após a primeira coleta. Este animal foi positivo nos ELISAs gp90 e p26 nas amostras das duas coletas.

Ainda, dos 9/34 positivos em IDGA, 6/34 animais foram positivos também nos ELISAs gp90 e p26 em todas as coletas, porém nos soros dos animais 36, 41 e 78 foi observada uma variação nos valores de absorbância, ou seja, indicando uma variação nas concentrações de anticorpos no ELISA p26, onde no animal 36 nas amostras da segunda coleta (seis meses após a primeira) obteve valor de absorbância considerado indeterminado no teste, mas na terceira coleta (nove meses após a segunda) o animal apresenta elevada absorbância sendo novamente positivo em ELISA p26. Os animais 41 e 78, tiveram diminuição nos valores de absorbância, se tornando indeterminado e negativo, respectivamente. Vale destacar que esta variação em 41 ocorreu após seis meses e no 78 após um ano (Tabela 12).

Um animal (47) permaneceu positivo nos ELISAs gp90 e p26 durante as três avaliações, mas sempre negativo em IDGA. O animal 74 foi positivo em ELISA gp90 no soro das três coletas e positivo no ELISA p26 apenas na primeira coleta, em outras duas (trimestrais), foi negativo. O animal 59 apresentou aumento nos níveis de anticorpos nos dois ELISAs, sendo positivo em ELISA gp90 e negativo em ELISA p26, na segunda coleta ocorreu seroconversão para o ELISA p26 em apenas três meses. Para o animal 40 foi observado que em coleta anual, na primeira coleta foi positivo no ELISA gp90 e negativo para ELISA p26, e na segunda coleta foi indeterminado para ELISA gp90 e positivo para ELISA p26 (Tabela 12).

Nove animais (1,25,27,28,44,60, 64,65 e75) foram positivos apenas em ELISA gp 90 em todas as coletas, mas o animal 64 na terceira coleta apresentou ELISA p26 indeterminado. Três animais (29, 18 e 32) foram positivos no ELISA gp90 nas amostras da primeira coleta, mas em soros da segunda o animal 29 foi ELISA gp90 indeterminado depois de um ano, e os animais 18 e 32 foram negativos seis meses após a primeira coleta (Tabela 12).

Soro do animal 73 foi positivo para ELISA gp90 na segunda coleta e indeterminado no ELISA p26 no soro das duas coletas feitas. O soro do animal 35 foi indeterminado no ELISA gp90 e positivo na segunda coleta e negativo para ELISA p26 nos soros das duas coletas (Tabela 12).

Soros de quatro animais foram indeterminados no ELISA gp90 na primeira coleta e negativos na segunda coleta (31, 33, 34 e 39), enquanto o soro dos animais 80 e 72, foram indeterminados em ELISA p26 somente na primeira coleta (Tabela 12).

Tabela 12. Testes de IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 em amostras de equídeos acompanhados em coletas sucessivas

SOROLOGIA PAREADA PARA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA												
IDENTIFICAÇÃO / DATA DA AVALIAÇÃO				IDGA			ELISA gp90			ELISA p26		
ID	DATA (1)	DATA (2)	DATA (3)	IDGA (1)	IDGA (2)	IDGA (3)	ELISA gp90 (1)	ELISA gp90 (2)	ELISA gp90 (3)	ELISA p26 (1)	ELISA p26 (2)	ELISA p26 (3)
13	22/07/2019	17/01/2020	NC	P	P	NC	3,13	3,24	NC	1,85	2,42	NC
11	22/07/2019	17/01/2020	NC	P	P	NC	2,58	1,25	NC	1,45	1,26	NC
23	22/07/2019	13/10/2020	NC	P	P	NC	2,89	3,15	NC	1,60	2,23	NC
79	26/10/2019	13/10/2020	NC	P	P	NC	3,15	2,37	NC	2,38	1,79	NC
5	22/07/2019	17/01/2020	13/10/2020	P	P	P	3,16	1,76	2,44	1,33	1,24	1,06
58	23/07/2019	23/07/2019	14/10/2020	P	P	P	2,74	3,01	1,22	1,68	1,97	1,73
19	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	P	NC	3,23	1,91	NC	1,38	1,48	NC
36	23/07/2019	17/01/2020	14/10/2020	P	P	P	2,37	2,32	1,69	0,98	0,71	1,01
41	23/07/2019	17/01/2020	NC	P	P	NC	2,91	1,80	NC	1,25	0,77	NC
78	26/10/2019	14/10/2020	NC	P	P	NC	2,15	1,39	NC	1,88	0,64	NC
47	23/07/2019	17/01/2020	14/10/2020	N	N	N	2,45	1,07	0,90	0,89	0,98	1,08
74	07/09/2019	30/11/2019	13/10/2020	N	N	N	1,05	0,84	1,02	1,00	0,37	0,32
27	22/07/2019	17/01/2020	13/10/2020	N	N	N	1,23	1,09	1,39	0,26	0,27	0,36
28	22/07/2019	17/01/2020	13/10/2020	N	N	N	1,24	1,20	2,23	0,37	0,36	0,28
44	23/07/2019	17/01/2020	14/10/2020	N	N	N	1,41	1,31	1,68	0,49	0,29	0,34
60	07/09/2019	30/11/2019	13/10/2020	N	N	N	1,41	0,82	0,81	0,41	0,40	0,50
75	07/09/2019	30/11/2019	13/10/2020	N	N	N	1,87	1,66	2,14	0,45	0,23	0,34
59	07/09/2019	30/11/2019	NC	N	N	NC	0,85	1,52	NC	0,48	0,84	NC
40	23/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	0,99	0,64	NC	0,61	0,99	NC
1	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	1,35	1,19	NC	0,35	0,28	NC
25	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	1,78	1,23	NC	0,34	0,29	NC
65	07/09/2019	30/11/2019	NC	N	N	NC	2,28	0,73	NC	0,46	0,61	NC
64	07/09/2019	30/11/2019	13/10/2020	N	N	N	0,78	0,90	1,10	0,40	0,33	0,69
29	22/07/2019	13/10/2020	NC	N	N	NC	0,72	0,61	NC	0,27	0,26	NC
18	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	0,98	0,53	NC	0,33	0,36	NC
32	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	1,85	0,41	NC	0,28	0,43	NC
73	07/09/2019	30/11/2019	NC	N	N	NC	0,49	2,05	NC	0,80	0,79	NC
35	22/07/2019	14/10/2020	NC	N	N	NC	0,63	0,74	NC	0,20	0,19	NC
31	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	0,56	0,40	NC	0,20	0,35	NC
33	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	0,65	0,12	NC	0,31	0,45	NC
39	23/07/2019	17/01/2020	14/10/2020	N	N	N	0,57	0,12	0,18	0,26	0,14	0,25
34	22/07/2019	17/01/2020	NC	N	N	NC	0,59	0,39	NC	0,31	0,23	NC
80	26/10/2019	14/10/2020	NC	N	N	NC	0,35	0,32	NC	0,80	0,55	NC
72	07/09/2019	30/11/2019	13/10/2020	N	N	N	0,37	0,26	0,38	0,71	0,51	0,38

*Foram realizados cálculos para cutt off, onde para ELISA gp90: Resultado >0,55 = indeterminados e >0,70=positivos, ELISA p26: Resultado >0,65 = indeterminados e >0,80=positivos. Assim, resultados em vermelho equivalem a positivos e em azul, indeterminados/ P=POSITIVOS; N=NEGATIVOS; NC=NÃO CONSTA;

5.2.5.2 Avaliação hematológica

Foi feita uma análise dos resultados das avaliações hematológicas nos animais cujo soro apresentou variações significativas nos valores de absorbância nos testes de ELISA. No animal 19 ocorreu a seroconversão no IDGA seis meses após a primeira coleta. Na primeira coleta apresentou o animal apresentou proteínas totais elevadas de 8,40 g/dL, anemia e leucocitose, e na segunda coleta houve aumento de proteínas totais para 9,6 g/dL, alteração de fibrinogênio, leucocitose intensa e trombocitopenia. A anemia não foi identificada no sangue nesta segunda coleta podendo ser decorrente de desidratação (Tabela 13).

Os resultados do animal 36 que foi positivo em todos os testes imunológicos excetuando-se na segunda coleta, onde foi indeterminado no ELISA p26 indeterminado como alterações nas três coletas, apresentou um valor de fibrinogênio de 800 g/dL na primeira coleta leucocitose na terceira coleta que foi feita 15 meses depois da primeira coleta (Tabela 13).

O animal 41 que durante a primeira coleta apresentou leucocitose e foi positivo em todos os testes imunológicos, seis meses depois apresentou uma elevação da proteína total e um teste ELISA p26 indeterminado. Enquanto o animal 78 durante a primeira coleta apresentou aumentada concentração de fibrinogênio em 600 g/dL e foi positivo em todos os testes imunológicos, um ano após na segunda coleta apresentou um teste ELISA p26 negativo e todos os parâmetros hematológicos normais (Tabela 13).

O animal 59 foi positivo ELISA gp90 a primeira coleta quando apresentava leucocitose. Três meses depois apresentou aumento da concentração de fibrinogênio para 1.000 g/dL, anemia e leucocitose, nos testes sorológicos foi positivo em ELISA gp90 e ocorreu a seroconversão no ELISA p26 (Tabela 13).

O animal 64 foi positivo em ELISA gp 90 nas três coletas realizadas, sendo observado que a absorbância aumentava a cada coleta. Na primeira coleta foi identificada uma leucocitose e foi verificada uma queda gradativa no número total de plaquetas sendo que na terceira coleta o animal apresentou 74×10^3 / μ L plaquetas. Os animais 18 e 32 foram positivos no ELISA gp90 somente na primeira coleta. Nesta coleta o hemograma do animal 18 apresentava anemia e o animal 32 leucocitose. Na

segunda coleta após seis meses todos os exames se apresentaram dentro do valor de referência.

O equino 35 foi indeterminado em ELISA gp90 da primeira coleta, e um ano depois na segunda coleta foi ELISA gp90 positivo, apresentando concentração elevada de fibrinogênio 600 g/dL e anemia (Tabela 13).

Tabela 13. Hemogramas dos animais acompanhados em coletas sucessivas e que tiveram variações significativas na absorbância dos ELISAS gp90 e p26

ID	COLETA	DATA	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26	PP (g/dL)	FIBRINOGENIO (g/dL)	HM (X 106 céls/μL)	VG (%)	HG (g/dL)	LEUCÓCITOS (céls/μL)	PLAQUETAS (X 103 /μL)
VR						6,0 -8,0	100-400	7,0-13,0	32-52	11 - 19	6.000-12.500	90-350
19	1ª	22/07/2019	N	3,23	1,38	8,40	200	6,20	26	8,70	15.592,00	95
	2ª	17/01/2020	P	1,91	1,48	9,60	600	8,10	34	11,33	31.972,00	78
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
36	1ª	23/07/2019	P	2,37	0,98	7,80	800	8,3	35	11,70	10.290	122
	2ª	17/01/2020	P	2,32	0,71	8	200	8,57	36	12,00	9.607,00	114
	3ª	14/10/2020	P	1,69	1,01	7,4	400	8,10	34	11,3	14.490	161
41	1ª	23/07/2019	P	2,91	1,25	7,00	200	7,60	32	10,60	15.120,00	96
	2ª	17/01/2020	P	1,8	0,77	8,20	400	7,86	33	11,00	11.182,00	168
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
78	1ª	26/10/2019	P	2,15	1,88	8,00	600	8,10	34	11,34	11.130,00	135
	2ª	15/10/2020	P	1,39	0,64	7,00	400	7,60	32	10,70	9.450,00	161
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
59	1ª	07/09/2019	N	0,85	0,48	7,60	400	9,50	40	13,30	13.335,00	142
	2ª	30/11/2019	N	1,52	0,84	7,00	1000	5,95	25	8,33	14.227,00	145
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
64	1ª	07/09/2019	N	0,78	0,4	6,8	200	9,00	38	12,70	13.020,00	117
	2ª	30/11/2019	N	0,9	0,33	7,4	200	8,09	34	11,33	9.187,00	106
	3ª	13/10/2020	N	1,1	0,69	6,6	200	9,50	40	13,3	9.030,00	74
18	1ª	22/07/2019	N	0,98	0,33	7,20	400	6,90	29	9,60	9.240,00	171
	2ª	17/01/2020	N	0,53	0,36	7,20	200	8,81	37	12,33	8.977,00	96
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
32	1ª	22/07/2019	N	1,85	0,28	7,20	200	7,10	30	10,00	13.335,00	246
	2ª	17/01/2020	N	0,41	0,43	7,80	200	7,38	31	10,33	7.927,00	131
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
35	1ª	22/07/2019	N	0,63	0,2	8,20	400,00	7,60	32,00	10,60	11.550,00	234,00
	2ª	14/10/2020	N	0,74	0,19	8,00	600,00	6,90	29,00	9,70	10.343,00	183,00
	3ª	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

ID=IDENTIFICAÇÃO; VR=VALORES DE REFERÊNCIA; PP=PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL; HM=HEMÁCIAS; VG=VOLUME GLOBULAR; HG=HEMOGLOBINA; NC=NÃO CONSTA.

5.2.5.3 Avaliação bioquímica sérica

Foi feita uma análise dos resultados das avaliações bioquímicas e nos animais cujo soro apresentou variações significativas nos valores de absorbância nos testes de ELISA. Destaca-se o animal 19 no qual ocorreu a seroconversão no IDGA numa segunda coleta depois de seis meses, mas que já era positivo para ELISA gp90 e p26 na primeira coleta. Na primeira coleta no qual foi observado que os níveis de albumina,

proteína total, GGT, FA e CK estavam alterados, o que se manteve na segunda coleta e houve além disto uma redução na concentração sérica de ureia (Tabela 14).

Os resultados do animal 36 que foi positivo em três coletas nos testes imunológicos, excetuando-se o ELISA p26 indeterminado na segunda coleta. Na primeira coleta os parâmetros de ureia, albumina, ALT, proteínas totais, GGT, FA e CK estavam alterados, na segunda coleta os parâmetros de AST, proteína total, GGT, FA e CK estavam alterados, e na terceira coleta o AST já estava em nível de valor de referência e os outros parâmetros continuavam alterados. Já o 78 e 74 inicialmente positivos em todos os testes, mas negativos em ELISA p26 na segunda coleta, o 78 apresentou aumento nas concentrações de AST e FA, enquanto o 74 apresentou aumento nas concentrações de creatinina, ALT e AST (Tabela 14).

O soro do animal 59 que na primeira coleta foi positivo apenas em ELISA gp90, na segunda coleta foi positivo no ELISA gp90 e p26, apresentou aumento nas concentrações de proteínas séricas, creatinina e CK nas duas coletas e de FA na segunda coleta. O soro do animal 40 passou de positivo para ELISA gp90 na primeira coleta a indeterminado na segunda coleta, e de ELISA p26 negativo na primeira coleta a positivo na segunda coleta. Este animal apresentou a ureia aumentada na segunda coletada e o AST, proteína total FA e CK aumentados nas duas coletas. O soro do animal 35 foi indeterminado no ELISA gp90 na primeira coleta e positivo na segunda apresentou concentrações de proteínas séricas aumentadas nas duas coletas, ocorrendo um aumento expressivo da primeira para a segunda coleta, FA e CK aumentados na segunda coleta (Tabela 14).

Ainda, foi observado associação entre os níveis de GGT e FA sérica e a presença de infecção por EIAV e através dos níveis de absorvância dos ELISAS gp 90 e p26, como foi observado no animal 19, os níveis de GGT e FA já eram elevados na primeira coleta, mas ocorreu um aumento de GGT na segunda coleta, quando ocorreu a seroconversão no IDGA. Também, no animal 36, com três coletas, sendo que na segunda coleta ocorreu a redução do nível de absorvância e o teste foi considerado indeterminado no ELISA p26 redução do nível de GGT e FA. Na terceira coleta houve aumento da absorvância novamente, sendo positivo e ocorreram aumentos nos níveis de GGT e FA. Estes achados se repetem nos animais 59 e 35, mas os valores se mantem nos níveis de normalidade para GGT (Figura 25).

Os soro do animal 31 foi indeterminado no ELISA gp90 na primeira coleta, e negativo na segunda coleta, e negativo no ELISA p26 nas duas coletas. Os níveis d

FA estavam aumentados na primeira coleta. Na primeira e segunda coleta os níveis de ureia, proteínas totais e CK estavam aumentados (Tabela 14). O soro do animal 72 foi indeterminado na primeira coleta para ELISA p26 e as outras duas coletas foram negativas. Também foi negativo o ELISA gp90. Neste animal as proteínas totais estavam aumentadas nas três coletas, a FA na primeira coleta e a CK nas duas primeiras coletas.

Dos resultados gerais das avaliações clínicas da população acompanhada, foi observado que todos os animais que foram positivos em IDGA, com exceção de um, apresentaram valores elevados de GGT (ANEXO).

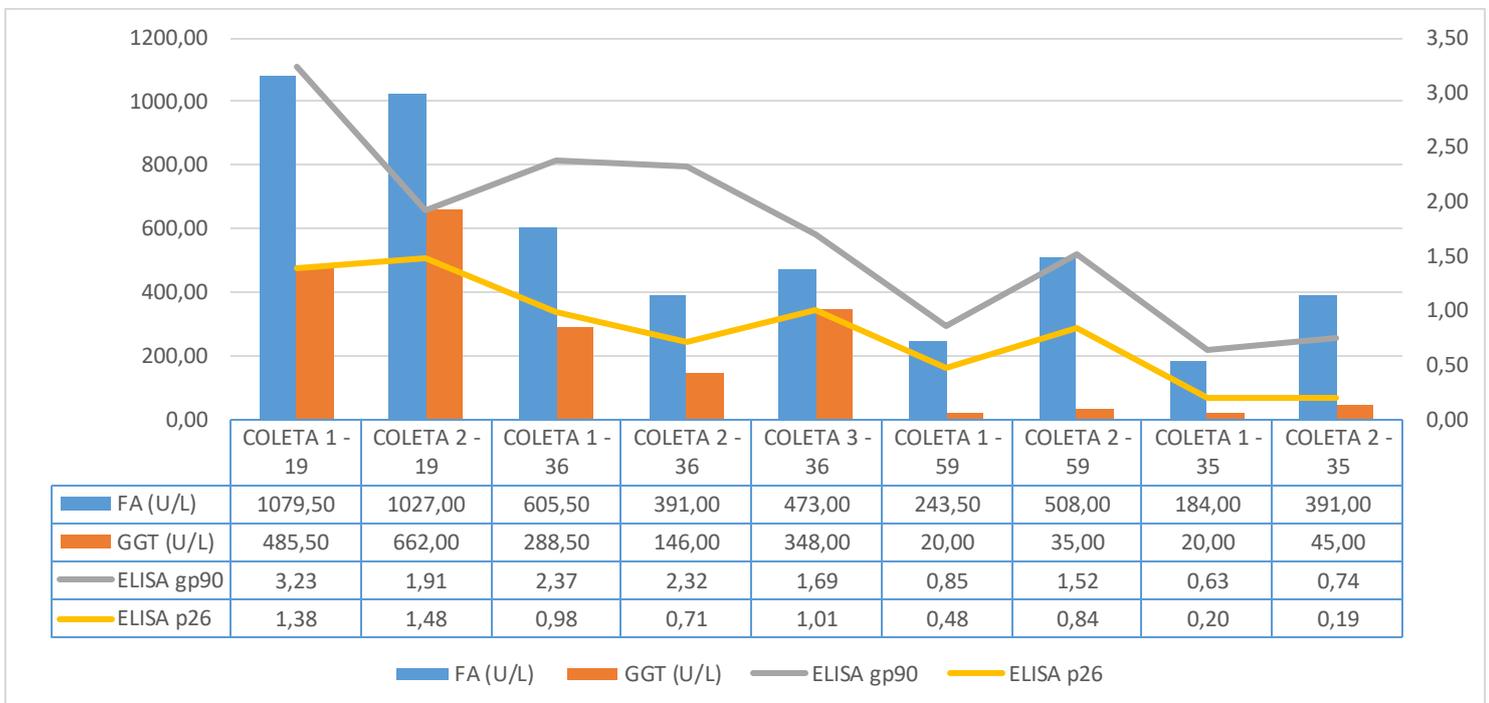


Figura 25. Associação entre os valores de GGT e FA séricos e os valores das absorbância dos ELISAS. Associação entre os níveis de GGT e FA séricos e os valores de absorbâncias observados nos ELISAS gp90 e p26 durante as coletas seriadas dos animais 19, 36, 59 e 35.

Tabela 14. Testes bioquímicos dos animais acompanhados em sucessivas coletas e que tiveram variações significativas na absorbância dos ELISAS gp90 e p26

ID	COLETA	DATA	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	PROT TOTAL (g/dL)	GGT (U/L)	FA (U/L)	CK (U/L)
VR			21,4 - 51,5	0,4 - 2,2	2,1 - 3,3	3 - 23	226 - 366	2,4 - 4,0	14 - 62	86 - 295	86 - 295
19	1 ^a	22/07/2019	38,00	1,57	1,83	11,00	362,00	10,69	485,50	1079,50	503,50
	2 ^a	17/01/2020	18,00	1,02	1,29	15,00	259,00	10,88	662,00	1027,00	357,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
36	1 ^a	23/07/2019	71,50	2,16	3,65	34,00	259,50	10,57	288,50	605,50	431,00
	2 ^a	17/01/2020	54,00	1,38	2,59	13,00	412,00	7,75	146,00	391,00	814,00
	3 ^a	14/10/2020	52,00	1,16	2,16	17,00	325,00	7,16	348,00	473,00	370,00
78	1 ^a	26/10/2019	49,00	1,56	2,34	9,00	290,00	6,63	30,00	272,00	241,00
	2 ^a	15/10/2020	44,00	1,36	2,70	9,50	391,00	7,59	39,00	374,00	413,50
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
74	1 ^a	07/09/2019	53,00	2,63	2,91	16,50	395,00	8,29	36,50	255,50	488,00
	2 ^a	30/11/2019	48,00	3,00	3,20	32,00	406,00	8,90	25,00	198,00	398,00
	3 ^a	13/10/2020	32,00	1,08	1,20	16,00	237,00	4,24	15,00	162,00	510,00
59	1 ^a	07/09/2019	50,00	3,08	2,90	20,50	359,50	8,05	20,00	243,50	531,00
	2 ^a	30/11/2019	43,00	3,20	2,80	12,00	287,00	9,00	35,00	508,00	352,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
40	1 ^a	23/07/2019	47,50	1,92	3,14	9,50	371,00	8,89	30,00	364,00	495,50
	2 ^a	17/01/2020	64,00	1,20	2,36	15,00	440,00	7,73	23,00	400,00	496,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
35	1 ^a	22/07/2019	51,00	1,73	2,58	7,00	228,00	5,70	20,00	184,00	226,50
	2 ^a	14/10/2020	43,00	1,45	3,30	10,00	292,00	16,92	45,00	391,00	790,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
31	1 ^a	22/07/2019	78,00	2,25	2,67	15,00	382,50	9,96	51,00	321,00	489,00
	2 ^a	17/01/2020	66,00	1,80	2,61	10,00	413,00	7,90	57,00	228,00	487,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
72	1 ^a	07/09/2019	44,50	2,55	2,90	9,00	323,50	8,40	14,00	317,00	317,00
	2 ^a	30/11/2019	41,00	2,20	2,60	15,00	274,00	7,10	15,00	204,00	305,00
	3 ^a	13/10/2020	31,00	1,31	2,20	5,00	226,00	6,02	9,00	112,00	236,50

ID=IDENTIFICAÇÃO; VR=VALORES DE REFERÊNCIA; NC=NÃO CONSTA; ALT= ALANINA AMINOTRANSFERASE; AST=ASPARTATO AMINOTRANSFERASE; CK=CREATINA QUINASE; FA=FOSFATASE ALCALINA; GGT=GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE.

6 DISCUSSÃO

6.1 ANIMAIS DA FAZENDA PAULA RODRIGUES (FPR)

6.1.1 Ensaios imunológicos para diagnóstico de AIE

Os jumentos, apesar de serem considerados parte da cultura do nordeste, com o crescimento da mecanização da agricultura tiveram importância diminuída, levando à marginalização da espécie, o que resulta no abandono de milhares de animais que ficaram em condições de vulnerabilidade vagando nas estradas e rodovias, sendo um risco para acidentes automobilísticos e sanitário, em alguns estados, como Ceará e Pernambuco, esses animais são recolhidos e guardados em abrigos mantidos pelo estado para evitar tais riscos ao homem e aos animais. No ano de 2016 no estado de Ceará foram recolhidos 6.537 jumentos e no ano seguinte durante os seis primeiros meses esse número foi ainda maior que o ano anterior, chegando a 6.655 animais (Dados não publicados – comunicação pessoal - National Task Force by Donkeys).

O inquérito soro-epidemiológico da fazenda Paula Rodrigues usado no presente estudo para investigar possíveis infecção por EIAV nos jumentos errantes das estradas do estado do Ceará, identificou apenas um jumento (0,81% - 1/124) positivo no IDGA, teste confirmatório para AIE (WOAH, 2013). Porém empregando ELISA foram identificados 27 asininos positivos (22% - 27/124) em ELISA gp90 e 13 positivos (10,6% - 13/124) em ELISA p26. Outros estudos também descreveram esta baixa positividade em jumentos testados com IDGA quando comparados com ELISAs (NAVES *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Também foram analisados três cavalos que viviam na fazenda e foi confirmada a circulação de EIAV em cavalos, tendo sido positivos em todos os testes imunológicos.

Um estudo de soro-prevalência feito com 367 amostras de soro de asininos, sem sinais clínicos evidentes de doença e que também transitavam livremente pelas estradas, em Mossoró, Rio Grande do Norte, mostrou positividade de 1,6% (6/367) por IDGA, 3,3% (12/367) em cELISA e 14,4% (53/367) pelo ELISA rpg90. Neste estudo os autores consideraram os resultados discordantes, e consideraram que muitos dos ELISA rpg90 seriam falso-positivos e que o IDGA teria baixa sensibilidade e em decorrência foram observados falso-negativos para a espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Ainda, Naves *et al.*, (2019) testou o epítipo gp45 em um ELISA indireto usando

179 amostras de jumentos, e obteve 7 amostras com resultados discordantes, sendo pgp45 ELISA positivo / IDGA negativo. Os autores consideraram que os esses resultados discordantes podem ser justificados pelo fato do IDGA ser um teste muito específico e pouco sensível e o ELISA ser um teste muito sensível com menor especificidade.

No entanto, os resultados dos três estudos podem ser justificados com os resultados observados em um estudo comparativo, onde foram comparadas infecções experimentais por EIAV em equinos, pôneis e asininos. Foi observado que os jumentos demoram mais tempo para que os resultados positivos no teste de IDGA sejam identificados em comparação as outras espécies. Os jumentos experimentalmente infectados apresentam níveis de RNA viral associados ao plasma significativamente mais baixos do que os de pôneis e cavalos que foram inoculados com as mesmas amostras de vírus (COOK, *et al.*, 2001). Desta forma isto poderia ter como consequência produção de anticorpos mais tardios retardando a positividade do IDGA (SCICLUNA *et al.*, 2013).

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo nos ELISAs, empregando o ELISA gp90, um teste imunológico mais sensível, foi detectado 21,8% (27/124) de asininos positivos, enquanto no ELISA p26 que tem como antígeno a mesma proteína do IDGA, p26, foi observado uma positividade de 10,5% (13/124), havendo uma concordância de seis animais positivos nos dois ELISAs. Assim, analisando-se o conhecimento da dinâmica da infecção por EIAV, sabe-se que os anticorpos gp90 são de aparecimento mais precoce do que os anticorpos p26. Este fato pode nos ajudar a entender a situação da fazenda com a circulação do vírus, em infecções recentes (COOK, R. F.; LEROUX; ISSEL, 2013; REIS, *et al.*, 2012).

Assim, os resultados do estudo soro-epidemiológico da FPR concordam com resultados encontrados durante o Programa Nacional de Vigilância da AIE na Itália que concluem que embora o teste IDGA para EIAV seja altamente específico, é propenso a produzir resultados falso negativos (ISSEL *et al.*, 2013; SCICLUNA *et al.*, 2013). Com isso, o uso exclusivo do teste IDGA pode dificultar o controle de AIE, especialmente em jumentos. Assim, considerando essa limitação do teste IDGA, fica claro que as recomendações de diagnóstico da AIE da WOA e do MAPA precisam ser questionadas, uma alternativa é a sugestão de alguns estudos que afirma que a combinação do teste ELISA e IDGA poderia conferir maior sensibilidade e

especificidade, melhorando assim os programas vigilância de AIE (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2021; RUSSI *et al.*, 2023).

6.1.2 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética

Por muito tempo, o conhecimento de sequências do genoma do EIAV foi restrito a apenas duas sequências foram identificadas: Wyoming, a primeira sequência EIAV obtida em 1997 dos EUA (PETROPOULOS, 1997), e Liaoning, isolada da China em 2007 (TU *et al.*, 2007). Atualmente, com o uso de novas tecnologias de sequenciamento, tem sido possível aumentar o conhecimento sobre as sequências do genoma do EIAV de amostras de equídeos em diferentes países: Miyazaki do Japão (DONG *et al.*, 2013); H3, F4, F3 e F2 da Irlanda (QUINLIVAN *et al.*, 2013); SA e DE da Itália (CAPPELLI *et al.*, 2017) foram adicionados aos bancos de sequências de nucleotídeos. Mais recentemente novas sequências completas e quase completas do genoma foram depositados no GenBank: Cornwall, Devon e Newmarket da Inglaterra (ROBINSON *et al.*, 2019); TN_0109, UKY98-07_PA_S15, NC_Dagmar e UKYE62_FL dos EUA (COOK *et al.*, 2019); Ecl_Gard_co e Bau_Gard_co na França (DESHIERE *et al.*, 2019); EIAV-SERB-1 na Sérvia (LUPULOVIC *et al.*, 2021). No Brasil, os primeiros genomas completos de dois animais naturalmente infectados, de amostras de cavalos de campo do Pantanal, uma região endêmica para AIE, foram recentemente descritos (MALOSSI *et al.*, 2020).

Em nosso estudo o DNA proviral de EIAV foi amplificado por PCR em 11 jumentos (8,8% - 11/124) e em um dos três cavalos (33,3% - 1/3), usando iniciadores da região do gene *tat-gag*, utilizados com sucesso em estudos na região do Pantanal/Brasil (CURSINO *et al.*, 2020) e foram obtidas seis sequências com identidade com outras sequências de EIAV disponíveis no *GenBank*, o sequenciamento confirmou a circulação do vírus. Esses resultados além de comprovar a circulação da EIAV na população de asininos errantes do Ceará-Brasil foram as primeiras abordagens moleculares com a espécie.

Além disso, empregando as sequências de EIAV dos asininos foram feitas análises filogenéticas comparando com sequências de cavalos do Pantanal brasileiro para a mesma região do genoma (CURSINO *et al.*, 2020). Estas análises favoreceram o maior conhecimento do EIAV circulante em jumentos no território brasileiro, uma espécie pouco estudada dentre a população de equídeos.

O agrupamento na árvore filogenética das seis sequências EIAV do Ceará e as oito sequências brasileiras em um único clado corrobora os altos valores de similaridade de nucleotídeos nesta região do genoma, entre as sequências brasileiras comparadas com outras sequências do mundo analisadas. Podemos também destacar que, embora os mais de 3000 km que separam as duas populações de equídeos, todas as sequências foram agrupadas no clado brasileiro. Os clados usando sequências de região tat-gag de referência do Japão, dos EUA, China e Irlanda e Itália se agruparam de forma semelhante às árvores do genoma completo (DESHIERE *et al.*, 2019).

Nossos resultados confirmaram a circulação do EIAV em jumentos e também em cavalos deste abrigo de animais recolhidos nas estradas do Ceará. Este fato é preocupante, pois os jumentos podem ser possíveis fontes de infecção para cavalos. Essa preocupação se eleva quando falamos em Nordeste brasileiro pois há um grande número de animais asininos abandonados nas estradas (FONSECA *et al.*, 2020).

6.1.3 Avaliações clínica e hematológica

Dos 124 asininos pertencentes a FPR foram identificados 66 animais (52% - 66/124) com sinais macroscopicamente evidentes de doença, sendo a presença de secreções ocular, lesões cutâneas, alopecia, diarreia e secreção nasal, as alterações mais observadas.

Foi também avaliado o EC dos animais, que é um índice importante para o controle em programas nutricionais, a prevenção de doenças metabólicas e o monitoramento de carga de trabalho. Este índice auxilia no monitoramento da condição corporal dos equídeos permitindo intervenções precoces no manejo, na dieta ou até mesmo como alerta para investigar possíveis doenças. Foi observado que 66,7% (68/102) dos animais apresentaram um EC ruim. Esses resultados porém não surpreendem considerando que a população é composta por animais apreendidos, abandonados em rodovias, colocados em fazendas desrespeitando quaisquer condições de bem-estar animal e sanidade.

Segundo Fonseca *et al.*, (2020), os maus tratos aos quais os animais são submetidos acabam gerando diversos distúrbios metabólicos como a hiperlipidemia, causada por stress e condições precárias de sobrevivência. Além dos distúrbios

metabólicos, o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas aumenta considerando o transporte massivo de animais e ambientes com falta de fiscalização.

A avaliação das mucosas pode conter informações valiosas sobre o estado de saúde do animal, além de ser uma avaliação simples, rápida e de grande importância, assim, a variação da coloração pode indicar distúrbios como anemias ou toxemias. Em animais saudáveis, as mucosas apresentarão uma coloração rosa claro, mucosas pálidas (hipocoradas), podendo ser indicativo de anemia, hipovolemia, perfusão tecidual inadequada e vasoconstrição periférica (SCHALM; JAIN, 2010). As mucosas hipocoradas dos animais estudados concorda com os resultados observados na avaliação hematológica de uma fração dos jumentos, onde o 45% dos animais apresentaram valores de Ht inferiores aos valores de referência para a espécie, indicando anemia (BARBOSA *et al.*, 2016; HARVEY, 2001).

Com relação aos resultados da avaliação hematológica dos 20 jumentos selecionados aleatoriamente na população, as médias observadas Ht = 31,75 %, PPT = 6,5 g/dL e o fibrinogênio = 290 g/dL. Quando os resultados são comparados com o estudo de RIBEIRO *et al.*, (2018) realizado com 45 asininos da mesma fazenda, foram obtidos médias inferiores para Ht e PPT, o que pode nos levar a concluir que a população estudada está sofrendo com distúrbios nutricionais ou metabólicos. Mas, se correlacionarmos a presença individual de alterações e a presença de infecção por EIAV, apenas dois animais positivos em ELISA gp90 apresentaram alterações, exibindo Ht abaixo dos valores de referência da literatura, caracterizando uma anemia, um dos sinais clínico mais relatados na AIE (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Dos resultados dos cavalos, os três cavalos EIAV-positivos que viviam na FPR apresentaram parâmetros sanguíneos na faixa de referência, exceto para um cavalo que apresentou trombocitopenia, conforme já descrito para esta doença (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013).

6.1.4 Acompanhamento clínico e laboratorial de um asinino naturalmente infectado pelo EIAV

Durante o estudo na FPR, também foi possível descrever a evolução clínica e laboratorial de um asinino naturalmente infectado pelo EIAV com todos os ensaios imunológicos e moleculares confirmando a infecção. É importante destacar que grande parte dos estudos caracteriza a infecção nos asininos como assintomática

(FONSECA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2017). O acompanhamento clínico desse jumento com sintomatologias de uma doença grave, apresentando sinais clínicos e alterações hematológicas semelhantes às descritas para cavalos é importante para ampliar o conhecimento sobre a patogênese da doença nesta espécie. Além de contribuir para a compreensão do papel dos jumentos na cadeia de transmissão e no curso da doença. O animal foi identificado durante um estudo epidemiológico em 124 jumentos na FPR.

Na primeira avaliação (dia 1), o animal apresentou diarreia, hemoconcentração, anemia microcítica normocrômica, neutrofilia e presença de linfócitos atípicos. Um dos principais achados em animais com AIE no exame hematológico é anemia, provocada pela destruição de eritrócitos por macrófagos, associada à adesão de complexos antígeno-anticorpo à membrana da célula, e ao dano direto do vírus às células precursoras eritróides da medula óssea (CRAIGO *et al.*, 2009). Na segunda avaliação clínica (dia 7), o jumento continuou apresentando diarreia, passando a apresentar mucosas ocular hipocoradas, concordando com a anemia observada desde a primeira avaliação. Na avaliação hematológica foram observadas as mesmas alterações do primeiro dia, apresentando trombocitopenia e adicionalmente, monocitose e aumento da contagem de neutrófilos segmentados. Trombocitopenia é a anormalidade laboratorial mais antiga e consistente observada em cavalos com AIE (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013). A contagem de plaquetas começa a diminuir antes de qualquer aumento na temperatura retal. A trombocitopenia é recorrente geralmente persistindo durante todo o período virêmico e pode se tornar grave o suficiente para provocar hemorragia, especialmente epistaxe ou hemorragias petequiais das membranas mucosas. A contagem de plaquetas geralmente aumenta rapidamente após a resolução da viremia (SELLON; FULLER; MCGUIRE, 1994). Na terceira avaliação (dia 14), o animal não apresentou diarreia, mas apresentou febre e edema de tórax. Os dados laboratoriais evidenciaram níveis elevados de fibrinogênio, com baixa relação PP: F, característica de processo inflamatório. A contagem de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados e eosinófilos aumentou em relação ao dia 7 e o animal apresentou leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda regenerativo, o que indica um leucograma inflamatório, e trombocitopenia. Em esfregaços sanguíneos observados em microscopia estavam presentes linfócitos atípicos, monócitos ativados, alteração tóxica em neutrófilos (grãos eosinofílicos), macroplacas foram observados, reforçando os achados de processo inflamatório. Na

última semana (dia 21), os sinais clínicos dos animais evoluíram para secreção nasal, diarreia, febre e edema de tórax e redução do escore corporal para 1,5. Os ensaios hematológicos demonstraram leucograma de estresse com leucocitose neutrofílica, linfopenia e eosinopenia. Foi observada agregação plaquetária. Esses achados são semelhantes aos sinais clínicos descritos para cavalos na fase crônica da doença, caracterizada pela recorrência de ciclos clínicos (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Durante episódios clínicos frequentes, o animal pode desenvolver anemia, perda de peso e edema. Alguns estudos forneceram a evidência inicial de uma correlação entre o nível de multiplicação do vírus, com o surgimento de novas amostras antigênicas do vírus e a gravidade da doença durante a infecção por lentivírus, o que poderia explicar as flutuações nas alterações clínicas observadas ao longo das avaliações (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004; SELLON; FULLER; MCGUIRE, 1994).

Portanto, foi possível observar nesse relato de caso que a infecção pelo EIAV em asininos pode resultar em alterações clínicas e laboratoriais semelhantes as já descritas em cavalos, a exemplo o primeiro relato de AIE descrito na literatura veterinária na França em 1843 por Lignee, onde foi relatado cavalos com ciclos recorrentes de febre, anemia, perda de peso e edema ventral (SELLON; FULLER; MCGUIRE, 1994), não sendo apropriado generalizar que as infecções nessas espécie são assintomáticas. Por fim, o DNA proviral amplificado foi sequenciado e alinhado com outras sequências para o genoma tat-gag EIAV de 272 nucleotídeos. As sequências brasileiras agruparam em um mesmo clado, enquanto que dentro deste clado, a sequência do jumento BRA-CE-J269 (ASININO) agrupa apenas com o genoma POCONE-BRA2. As sequências Brasil / Ceará agrupam próximas do clado da sequência do Japão – Miyazaki, com um valor de *bootstrap* de 59. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DLV18-8), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Japão (Miyazaki 2011 – A, Miyazaki 2011 – 5, Miyazaki 2011 – 25 e Miyazaki 2011 – 29), Irlanda (H3, F4, F3, F2) junto com três sequências da Itália (SA, DE, Ita1), formam quatro cladogramas separados, com elevados valores de *bootstrap*, conforme já demonstrado para a análise do genoma completo dessas sequências (DONG *et al.*, 2013; QUINLIVAN *et al.*, 2013), confirmando relatos que sugerem que o agrupamento das sequências baseado na localização geográfica (CAPOMACCIO *et al.*, 2012).

6.2 ANIMAIS DO PARQUE NACIONAL DE JERICOACOARA

6.2.1 Análises imunológicas para AIE

Com os resultados das análises imunológicas, fica clara a ocorrência de EIAV na Vila de Jericoacoara, no Parque Nacional de Jericoacoara. Se considerarmos que a AIE é uma doença que requer notificação imediata de qualquer caso suspeito, isolamento dos suspeitos e eutanásia dos casos confirmados, a ocorrência de 11,6% (considerando apenas o IDGA) em uma população isolada é uma grande preocupação, principalmente se comparado aos números de casos positivos notificados em todo o estado do Ceará, onde em uma população total de aproximadamente 76.903 cavalos. Em todo o estado foram notificados 263 casos no ano de 2019, sendo a prevalência de apenas 0,35% (BRASIL, 2017; MAPA, 2021).

Sabe-se que os dados oficiais de ocorrência de AIE são limitados a resultados de exames sorológicos dos laboratórios oficiais, assim muitos animais não são diagnosticados, pois a pesquisa sorológica é feita visando o controle da movimentação animal, mais do que para um programa sistemático de vigilância epidemiológica, assim a população testada em dados oficiais, em geral, não retratam a realidade (REIS *et al.*, 1994).

O Brasil envia à organização mundial de saúde animal, Informes zoossanitários semestrais sobre a ocorrência de doenças no país, entre essas doenças a anemia infecciosa equina. O último informe do Brasil, foi no segundo semestre de 2019, e no estado do Ceará foram notificados 143 casos. Em todo o país, foram notificados 2461 casos de AIE, desses apenas 954 casos foram sacrificados, restando muitos animais positivos sem controle. Estas informações unidas aos resultados dos testes imunológicos, nos leva ao questionamento sobre a eficácia dos programas de controle dessa doença no Estado do Ceará ou até no Brasil (MAPA, 2019).

Apesar do teste de IDGA ser mundialmente conhecido e escolhido pela sua especificidade é considerado um teste pouco sensível, o que leva ao aumento de diagnósticos falso-negativos (NARDINI *et al.*, 2017; NAVES *et al.*, 2019). A prevalência da infecção na população estudada mais que dobra se forem considerados os testes de diagnóstico mais sensível gp90 ELISA e p26 ELISA, obtendo uma prevalência de 36,6% (41/112) e 25,9% (29/112) de casos positivos, respectivamente. Os diferentes resultados obtidos entre os testes de IDGA e ELISA podem ser explicados pela diferença de sensibilidade (REIS *et al.*, 2012).

Sabe-se que o teste de ELISA é um teste capaz de detectar a infecção em estágio inicial porque é altamente sensível. Outra justificativa pode estar relacionada a dinâmica da infecção, onde anticorpos gp90 são produzidos primeiro, em maior nível e permanecem como a resposta de anticorpo predominante ao longo do curso da infecção (MONTELARO *et al.*, 1984; REIS *et al.*, 2012). Os diferentes resultados entre os dois ELISAs é justificada também pela dinâmica da infecção, onde alguns estudos demonstraram que os níveis de anticorpos específicos contra as glicoproteínas de superfície (gp90) do EIAV em cavalos com infecção persistente são mais de 100 vezes maiores que os níveis de anticorpos específicos para p26 (ISSEL *et al.*, 1988; MONTELARO *et al.*, 1984).

Esses achados são relatados em vários estudos, por exemplo em um surto de AIE ocorrido na Irlanda em 2006, onde o ELISA e o *immunoblotting* mostraram-se mais sensíveis do que o IDGA na detecção de casos agudos de EIA (CULLINANE *et al.*, 2007). Com isso, o teste de ELISA gp90 seria o mais adequado para o controle do EIAV numa população. Como a população do FPR não tem nenhum programa de controle da AIE, não se sabe se esses casos são de infecções recentes ou crônicas. A manutenção da vigilância nesse grande grupo de positivos seria o mais adequado, pois os animais positivos apenas em ELISA podem ser reservatórios, representando risco de transmissão para os outros animais. Como o ELISA é um ensaio mais sensível, se torne um excelente instrumento para o período de erradicação da doença.

6.2.2 Avaliações clínicas e hematológicas

Nas avaliações clínicas, foi possível observar que os animais apresentavam frequência respiratória média elevada e média de EC 2,5, sendo considerado ruim. (CARROLL; HUNTINGTON, 1988). Estes valores alterados podem ser justificados pelas condições ambientais, altas temperaturas e ambiente de praia arenosa com dunas, restingas e manguezais, que podem levar ao estresse térmico e físico, sendo grandes desafios ao aparelho locomotor que simulam exercícios físicos intensos, podendo gerar diversos distúrbios metabólicos, incluindo alterações no controle respiratório (WASSERMAN; WHIPP; CASABURI, 2011).

Apesar dos muitos relatos de formas clínicas da EIA com a presença de anemia e trombocitopenia, os valores médios hematológicos observados nos animais do estudo apresentavam valores dentro da normalidade, descartando anemia, principalmente na população de animais infectados por EIAV. Considerando outros

estudos é provável que os animais infectados dos estudo estivessem em fase inicial da doença (aguda) ou fase assintomática/ inaparente onde não apresentam sinais clínicos e apresentam baixos níveis de viremia (LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004).

Nos resultados das análises bioquímicas o estudo obteve um resultado surpreendente e de grande relevância para o entendimento da patogênese da infecção. Foi identificada uma associação entre alterações na concentração da GGT e a presença da infecção de EIAV. As enzimas hepáticas refletem a atividade do tecido hepático e podem ser importantes para avaliar possíveis alterações hepáticas. Estes resultados podem estar associadas à extensa multiplicação viral que ocorre no fígado (HARROLD *et al.*, 2000; MCGUIRE; CRAWFORD; HENSON, 1971). Esses resultados são semelhantes a achados de outras doenças crônicas, que também levam a alterações hepáticas. Santos; Leite; Reis, (2012) relata a observação de hepatoesplenomegalia em necropsias de animais infectados com EIAV, sendo um achado consistente com processo inflamatório. Os autores relatam ainda a presença de arquitetura lobular hepática acentuada resultante de uma infiltração de linfócitos e macrófagos na região periportal e nos lóbulos hepáticos, levando a uma hepatite não supurativa e de alterações microscópicas que consistem em uma infiltração de células linfóides no fígado.

6.2.3 Detecção de DNA proviral de EIAV e análise filogenética

Foi amplificado o DNA proviral do EIAV por PCR utilizando iniciadores da região do gene *tat-gag* em 26 cavalos e foi feito o sequenciamento de 17 desses amplificado de DNA, confirmando a circulação do vírus no Parque Nacional de Jericoacoara, assim como em equinos no Pantanal/Brasil (CURSINO *et al.*, 2020) e em jumentos no Ceará/Brasil (COSTA *et al.*, 2022) como descritos no início desse estudo. Vale ressaltar que dos 17 cavalos dos quais foram obtidas sequencias de EIAV, nove animais foram gp90 ELISA, p26 ELISA e AGID positivos, quatro destes animais foram gp90 ELISA e p26 ELISA positivos e AGID negativos e quatro foram positivos apenas no gp90 ELISA.

No Brasil, foram descritos os primeiros genomas completos de dois cavalos naturalmente infectados do Pantanal, POCONE – BRA1 e POCONE – BRA2 (MALOSSI *et al.*, 2020), assim, foi possível realizar análises filogenéticas comparando as sequências de EIAV obtidas neste estudo e sequências da região *tat-gag* dos

genomas POCONE – BRA1 e POCONE – BRA2, ampliando o conhecimento do EIAV que circula no território. No entanto, ainda é necessário ampliar o conhecimento do genoma do EIAV, o que permitirá rastrear a circulação do EIAV e contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico do EIAV.

Nas análises filogenéticas, o clado que agrupou as sequências brasileiras ficou dividido em pequenos grupos, corroborando o relatos que afirma haver alta variabilidade genômica no vírus da anemia infecciosa equina mesmo em populações da mesma região geográfica (CURSINO *et al.*, 2020; MALOSSI *et al.*, 2020; ROMO-SÁENZ *et al.*, 2021). Mas o agrupamento de todas as sequências em clados separados por países confirma a existência de altos valores de similaridade de nucleotídeos nessa região do genoma, *tat-gag* (COSTA *et al.*, 2022; CURSINO *et al.*, 2020).

Ainda, é possível especular sobre a possível origem dos vírus do Ceará baseado nas sequências de nucleotídeos. Poder ser observado que as sequências do Japão estão agrupadas próximas as sequências do Ceará/Brasil e apoiadas por um valor de *bootstrap* significativo (58).

6.2.4 Acompanhamento clínicos e sorológico de equídeos infectados pelo EIAV

Durante o acompanhamento sorológico e hematológico dos 34 animais naturalmente infectados pelo EIAV, foi possível observar resultados surpreendentes, como, e estes resultados podem ser justificados pela dinâmica de produção de anticorpos que ocorre durante o curso da infecção. Com um período de incubação que pode variar de uma a quatro semanas, durante o curso da infecção os anticorpos de neutralização aparecem apenas 38-87 dias após o início da infecção, e muitos não atingem níveis máximos até 90-148 dias pós infecção. Já os anticorpos contra a gp90 são detectáveis bem antes, em 7 a 10 dias após a infecção, atingindo um platô e permanecendo como a resposta de anticorpo predominante ao longo do curso da infecção. Além disso, os níveis de anticorpos específicos contra as glicoproteínas de superfície do EIAV são 102–103 vezes maiores que os níveis de anticorpos específicos para p26 (HAMMOND *et al.*, 2000; MONTELARO *et al.*, 1984; REIS, *et al.*, 2012).

Ao longo das avaliações clínicas foi possível comprovar essa detecção mais frequente dos anticorpos específicos contra gp90 em relação a p26. Os animais 1, 25,

27, 28,44, 59, 60, 64, 65, 74 e 75, foram positivos durante todo o estudo no ELISA gp90 e negativos em ELISA p26 no início ou durante as avaliações.

Os resultados do estudo do acompanhamento clínico de animais positivos também foi importante para comprovar que o teste de ELISA, principalmente com a gp90, é um ótimo teste de triagem. Considerando as atuais normas de controle da AIE, porém para a eutanásia do animal como forma de erradicação do vírus, não deve ser utilizado como teste único de diagnóstico. Corroborando com casos já relatados na literatura que afirmam haver falso-positivos no ELISA gp90 (OLIVEIRA *et al.*, 2017), entre os animais avaliados é provável que os animais 29, 18 e 32 fossem falsos-positivos, pois foram positivos durante a primeira avaliação e indeterminado ou negativo na segunda avaliação. O teste de ELISA gp90, se torna um excelente instrumento para a proposta de separação dos animais contrapondo a proposta de eutanásia.

O estudo do acompanhamento clínico de animais positivos também foi importante para demonstrar que os animais considerados indeterminados não devem ser desconsiderados ou tratados como negativos, pois durante o estudo observamos os animais 35 e 73 que para a segunda coleta foram positivos.

Em infecções por outros lentivírus, por exemplo por SIV, a multiplicação em primatas não humanos mantem altos níveis e não é efetivamente controlada por respostas imunes adaptativas. Já nas infecções por EIAV em equídeos ocorre o contrário, a ausência de doença clínica nos hospedeiros está correlacionada com cargas virais teciduais muito baixas, comprovando assim que o vírus mantem um controle da infecção e da resposta imune do hospedeiro. Uma vez controlada a fase de multiplicação viral aguda, o animal permanecerá livre de sinais clínicos evidentes até que ocorra a emergência de uma variante do vírus que pode escapar do sistema imunológico. Isto sugere que a imunidade adaptativa é o principal força motriz para a seleção de variantes virais (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013; HARROLD *et al.*, 2000).

O animal 19, é um dos exemplos em nosso estudo, pois na primeira coleta o soro foi positivo no ELISA gp90 e p26. Após um semestre, na segunda coleta o soro passou a ser positivo em IDGA (teste oficial). Analisando os resultados do hemograma, ficou claro na segunda coleta o animal passava por um possível processo inflamatório, apresentando aumento da concentração de fibrinogênio, leucocitose intensa e trombocitopenia. É possível que o animal tenha sofrido alguma imunossupressão, o que justificaria a positividade no IDGA. Estudos relatam que a

imunossupressão, que pode ser mediada por dexametasona ou estresse em portadores EIAV assintomático frequentemente induz o recrudescimento da doença como um resultado do aumento da multiplicação viral e o aparecimento de sinais clínicos (COOK; LEROUX; ISSEL, 2013; CRAIGO *et al.*, 2007; LEROUX; CADORÉ; MONTELARO, 2004). Essa correlação entre o aumento da absorbância nos testes de ELISA e a presença de uma possível imunossupressão e aparente processo inflamatório com recrudescimento da doença também foi observada nos animais 36, 59 e 35, Em todos esses animais foi observado aumento da concentração de fibrinogênio, que é considerado um indicador específico para inflamação (HOOIJBERG *et al.*, 2014).

Essa correlação também pode ser observada nos animais 18, 32, 41 e 78, mas de forma inversa, onde os soros dos animais foram positivos nos testes da primeira coleta e com hemogramas alterados, e na segunda coleta os animais apresentaram melhora nas taxas sanguíneas, como a diminuição na contagem total de leucócitos e diminuição dos níveis de absorbância no ELISA a ponto de serem considerados negativos.

Ainda, analisando os resultados das avaliações bioquímicas e relacionando ao achado no estudo relatado anteriormente, onde foi comprovado estatisticamente haver associação entre os níveis de GGT sérica e a presença de infecção por EIAV, podemos sugerir que a infecção e aumento na carga viral, podem levar ao aumento valores da concentração de GGT relacionado alterações hepáticas. No animal 19, os níveis de GGT e FA já eram elevados na primeira coleta, mas ocorreu um aumento de GGT na segunda coleta, quando ocorreu a seroconversão no IDGA. Essa associação também observada no animal 36, com três coletas, sendo que na segunda coleta ocorreu a redução do nível de absorbância e o teste foi considerado indeterminado no ELISA p26 redução do nível de GGT e FA. Na terceira coleta houve aumento da absorbância novamente, sendo positivo e ocorreram aumentos nos níveis de GGT e FA. Estes achados se repetem nos animais 59 e 35, mas os valores se mantem nos níveis de normalidade para GGT.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmaram a circulação de EIAV em animais errantes que circulam nas estradas do estado do Ceará (jumentos e cavalos) e em cavalos do Parque Nacional de Jericoacoara, Ceará, Brasil. Além disso, comprovamos a baixa positividade nos soros empregando IDGA. Nossos estudos mostram a importância do uso de múltiplos testes sorológicos com diferentes proteínas virais que pode reduzir o número de resultados falso-positivos e falso-negativos, e ainda a importância do uso dos diagnósticos moleculares. O diagnóstico de AIE pode ser aprimorado combinando ELISA e IDGA, sendo que a velocidade e alta sensibilidade do gp90 ELISA o tornam ideal para triagem de casos suspeitos de AIE. Assim, nossos resultados indicam a dificuldade de implementação de um teste padrão-ouro. Ainda, os testes moleculares, sendo as primeiras abordagens moleculares em jumentos, confirmamos a alta circulação da infecção natural EIAV em jumentos, mostrando que as sequências de EIAV do Ceará se agrupam com outras sequências brasileiras em um único clado, além de confirmarem a alta circulação da infecção natural por EIAV. Nossos resultados também mostram que os testes ELISA gp90 são confiáveis, mas o acompanhamento clínico laboratorial pode indicar a presença de falsos-positivos. Também é possível especular sobre a possível origem do EIAV do Ceará, pois as sequências estão agrupadas próximas sequências do Japão apoiadas por um valor de *bootstrap* significativo, ou as sequências do Japão são originárias do Brasil. Nossos resultados também indicam que as formas atuais de controle da AIE são questionáveis e não há alterações clínicas relacionadas à infecção na área de estudo. As alterações no nível de GGT, possivelmente associadas a alterações hepáticas, nos animais infectados sugerem um bom marcador bioquímico. Também foi possível descrever a evolução clínica e laboratorial de um jumento naturalmente infectado por EIAV, comprovando que a espécie apresenta sintomatologia semelhante à descrita em cavalos. Todos os resultados foram enviados às instituições responsáveis pela saúde animal no Ceará (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA e Agência de Defesa Agropecuária do Ceará – ADAGRI). Também, como resultado dos estudos, um plano de contingência para as principais doenças equinas foi elaborado e implantado tanto na FPR, quanto no Parque Nacional de Jericoacoara. Os resultados gerados nesse estudo podem auxiliar no direcionamento das políticas públicas de controle da AIE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F.; HADDAD, J. P. A.; DIAS, R. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Anemia infecciosa equina: Prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 58, no. 2, p. 141–148, 2006. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2004.12.012.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, vol. 215, no. 3, p. 403–410, 1990. DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

BACCAM, P.; THOMPSON, R. J.; LI, Y.; SPARKS, W. O.; BELSHAN, M; DORMAN, K. S.; WANNEMUEHLER, Y.; OAKS, J. L.; CORNETTE, J. L.; CARPENTER, S. Subpopulations of equine infectious anemia virus Rev coexist in vivo and differ in phenotype. **Journal of Virol**, vol. 77, no. 22, p. 12122–12131, 2003. DOI 10.1128/JVI.77.22.12122.

BARBOSA, B. de L.; SILVA, G. B. da.; Silva, C. J. F. L. da.; FERREIRA, L. M. C.; MANSO, H. E. C. da C. C.; MANSO FILHO, H. C. Blood, metabolic and endocrine biomarkers in donkeys (*equus africanus asinus*) supplemented with different energy sources. **Acta Veterinaria Brasilica**, vol. 10, no. 2, p. 135–143, 2016. DOI: 10.21708/avb.2016.10.2.5538.

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N. J.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, vol. 101, no. 3, p. 199–208, 2004. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.04.006.

BORGES, A. M. C. M.; SILVA, L. G.; NOGUEIRA, M. F.; OLIVEIRA, A. C. S.; SEGRI, N. J.; FERREIRA, Fe.; WITTER, R.; AGUIAR, D. M. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. **Research in Veterinary Science**, vol. 95, no. 1, p. 76–81, 2013. DOI 10.1016/j.rvsc.2013.02.011.

BRASIL. Censo Agropecuário. 2017. **IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?edicao=25757&t=resultados>. Acesso em: 4 jan. 2023.

BRASIL. Coordenação de informação e epidemiologia - Saúde Animal. 2023. **MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>. Acesso em: 3 mar. 2023.

BRASIL. **Instrução Normativa N° 17**, de 8 de maio de 2008. Instituir o Programa Nacional de Sanidade dos Eqüídeos -PNSE. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento secretaria de defesa agropecuária, p. 1, 2008.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 45**, de 15 de junho de 2004. Aprovar as Normas para a Prevenção e o Controle da Anemia Infecciosa Equina - A.I.E. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento secretaria de defesa agropecuária, p. 1–13, 2004.

BRASIL. **Portaria nº 378**, de 17 de dezembro de 2014. ANEXO - Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de anemia infecciosa equina. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento secretaria de defesa agropecuária, 2014.

BRASIL. **Portaria nº 84**, de 19 de outubro de 1992. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Anemia Infecciosa Equina. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento secretaria de defesa agropecuária, p. 1–9, 1992.

CAPOMACCIO, S.; CAPPELLI, K.; COOK, R. F.; NARDI, F.; GIFFORD, R.; MARENZONI, M. L.; PASSAMONTI, F. Geographic structuring of global EIAV isolates: A single origin for New World strains? **Virus Research**, vol. 163, no. 2, p. 656–659, 2012. DOI 10.1016/j.virusres.2011.11.011.

CAPPELLI, K.; COOK, R. F.; STEFANETTI, V.; PASSAMONTI, F.; AUTORINO, G. L.; SCICLUNA, M. T.; COLETTI, M.; SUPPLIZI, A. V.; CAPOMACCIO, S. Deep sequencing and variant analysis of an Italian pathogenic field strain of equine infectious anaemia virus. **Transbound and Emerging Diseases**, vol. 64, p. 2104–2112, 2017. DOI: 10.1111/tbed.12631

CARNEIRO, G. F.; LUCENA, J. E. C.; BARROS, L. de O. The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, vol. 65, p. 106–110, 2018. DOI 10.1016/j.jevs.2018.03.007.

CARROLL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. **Equine Veterinary Journal**, vol. 20, p. 41–45, 1988. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x.

CEARÁ, SECRETARIA DO TURISMO DO ESTADO DO CEARÁ. **Evolução recente do turismo no Ceará 2010/19**. Fortaleza, 2019. 18p

CHEN, C.; LI, F.; MONTELARO, R. C. Functional Roles of Equine Infectious Anemia Virus Gag p9 in Viral Budding and Infection Functional Roles of Equine Infectious Anemia Virus Gag p9 in Viral Budding and Infection. **Journal of virology**, vol. 75, no. 20, p. 9762–9770, 2001. DOI: 10.1128/JVI.75.20.9762-9770.2001

CHONG, Y. H.; BALL, J. M.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C.; RUSHLOW, K. E. Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp45) of equine infectious anemia virus. **Journal of virology**, vol. 65, no. 2, p. 1013–1018, 1991. DOI: 10.1128/JVI.65.2.1013-1018.1991

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections . **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 9, no. 1, p. 100–117, 1996.

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

COOK, R. F.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. **Veterinary Microbiology**, vol. 167, no. 1–2, p. 181–204, 2013. DOI 10.1016/j.vetmic.2013.09.031.

COOK, S. J.; COOK, R. F.; MONTELARO, R. C.; ISSEL, C. J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. **Veterinary Microbiology**, vol. 79, no. 2, p. 93–109, 2001. DOI 10.1016/S0378-1135(00)00348-5.

COOK, S. J.; LI, G.; ZHENG, Y.; WILLAND, Z. A.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F. Molecular Characterization of the Major Open Reading Frames (ORFs) and Enhancer Elements From Four Geographically Distinct North American Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) Isolates. **Journal of Equine Veterinary Science**, vol. 85, 2019. DOI 10.1016/j.jevs.2019.102852.

COSTA, V. M. D.; CURSINO, A. E.; FRANCO LUIZ, A. P. M.; BRAZ, G. F.; CAVALCANTE, P. H.; SOUZA, C. de A.; SIMPLÍCIO, K. M. de M. G.; DRUMOND, B. P.; LIMA, M. T.; TEIXEIRA, B. M.; KROON, E. G. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): Evidence of Circulation in Donkeys from the Brazilian Northeast Region. **Journal of Equine Veterinary Science**, vol. 108, p. 103795, 2022. DOI 10.1016/j.jevs.2021.103795.

COUTINHO, L. C. de A.; DE JESUS, A. L. S.; FONTES, K. F. L. de P.; COIMBRA, E. C.; MARIZ, F. C.; DE FREITAS, A. C.; MAIA, R. de C. C.; DE CASTRO, R.S. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, vol. 191, no. 2, p. 95–100, 2013. DOI 10.1016/j.jviromet.2013.04.006.

CRAIGO, J. K.; BARNES, S.; ZHANG, B.; COOK, S. J.; HOWE, L.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. **Retrovirology**, vol. 6, p. 95, 2009. DOI 10.1186/1742-4690-6-95.

CRAIGO, J. K.; DURKIN, S.; STURGEON, T. J.; TAGMYER, T.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. **Vaccine**, vol. 25, no. 5, p. 834–845, 2007. DOI 10.1016/j.vaccine.2006.09.040.

CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious anemia virus infection and immunity. **Viruses**, vol. 5, no. 12, p. 2963–2976, 2013. DOI 10.3390/v5122963.

CULLINANE, A.; QUINLIVAN, M.; NELLY, M.; PATTERSON, H.; KENNA, R.; GARVEY, M.; GILDEA, S.; LYONS, P.; FLYNN, M.; GALVIN, P.; NEYLON, M.; JANKOWSKA, K. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. **Veterinary Record**, vol. 161, no. 19, p. 647–652, 2007. DOI 10.1136/vr.161.19.647

CURSINO, A. E.; LIMA, M. T.; NOGUEIRA, M. F.; DE AGUIAR, D. M.; FRANCO LUIZ, A. P. M.; ALVES, P. A.; ARAUJO JUNIOR, J. P.; KROON, E. G. Identification of large genetic variations in the equine infectious anemia virus tat-gag genomic region. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 0–3, 2020. DOI 10.1111/tbed.13946.

CURSINO, A. E.; VILELA, A. P. P.; FRANCO-LUIZ, A. P. M.; OLIVEIRA, J. G. de; NOGUEIRA, M. F.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; AGUIAR, D. M. de; KROON, E. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. **Archives of Virology**, vol.163, no. 9, p.2385-2394, 2018. DOI 10.1007/s00705-018-3877-8.

DESHIERE, A.; BERTHET, N.; LECOUTURIER, F.; GAUDAIRE, D.; HANS, A. Molecular characterization of Equine Infectious Anemia Viruses using targeted sequence enrichment and next generation sequencing. **Virology**, vol. 537, p. 121–129, 2019. DOI 10.1016/j.virol.2019.08.016.

DOMÍNGUEZ, M. C. R.; MONTES-DE-OCA-JIMÉNEZ, R.; CHAGOYAN, J. C. V.; PLIEGO, A. B.; GUERRERO, J. A. V.; GONZÁLEZ, L. I. C.; BERNABÉ, S. L. Evaluation of Equine Infectious Anemia Virus by the Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay EIA-LAB as Screening Tools in Mexico. **Journal of Equine Veterinary Science**, vol. 98, 2021. DOI 10.1016/j.jevs.2021.103372.

DONG, J. B.; ZHU, W.; COOK, F. R.; GOTO, Y.; HORII, Y.; HAGA, T. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. **Archives of Virology**, vol. 157, no. 11, p. 2105–2111, 2012. DOI 10.1007/s00705-012-1406-8.

DONG, J. B.; ZHU, W.; COOK, F. R.; GOTO, Y.; HORII, Y.; HAGA, T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. **Journal of General Virology**, vol. 94, p. 360–365, 2013. DOI 10.1099/vir.0.047498-0.

DONG, J.; COOK, F. R.; HAGA, T.; HORII, Y.; NORIMINE, J.; MISAWA, N.; GOTO, Y.; ZHU, W. Comparative analysis of LTR and structural genes in an equine infectious anemia virus strain isolated from a feral horse in Japan. **Archives of Virology**, vol. 159, no. 12, p. 3413–3420, 2014. DOI 10.1007/s00705-014-2206-0.

FONSECA, L. S. da; NASCIMENTO, R. C. M. do; CARVALHO, A. C.; GRABOSCHII, A. C. G.; VARGAS, Y. G. de M.; SILVA, A. R.; ESCODRO, P. B. O extrativismo de jumentos para exportação de pele no nordeste do Brasil: visão geral e aspectos sanitários. In: **ATENA**, ed 02. Ponta Grossa, 2020. **Estudos em zootecnia e ciência animal** 2. p. 242–259. DOI 10.22533/at.ed.12420240429.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C. Anemia infecciosa equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 18, no. 1, p. 197–207, 2011.

GONÇALVES, C. M.; RIBEIRO, R. M. G. Anemia infecciosa equina: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, vol. 4, p. 1–3, 2005.

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

HAMMOND, S. A.; LI, F.; MCKEON, SR., B. M.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Immune Responses and Viral Replication in Long-Term Inapparent Carrier Ponies Inoculated with Equine Infectious Anemia Virus. **Journal of virology**, vol. 74, no. 13, p. 5968–5981, 2000. DOI 10.1128/jvi.74.13.5968-5981.2000.

HARROLD, S. M.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; RUSHLOW, K. E.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Tissue Sites of Persistent Infection and Active Replication of Equine Infectious Anemia Virus during Acute Disease and Asymptomatic Infection in Experimentally Infected Equids. **Journal of Virology**, vol. 74, no. 7, p. 3112–3121, 2000. DOI 10.1128/jvi.74.7.3112-3121.2000.

HARVEY, J. W. **Atlas of veterinary hematology blood and bone marrow of domestic animals**. Philadelphia, PA,USA: Elsevier's Health Sciences Rights Departmen, 2001.

HAWKINS, J. A.; ADAMS, W. V.; WILSON, B. H.; ISSEL, C. J.; ROTH, E. E. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 168, p. 63–64, 1976.

HENSON, J. B.; MCGUIRE, T. C. Immunopathology of equine infectious anemia. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 56, no. 3, p. 306–313, 1971. DOI [10.1093/ajcp/56.3.306](https://doi.org/10.1093/ajcp/56.3.306)

HOOJBERG, E. H.; VAN DEN HOVEN, R.; TICHY, A.; SCHWENDENWEIN, I. Diagnostic and Predictive Capability of Routine Laboratory Tests for the Diagnosis and Staging of Equine Inflammatory Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, vol. 28, no. 5, p. 1587–1593, 2014. DOI 10.1111/jvim.12404.

ICMBIO, Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade. **Divisão de negócios , planejamento e licitações anexo a – caracterização do parque nacional de jericoacoara**. Brasília, 2021.

ICTV. Taxonomia do EIAV. 2022. **Taxonomia do EIAV**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acessado em: 4 Jan. 2023.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A Review of Techniques for the Serologic Diagnosis of Equine Infectious Anemia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 5, no. 1, p. 137–141, 1993. DOI 10.1177/104063879300500136.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; MEALEY, R. H.; HOROHOV, D. W. Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it? **Vet Clin North Am Equine Pract.**, vol. 3, p. 561–77, 2014. DOI 10.1016/j.cveq.2014.08.002.

ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 184, p. 293–

297, 1984.

ISSEL, C. J.; SCICLUNA, M. T.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; CAPRIOLI, A.; RICCI, I.; ROSONE, F.; CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C.; AUTORINO, G. L. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. **Veterinary Record**, vol. 172, no. 8, p. 210, 2013. DOI 10.1136/vr-2012-100735.

ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of the American Veterinary Medical Association American**, vol. 174, no. 7, p. 727–733, 1979.

ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasts. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, vol. 34, no. 2, p. 513–523, 2015. DOI [10.20506/rst.34.2.2376](https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2376)

ISSEL, C. J.; RUSHLOW, K.; FOIL, L. D.; MONTELARO, R. C. A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. **Veterinary Microbiology**, vol. 17, no. 3, p. 251–286, 1988. DOI 10.1016/0378-1135(88)90069-7.

JIN, S.; CHEN, C.; MONTELARO, R. C. Equine infectious anemia virus Gag p9 function in early steps of virus infection and provirus production. **Journal of Virology**, vol. 79, no. 14, p. 8793–8801, 2005. DOI 10.1128/JVI.79.14.8793.

KREBS, F. C.; HOGAN, T. H.; QUITERIO, S. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. **HIV sequence compendium**, vol. 2001, p. 29–70, 2001. DOI 10.3171/jns.2004.100.2.0215.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 35, no. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI 10.1093/molbev/msy096.

LEROUX, C.; CADORÉ, J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary Research**, vol. 35, no. 3, p. 485–512, 2004. DOI 10.1051/vetres.

LI, F.; LEROUX, C.; CRAIGO, J. K.; COOK, S. J.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. The S2 gene of equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. **Journal of Virology**, vol. 74, no. 1, p. 573–9, 2000. DOI 10.1128/JVI.74.1.573-579.2000.

LI, J.; ZHANG, X.; BAI, B.; ZHANG, M.; MA, W.; LIN, Y.; WANG, X.; WANG, X.-F. Identification of a Novel Post-transcriptional Transactivator from the Equine Infectious Anemia Virus. **Journal of Virology**, v. 96, n. 24, p. 1–17, 2022.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, p. 56, 2016.

LIN, Y. Z.; YANG, F.; ZHANG, S. Q.; SUN, L. K.; WANG, X. F.; DU, C.; ZHOU, J. H. The soluble form of the EIAV receptor encoded by an alternative splicing variant inhibits EIAV infection of target cells. **Plos one**, vol. 8, no. 11, p. 1–9, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0079299.

LUPULOVIC, D.; SAVIĆ, S.; GAUDAIRE, D.; BERTHET, N.; GRGIĆ, Ž.; MATOVIĆ, K.; DESHIERE, A.; HANS, A. Identification and genetic characterization of equine infectious anemia virus in Western Balkans. **BMC Veterinary Research**, vol. 17, no. 1, p. 1–6, 2021. DOI 10.1186/s12917-021-02849-2.

MACHADO, G.; CORBELLINI, L. G.; FRIAS-DE-DIEGO, A.; DIEH, G. N.; DOS SANTOS, D. V.; JARA, M.; DE FREITAS COSTA, E. Impact of changes of horse movement regulations on the risks of equine infectious anemia: A risk assessment approach. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 190, p. 105319, 2021. DOI 10.1016/j.prevetmed.2021.105319.

MALOSI, C. D.; FIORATTI, E. G.; CARDOSO, J. F.; MAGRO, A. J.; KROON, E. G.; DE AGUIAR, D. M.; BORGES, A. M. C. M.; NOGUEIRA, M. F.; ULLMANN, L. S.; ARAUJO JUNIOR, J. P. High genomic variability in equine infectious anemia virus obtained from naturally infected horses in Pantanal, Brazil: An endemic region case. **Viruses**, vol. 12, no. 2, p. 1–15, 2020. DOI 10.3390/v12020207.

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Informe semestral para la notificación de la presencia de enfermedades de la lista de la oie**. Brasília, 2019.

MAPA, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Distribuição temporal dos casos. 2021. **Sistema Nacional de Informação Zoossanitária - SIZ**. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>. Acesso em: 4 Jan. 2023.

MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. **Journal of virology**, vol. 68, no. 10, p. 6270–6279, 1994. DOI [10.1128/JVI.68.10.6270-6279.1994](https://doi.org/10.1128/JVI.68.10.6270-6279.1994)

MAURY, W. Regulation of equine infectious anemia virus expression. **Journal of biomedical science**, vol. 5, no. 1, p. 11–23, 1998. DOI [10.1007/BF02253351](https://doi.org/10.1007/BF02253351)

MCGUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B.; HENSON, J. B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. **The American journal of pathology**, vol. 62, no. 2, p. 283–294, 1971.

MCGUIRE, T. C.; FRASER, D. G.; MEALEY, R. H. Cytotoxic T lymphocytes in protection against equine infectious anemia virus. **Animal Health Research Reviews**, vol. 5, no. 2, p. 271–276, 2004. DOI 10.1079/AHR200482.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MELO, R. M.; CAVALCANTI, R. C.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; AGUIAR, D. M. Ocorrência de equídeos soropositivos para os vírus

das encefalomyelites e anemia infecciosa no estado de Mato Grosso. **Arquivo Instituto Biológico**, vol. 79, no. 2, p. 169–175, 2012.

MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A.; ISSEL, C. J. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. **The Journal of biological chemistry**, vol. 259, no. 16, p. 10539–44, 1984.

NARDINI, R.; AUTORINO, G. L.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; SCICLUNA, M. T. Evaluation of six serological ELISA kits available in Italy as screening tests for equine infectious anaemia surveillance. **BMC Veterinary Research**, vol. 13, no. 1, p. 1–8, 2017. DOI 10.1186/s12917-017-1007-6.

NARDINI, R.; AUTORINO, G. L.; RICCI, I.; FRONTOSO, R.; ROSONE, F.; SIMULA, M.; SCICLUNA, M. T. Validation according to OIE criteria of a monoclonal, recombinant p26-based, serologic competitive enzyme-linked immunosorbent assay as screening method in surveillance programs for the detection of Equine infectious anemia virus antibodies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 28, no. 2, p. 88–97, 2016. DOI 10.1177/1040638715625092.

NAVES, J. H. F.F.; OLIVEIRA, F. G.; BICALHO, J. M.; SANTOS, P. S.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; LEITE, R. C.; REIS, J. K.P. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. **Journal of Virological Methods**, vol. 266, p. 49–57, 2019. DOI 10.1016/j.jviromet.2018.12.009.

WOAH. Equine infectious anaemia. **OIE Terrestrial Manual 2013**, p. 1–6, 2013. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.06_EIA.pdf. Acesso em: 4 Jan. 2023

WOAH. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2022. **World Organisation for Animal Health**. 2022. Disponível em: https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/?_tax_animal=terrestrials%2Cequine. Acesso em: 4 Jan 2023.

OLIVEIRA, F. G.; COOK, R. F.; NAVES, J. H.F.; OLIVEIRA, C. H.S.; DINIZ, R. S.; FREITAS, F. J.C.; LIMA, J. M.; SAKAMOTO, S. M.; LEITE, R. C.; ISSEL, C. J.; REIS, J. K.P. Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 140, p. 30–37, 2017. DOI 10.1016/j.prevetmed.2017.02.015.

PÁDUA, B. R. de; DIAS, R. A.; FIORAVANTI, M. C. S.; BORSANELLI, A. C. Seroprevalence and risk factors associated with equine infectious anemia in the state of Goiás, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 209, 2022. DOI 10.1016/j.prevetmed.2022.105781.

PARÉ, J.; SIMARD, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, vol. 68, no. 4, p. 254–258, 2004. DOI 10.22533/at.ed.124202404.

PARREIRA, D. R. “**Coinfecção por trypanosoma evansi (STEEL 1885), BALBIANI 1888, e pelo vírus da anemia infecciosa equina em cavalos do pantanal sul-matogrossense**”. 2009. p. 1-91. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

PASICK, J. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct Species or Quasispecies and its Implications for Laboratory Diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, vol. 62, no. 4, p. 241–244, 1998.

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

QUINLIVAN, M.; COOK, F.; KENNA, R.; CALLINAN, J. J.; CULLINANE, A. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. **Journal of General Virology**, vol. 94, no. 3, p. 612–622, 2013. DOI 10.1099/vir.0.047191-0.

RAVAZOLLO, A.M.; COSTA, U.M. **Retroviridae**. In: Flores EF, editor. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, p.809-38, 2007.

REIS, J. K. P. dos; MELO, L. M.; RZENDE, M. R.; LEITE, R. C. Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anaemia focus. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 26, no. 2, p. 65–68, 1994. DOI 10.1007/BF02239899.

REIS, J. K. P. dos; LEITE, R. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 20, p. 0–6, 1994. DOI 10.1016/0167-5877(94)90059-0

REIS, J. K. P. dos. **Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da anemia infecciosa eqüina, para uso em imunodiagnóstico**. 1997. p. 184. Tese de Doutorado (Escola de Veterinária da UFMG) - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 1997.

REIS, J. K. P.; DINIZ, R. S.; HADDAD, J. P. A.; FERRAZ, I. B. F.; CARVALHO, A. F.; KROON, E. G.; FERREIRA, P. C. P.; LEITE, R. C. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. **Journal of Virological Methods**, vol. 180, no. 1–2, p. 62–67, 2012. DOI 10.1016/j.jviromet.2011.12.012.

RESENDE, C. F.; SANTOS, A. M.; COOK, R. F.; VICTOR, R. M.; CÂMARA, R. J. F.; GONÇALVES, G. P.; LIMA, J. G.; MACIEL E SILVA, A. G.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. dos. Low transmission rates of Equine infectious anemia virus (EIAV) in foals born to seropositive feral mares inhabiting the Amazon delta region despite climatic conditions supporting high insect vector populations. **BMC Veterinary Research**, vol. 18, no. 1, p. 1–11, 2022. DOI 10.1186/s12917-022-03384-4.

RIBEIRO, R. M.; DUARTE, P. de C.; VIANA, V. A.; ARAÚJO, M. L. C.; PEDROZA, H. de P.; RIBEIRO, D. da S. F. Hemograma e bioquímica sérica de jumentos da região

norte e noroeste do ceará – Brasil. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, vol. 5, no. 1, p. 038, 2018. DOI 10.4025/revcivet.v5i1.37830.

ROBINSON, D. L. W. D.; LOCKER, N.; STEINBACH, F.; CHOUDHURY, B. Molecular characterization of equine infectious anaemia virus strains detected in England in 2010 and 2012. **Transbound and Emerging Diseases**, vol. 66, no. 6, p. 2311 - 2317, 2019. DOI 10.1111/tbed.13286.

ROMO-SÁENZ, C. I.; TAMEZ-GUERRA, P.; OLIVAS-HOLGUIN, A.; RAMOS-ZAYAS, Y.; OBREGÓN-MACÍAS, N.; GONZÁLEZ-OCHOA, G.; ZAVALA-DÍAZ DE LA SERNA, F. J.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; TAMEZ-GUERRA, R.; GOMEZ-FLORES, R. Molecular detection of equine infectious anemia virus in clinically normal, seronegative horses in an endemic area of Mexico. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 36, no. 4, p. 758-761, 2021. DOI 10.1177/10406387211006195.

RUSSI, R. C.; GARCIA, L.; CÂMARA, M. S.; SOUTULLO, A. R. Validation of an indirect in-house ELISA using synthetic peptides to detect antibodies anti-gp90 and gp45 of the equine infectious anaemia virus. **Equine Veterinary Journal**, vol. 55, no. 1, p. 111–121, 2023. DOI 10.1111/evj.13555.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada a experimentação animal**. 2nd ed. Belo Horizonte: Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, 2002.

SANTOS, E. M. dos; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. dos. **Anemia infecciosa equina**. 64th ed. Belo Horizonte: Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, 2012.

SAXENA, S. K.; CHITTI, S. V. Molecular Biology and Pathogenesis of Retroviruses. **Advances in molecular retrovirology**, vol. 6, p. 111–133, 2016. DOI 10.5772/7111.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2010.

SCICLUNA, M. T.; ISSEL, C. J.; COOK, F. R.; MANNA, G.; CERSINI, A.; ROSONE, F.; FRONTOSO, R.; CAPRIOLI, A.; ANTONETTI, V.; AUTORINO, G. L. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? **Veterinary Microbiology**, vol. 165, no. 1–2, p. 123–134, 2013. DOI 10.1016/j.vetmic.2013.02.027.

SELLON, D. C.; RUSSELL, K. E.; MONROE, V. L.; WALKER, K. M. Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. **Research in Veterinary Science**, vol. 66, no. 1, p. 77–80, 1998. DOI 10.1053/rvsc.1998.0245.

SELLON, D. C.; FULLER, F. J.; MCGUIRE, T. C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. **Virus Research**, vol. 32, p. 111–138, 1994. DOI 10.1016/0168-1702(94)90038-8.

SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSELL, K. E.; PERRY, S. T.; COVINGTON, P.; FULLER, F. J. Equine Infectious Anemia Virus Replication Is Upregulated during Differentiation of Blood Monocytes from Acutely Infected Horses. **Journal of Virology**, vol. 70, no. 1, p. 590–594, 1996. DOI [10.1128/JVI.70.1.590-594.1996](https://doi.org/10.1128/JVI.70.1.590-594.1996).

SILVA, R. A. M. S., DE ABREU, U. G. P.; DE BARROS, A. T. M. **Anemia Infecçiosa Eqüina**: Epizootiologia , Prevenção e Controle no Pantanal. Circular Técnica, 29, Corubá: Embrapa - Pantanal, p. 1–32, 2001.

SILVA, C. F.; PEQUENO, N. F.; CLEMENTINO, I. J.; AZEVEDO, S. S de; SILVA, A. Frequência de anemia infecciosa equina em equinos nos estados da Paraíba , Rio Grande do Norte e Ceará durante o ano de 2010. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, vol. 50, no. 1, p. 12–17, 2013.

SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; BILLINIS, Ch; KOUMBATI, M.; VLEMMAS, J.; KOPTOPOULOS, G. Equine infectious anemia in mules: Virus isolation and pathogenicity studies. **Veterinary Microbiology**, vol. 95, no. 1–2, p. 49–59, 2003. DOI [10.1016/S0378-1135\(03\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00151-2).

STAKE, M. S.; BANN, D. V.; KADDIS, R. J.; PARENT, L. J. Nuclear trafficking of retroviral RNAs and gag proteins during late steps of replication. **Viruses**, vol. 5, no. 11, p. 2767–2795, 2013. DOI [10.3390/v5112767](https://doi.org/10.3390/v5112767).

STUCKY, B. J. Seqtrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**, vol. 23, no. 3, p. 90–93, 2012. DOI [10.7171/jbt.12-2303-004](https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004).

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 10, no. 3, p. 512–526, 1993. DOI [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023).

TIGRE, D. M.; BRANDÃO, C. F. L.; DE PAULA, F. L.; CHINALIA, F. A.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil. **Archives of Virology**, vol. 162, no. 3, p. 873–877, 2016. DOI [10.1007/s00705-016-3172-5](https://doi.org/10.1007/s00705-016-3172-5).

TORNQUIST, S. J.; OAKS, J. L.; CRAWFORD, T. B. Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anaemia. **Journal of General Virology**, vol. 78, no. 10, p. 2541–2548, 1997. DOI [10.1099/0022-1317-78-10-2541](https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2541).

TU, Y. B.; ZHOU, T.; YUAN, X. F.; QIU, H. J.; XUE, F.; SUN, C. Q.; WANG, L.; WU, D. L.; PENG, J. M.; KONG, X. G.; TONG, G. Z. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. **Archives of Virology**, vol. 152, no. 1, p. 209–218, 2007. DOI [10.1007/s00705-006-0830-z](https://doi.org/10.1007/s00705-006-0830-z).

WASSERMAN, K.; WHIPP, B. J.; CASABURI, R. Respiratory Control During Exercise. **Comprehensive Physiology**, p. 595 - 619, 2011. DOI [10.1002/cphy.cp030217](https://doi.org/10.1002/cphy.cp030217).

WILLIAMS, D. L.; ISSEL, C. J.; STEELMAN, C. D.; ADAMS, W. V.; BENTON, C. V. Studies with equine infectious anemia virus: Transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. **American Journal of Veterinary Research, Schaumburg**, vol. 42, no. 9, p. 1469–1473, 1981.

YAO, Q.; MA, J.; WANG, X.; GUO, M.; LI, Y.; WANG, X. A pilot study on interaction between donkey tetherin and EIAV stains with different virulent and replication characteristics. **Microbial Pathogenesis**, vol. 106, p. 65–68, 2016. DOI 10.1016/j.micpath.2016.10.019.

ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J.; LI, F.; MONTELARO, R. C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 102, no. 28, p. 9918–23, 2005. DOI 10.1073/pnas.0501560102.

ZHANG, X.; LI, J.; ZHANG, M.; BAI, B.; MA, W.; LIN, Y.; GUO, X.; WANG, X.-F.; WANG, X. A Novel, Fully Spliced, Accessory Gene in Equine Lentivirus with Distinct Rev-Responsive Element. **Journal of Virology**, v. 96, n. 18, p. 1–15, 2022.

ANEXOS

Tabela 15. Resultados dos hemogramas: Resultados dos hemogramas dos animais acompanhados e que tiveram variações significativas na absorbância dos ELISAS gp90 e p26 (TODOS OS ANIMAIS).

ID	COLETA	DATA	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26	PP (g/dL)	FIBRINOGENIO (g/dL)	HM (X 106 céls/ μ L)	VG (%)	HG (g/dL)	LEUCÓCITOS (céls/ μ L)	PLAQUETAS (X 103 / μ L)
13	1 ^a	22/07/2019	P	3,13	1,85	8,20	600,00	7,40	31,00	10,30	9.870,00	101,00
	2 ^a	17/01/2020	P	3,24	2,42	7,20	200,00	7,14	30,00	10,00	9.975,00	79,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
11	1 ^a	22/07/2019	P	2,58	1,85	7,80	400,00	10,00	42,00	14,00	9.187,00	126,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,25	1,26	7,00	200,00	8,10	34,00	11,33	7.507,00	111,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
23	1 ^a	22/07/2019	P	2,89	1,6	7,40	200,00	6,60	28,00	9,30	8.820,00	151,00
	2 ^a	13/10/2020	P	3,15	2,23	7,20	200,00	7,60	32,00	10,70	10.080,00	114,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
79	1 ^a	26/10/2019	P	3,15	2,38	7,40	400,00	10,50	44,00	14,70	10.972,00	114,00
	2 ^a	13/10/2020	P	2,37	1,79	6,60	400,00	8,80	37,00	12,30	10.763,00	104,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5	1 ^a	22/07/2019	P	3,16	1,33	7,00	600,00	7,10	30,00	10,00	7.875,00	104,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,76	1,24	7,00	400,00	7,86	33,00	11,00	9.817,00	108,00
	3 ^a	13/10/2020	P	2,44	1,06	7	200	8,3	35	11,7	10.552,00	57
58	1 ^a	23/07/2019	P	3,16	1,33	6,80	200	8,6	36	12,00	6.300	81
	2 ^a	17/01/2020	P	1,76	1,24	7	200	8,1	34	11,30	8.032,00	57
	3 ^a	14/10/2020	P	2,44	1,06	6,4	400	8,3	35	11,7	11.813	194
19	1 ^a	22/07/2019	N	3,23	1,38	8,40	200,00	6,20	26,00	8,70	15.592,00	95,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,91	1,48	9,60	600,00	8,10	34,00	11,33	31.972,00	78,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
36	1 ^a	23/07/2019	P	2,37	0,98	7,80	800	8,3	35	11,70	10.290	122

	2 ^a	17/01/2020	P	2,32	0,71	8	200	8,57	36	12,00	9.607,00	114
	3 ^a	14/10/2020	P	1,69	1,01	7,4	400	8,1	34	11,3	14.490	161
41	1 ^a	23/07/2019	P	2,91	1,25	7,00	200,00	7,60	32,00	10,60	15.120,00	96,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,8	0,77	8,20	400,00	7,86	33,00	11,00	11.182,00	168,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
78	1 ^a	26/10/2019	P	2,15	1,88	8,00	600,00	8,10	34,00	11,34	11.130,00	135,00
	2 ^a	15/10/2020	P	1,39	0,64	7,00	400,00	7,60	32,00	10,70	9.450,00	161,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
47	1 ^a	23/07/2019	N	2,45	0,89	7,20	200	6,7	28	9,30	10.027,00	133
	2 ^a	17/01/2020	N	1,07	0,98	6,8	400	7,38	31	10,33	11.550	181
	3 ^a	14/10/2020	N	0,9	1,08	7,2	800	8,1	34	11,3	14.595	74
74	1 ^a	07/09/2019	N	1,05	1	7,2	200	7,60	32	10,70	10.448,00	121
	2 ^a	30/11/2019	N	0,84	0,37	7,6	1000	7,61	32	10,66	8.610,00	96
	3 ^a	13/10/2020	N	1,02	0,32	7	200	8,1	34	11,3	10.290,00	95
27	1 ^a	22/07/2019	N	1,23	0,26	7,00	400	7,60	32	10,60	5.565,00	93
	2 ^a	17/01/2020	N	1,09	0,27	6,6	200	7,62	32	10,67	7.770,00	148
	3 ^a	13/10/2020	N	1,39	0,36	6,6	200	8,3	35	11,7	8.085,00	120
28	1 ^a	22/07/2019	N	1,24	0,37	6,60	200	7,90	33	11,00	7.455,00	154
	2 ^a	17/01/2020	N	1,2	0,36	6,6	200	7,62	32	10,67	8.872,00	117
	3 ^a	13/10/2020	N	2,23	0,28	6	200	6,4	27	9	6.615,00	95
44	1 ^a	23/07/2019	N	1,41	0,49	7,60	200	8,10	34	11,30	11.603,00	229
	2 ^a	17/01/2020	N	1,31	0,29	7,2	200	8,33	35	11,67	9.817,00	71
	3 ^a	14/10/2020	N	1,68	0,34	7,2	400	7,9	33	11	10.920,00	210
60	1 ^a	07/09/2019	N	1,41	0,41	7,2	400	6,70	28	9,30	9.188,00	75
	2 ^a	30/11/2019	N	0,82	0,4	6,4	400	6,90	29	9,66	12.705,00	103
	3 ^a	13/10/2020	N	0,81	0,5	7	400	6,7	28	9,3	9.398,00	136
75	1 ^a	07/09/2019	N	1,87	0,45	7,6	200	6,42	27	9,00	9.345,00	100
	2 ^a	30/11/2019	N	1,66	0,23	7,2	200	7,14	30	10,00	10.395,00	140
	3 ^a	13/10/2020	N	2,14	0,34	7,2	200	6,4	27	9	9.240,00	74

59	1 ^a	07/09/2019	N	0,85	0,48	7,60	400,00	9,50	40,00	13,30	13.335,00	142,00
	2 ^a	30/11/2019	N	1,52	0,84	7,00	1.000,00	5,95	25,00	8,33	14.227,00	145,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
40	1 ^a	23/07/2019	N	0,99	0,61	7,20	600,00	7,40	31,00	10,30	10.657,00	65,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,64	0,99	7,00	200,00	8,33	35,00	11,67	9.240,00	73,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1	1 ^a	22/07/2019	N	1,35	0,35	7,80	600,00	7,60	32,00	10,60	9.187,00	148,00
	2 ^a	17/01/2020	N	1,19	0,28	7,40	400,00	7,14	30,00	10,00	10.185,00	132,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
25	1 ^a	22/07/2019	N	1,78	0,34	7,20	200,00	7,90	33,00	11,00	7.560,00	138,00
	2 ^a	17/01/2020	N	1,23	0,29	7,00	200,00	7,62	32,00	10,67	10.290,00	108,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
65	1 ^a	07/09/2019	N	2,28	0,46	6,20	200,00	6,70	28,00	9,30	7.980,00	127,00
	2 ^a	30/11/2019	N	0,73	0,61	6,40	200,00	7,38	31,00	10,33	7.927,00	101,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
64	1 ^a	07/09/2019	N	0,78	0,4	6,8	200	9,00	38	12,70	13.020,00	117
	2 ^a	30/11/2019	N	0,9	0,33	7,4	200	8,09	34	11,33	9.187,00	106
	3 ^a	13/10/2020	N	1,1	0,69	6,6	200	9,5	40	13,3	9.030,00	74
29	1 ^a	22/07/2019	N	0,72	0,27	7,80	400,00	7,10	30,00	10,00	10.395,00	96,00
	2 ^a	13/10/2020	N	0,61	0,26	7,00	200,00	6,40	27,00	9,00	9.030,00	65,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	1 ^a	22/07/2019	N	0,98	0,33	7,20	400,00	6,90	29,00	9,60	9.240,00	171,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,53	0,36	7,20	200,00	8,81	37,00	12,33	8.977,00	96,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
32	1 ^a	22/07/2019	N	1,85	0,28	7,20	200,00	7,10	30,00	10,00	13.335,00	246,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,41	0,43	7,80	200,00	7,38	31,00	10,33	7.927,00	131,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
73	1 ^a	07/09/2019	N	0,49	0,8	7,00	400,00	6,70	28,00	9,30	12.600,00	121,00
	2 ^a	30/11/2019	N	2,05	0,79	7,00	200,00	6,19	26,00	8,66	9.870,00	147,00

	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
35	1 ^a	22/07/2019	N	0,63	0,2	8,20	400,00	7,60	32,00	10,60	11.550,00	234,00
	2 ^a	14/10/2020	N	0,74	0,19	8,00	600,00	6,90	29,00	9,70	10.343,00	183,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
31	1 ^a	22/07/2019	N	0,56	0,2	7,00	200,00	7,40	31,00	10,30	11.655,00	105,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,4	0,35	7,80	200,00	8,10	34,00	11,33	7.192,00	141,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
33	1 ^a	22/07/2019	N	0,65	0,31	6,80	400,00	5,00	21,00	7,00	8.452,00	80,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,12	0,45	6,80	200,00	6,67	28,00	9,33	10.342,00	88,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
39	1 ^a	23/07/2019	N	0,57	0,26	7,40	600	6,40	27	9,00	9.870,00	100
	2 ^a	17/01/2020	N	0,12	0,14	7	200	6,67	28	9,33	8.452,00	167
	3 ^a	14/10/2020	N	0,18	0,25	6,8	400	6,7	28	9,3	10.343,00	99
34	1 ^a	22/07/2019	N	0,59	0,31	7,80	200,00	6,60	28,00	9,30	11.760,00	108,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,39	0,23	6,80	400,00	7,14	30,00	10,00	13.755,00	192,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
80	1 ^a	26/10/2019	N	0,35	0,8	6,20	200,00	7,14	30,00	10,00	13.020,00	163,00
	2 ^a	14/10/2020	N	0,32	0,55	6,20	400,00	7,40	31,00	10,30	11.025,00	76,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
72	1 ^a	07/09/2019	N	0,37	0,71	8	200	11,40	48	16,00	12.180,00	81
	2 ^a	30/11/2019	N	0,26	0,51	7	400	9,52	40	13,33	11.655,00	129
	3 ^a	13/10/2020	N	0,38	0,38	6,6	200	7,6	32	10,7	7.665,00	87

ID=IDENTIFICAÇÃO; VR=VALORES DE REFERÊNCIA; PP=PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL; HM=HEMÁCIAS; VG=VOLUME GLOBULAR; HG=HEMOGLOBINA; NC=NÃO CONSTA.

Tabela 16. Resultados dos bioquímicos: Resultados dos bioquímicos dos animais acompanhados e que tiveram variações significativas na absorbância dos ELISAS gp90 e p26 (TODOS OS ANIMAIS).

ID	COLETA	DATA	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	PROT TOTAL (g/dL)	GGT (U/L)	FA (U/L)	CK (U/L)
VR						21,4 - 51,5	0,4 - 2,2	2,1 - 3,3	2,4 - 4,0	14 - 62	86 - 295	86 - 295	86 - 295	86 - 295
13	1 ^a	22/07/2019	P	3,13	1,85	70,00	1,76	2,04	5,00	229,00	7,53	13,00	180,00	245,00
	2 ^a	17/01/2020	P	3,24	2,42	66,00	1,48	1,77	8,00	359,00	7,28	97,00	301,00	342,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
11	1 ^a	22/07/2019	P	2,58	1,85	45,00	1,22	2,97	8,50	286,50	7,08	135,50	273,50	459,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,25	1,26	60,00	1,57	2,18	15,00	39,00	7,80	246,00	290,00	366,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
23	1 ^a	22/07/2019	P	2,89	1,60	73,50	2,72	3,86	20,00	279,50	11,96	64,00	540,50	811,50
	2 ^a	13/10/2020	P	3,15	2,23	65,00	1,90	2,88	18,50	374,00	8,50	365,00	469,50	805,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
79	1 ^a	26/10/2019	P	3,15	2,38	32,50	1,75	3,35	13,00	270,00	9,86	78,00	365,00	931,00
	2 ^a	13/10/2020	P	2,37	1,79	25,00	1,27	2,69	12,00	91,00	13,84	211,00	437,00	682,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
5	1 ^a	22/07/2019	P	3,16	1,33	52,50	1,27	2,41	9,50	266,00	7,78	23,50	242,00	298,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,76	1,24	47,00	1,13	2,53	38,00	144,00	7,42	28,00	257,00	4973,00
	3 ^a	13/10/2020	P	2,44	1,06	35,00	0,95	1,99	2,00	352,00	6,33	86,00	320,00	604,00
58	1 ^a	23/07/2019	P	3,16	1,33	40,00	1,94	2,62	16,00	395,50	7,10	24,00	225,00	798,50
	2 ^a	17/01/2020	P	1,76	1,24	44,00	1,77	2,90	7,00	445,00	8,08	43,00	323,00	1440,00
	3 ^a	14/10/2020	P	2,44	1,06	51,00	1,45	2,47	15,00	318,00	6,73	55,50	321,00	848,00
19	1 ^a	22/07/2019	N	3,23	1,38	38,00	1,57	1,83	11,00	362,00	10,69	485,50	1079,50	503,50
	2 ^a	17/01/2020	P	1,91	1,48	18,00	1,02	1,29	15,00	259,00	10,88	662,00	1027,00	357,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
36	1 ^a	23/07/2019	P	2,37	0,98	71,50	2,16	3,65	34,00	259,50	10,57	288,50	605,50	431,00
	2 ^a	17/01/2020	P	2,32	0,71	54,00	1,38	2,59	13,00	412,00	7,75	146,00	391,00	814,00
	3 ^a	14/10/2020	P	1,69	1,01	52,00	1,16	2,16	17,00	325,00	7,16	348,00	473,00	370,00
41	1 ^a	23/07/2019	P	2,91	1,25	37,50	1,84	2,39	6,00	320,00	7,17	32,00	276,00	359,00
	2 ^a	17/01/2020	P	1,80	0,77	63,00	1,81	2,34	7,00	283,00	7,99	38,00	196,00	270,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
78	1 ^a	26/10/2019	P	2,15	1,88	49,00	1,56	2,34	9,00	290,00	6,63	30,00	272,00	241,00
	2 ^a	15/10/2020	P	1,39	0,64	44,00	1,36	2,70	9,50	391,00	7,59	39,00	374,00	413,50
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
47	1 ^a	23/07/2019	N	2,45	0,89	50,00	2,68	2,59	17,00	329,50	8,61	27,00	361,50	583,50

	2 ^a	17/01/2020	N	1,07	0,98	47,00	1,23	1,87	6,00	224,00	5,42	17,00	219,00	841,00
	3 ^a	14/10/2020	N	0,90	1,08	42,00	1,38	1,92	6,00	328,00	6,50	18,00	361,00	842,00
74	1 ^a	07/09/2019	N	1,05	1,00	53,00	2,63	2,91	16,50	395,00	8,29	36,50	255,50	488,00
	2 ^a	30/11/2019	N	0,84	0,37	48,00	3,00	3,20	32,00	406,00	8,90	25,00	198,00	398,00
	3 ^a	13/10/2020	N	1,02	0,32	32,00	1,08	1,20	16,00	237,00	4,24	15,00	162,00	510,00
27	1 ^a	22/07/2019	N	1,23	0,26	53,50	2,47	3,29	14,00	35,25	8,37	20,50	200,00	509,00
	2 ^a	17/01/2020	N	1,09	0,27	48,00	3,00	3,20	32,00	406,00	8,90	25,00	198,00	398,00
	3 ^a	13/10/2020	N	1,39	0,36	32,00	1,08	1,20	16,00	237,00	4,24	15,00	162,00	510,00
28	1 ^a	22/07/2019	N	1,24	0,37	48,00	2,24	2,94	20,00	325,50	7,56	18,00	287,00	787,00
	2 ^a	17/01/2020	N	1,20	0,36	62,00	2,07	2,64	6,00	317,00	7,66	24,00	235,00	806,00
	3 ^a	13/10/2020	N	2,23	0,28	33,00	1,61	2,05	8,00	220,00	5,50	21,00	260,00	383,00
44	1 ^a	23/07/2019	N	1,41	0,49	48,00	2,00	3,62	20,00	329,50	9,56	89,00	467,00	779,00
	2 ^a	17/01/2020	N	1,31	0,29	46,00	2,26	3,08	20,00	376,00	8,90	101,00	498,00	1539,00
	3 ^a	14/10/2020	N	1,68	0,34	24,00	1,01	1,99	8,50	350,50	6,29	60,00	257,00	498,00
60	1 ^a	07/09/2019	N	1,41	0,41	36,00	1,56	2,03	6,00	246,50	6,50	14,50	207,00	462,50
	2 ^a	30/11/2019	N	0,82	0,40	49,00	1,60	2,20	13,00	301,00	6,80	21,00	300,00	355,00
	3 ^a	13/10/2020	N	0,81	0,50	44,00	0,80	2,40	5,00	244,00	8,45	29,00	294,00	236,00
75	1 ^a	07/09/2019	N	1,87	0,45	27,00	2,02	2,53	10,00	284,50	8,20	18,00	256,50	765,00
	2 ^a	30/11/2019	N	1,66	0,23	50,00	1,90	2,60	12,00	301,50	8,40	17,00	250,00	607,00
	3 ^a	13/10/2020	N	2,14	0,34	42,00	1,21	2,60	1,00	314,00	7,73	12,00	216,00	927,00
59	1 ^a	07/09/2019	N	0,85	0,48	50,00	3,08	2,90	20,50	359,50	8,05	20,00	243,50	531,00
	2 ^a	30/11/2019	N	1,52	0,84	43,00	3,20	2,80	12,00	287,00	9,00	35,00	508,00	352,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
40	1 ^a	23/07/2019	N	0,99	0,61	47,50	1,92	3,14	9,50	371,00	8,89	30,00	364,00	495,50
	2 ^a	17/01/2020	N	0,64	0,99	64,00	1,20	2,36	15,00	440,00	7,73	23,00	400,00	496,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1	1 ^a	22/07/2019	N	1,35	0,35	27,50	1,96	1,92	7,50	287,50	7,91	37,50	238,00	219,00
	2 ^a	17/01/2020	N	1,19	0,28	54,00	2,23	2,14	13,00	327,00	8,54	39,50	272,00	275,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
25	1 ^a	22/07/2019	N	1,78	0,34	47,50	1,85	3,05	14,00	266,50	8,14	14,50	315,00	637,50
	2 ^a	17/01/2020	N	1,23	0,29	44,00	1,34	2,64	9,50	263,00	7,20	25,00	199,00	691,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
65	1 ^a	07/09/2019	N	2,28	0,46	23,50	1,38	1,75	5,50	187,00	4,61	23,00	217,00	194,50
	2 ^a	30/11/2019	N	0,73	0,61	51,00	1,40	2,60	11,00	326,00	6,60	23,00	499,00	643,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
64	1 ^a	07/09/2019	N	0,78	0,40	39,00	2,43	1,44	6,00	190,50	3,82	31,00	190,00	636,50
	2 ^a	30/11/2019	N	0,90	0,33	65,00	3,70	3,80	23,00	369,00	9,70	46,00	275,00	787,00

	3 ^a	13/10/2020	N	1,10	0,69	38,00	2,20	3,57	15,00	307,00	9,01	17,00	212,00	907,00
29	1 ^a	22/07/2019	N	0,72	0,27	49,50	1,44	2,26	20,50	285,50	7,36	11,00	278,00	307,50
	2 ^a	13/10/2020	N	0,61	0,26	47,00	1,03	2,06	17,00	401,00	7,45	19,00	303,00	616,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	1 ^a	22/07/2019	N	0,98	0,33	80,00	2,59	3,61	18,00	330,00	9,70	32,00	1064,00	710,50
	2 ^a	17/01/2020	N	0,53	0,36	61,00	2,12	2,92	7,00	433,00	7,61	59,00	242,00	730,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
32	1 ^a	22/07/2019	N	1,85	0,28	87,50	2,46	3,01	8,50	374,50	10,33	25,50	486,50	500,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,41	0,43	67,00	1,87	2,93	12,00	421,00	10,07	40,00	373,00	534,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
73	1 ^a	07/09/2019	N	0,49	0,80	41,00	2,59	2,30	8,00	373,50	7,53	33,50	260,50	939,50
	2 ^a	30/11/2019	N	2,05	0,79	36,00	2,60	2,10	11,00	391,00	7,20	26,00	184,00	678,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
35	1 ^a	22/07/2019	N	0,63	0,20	51,00	1,73	2,58	7,00	228,00	5,70	20,00	184,00	226,50
	2 ^a	14/10/2020	N	0,74	0,19	43,00	1,45	3,30	10,00	292,00	16,92	45,00	391,00	790,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
31	1 ^a	22/07/2019	N	0,56	0,20	78,00	2,25	2,67	15,00	382,50	9,96	51,00	321,00	489,00
	2 ^a	17/01/2020	N	0,40	0,35	66,00	1,80	2,61	10,00	413,00	7,90	57,00	228,00	487,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
33	1 ^a	22/07/2019	N	0,65	0,31	45,50	1,58	1,94	6,00	203,00	5,66	21,00	177,00	193,50
	2 ^a	17/01/2020	N	0,12	0,45	54,00	2,03	2,80	9,00	367,00	8,99	23,00	263,00	419,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
39	1 ^a	23/07/2019	N	0,57	0,26	40,50	1,50	2,29	7,50	268,00	7,72	18,00	265,50	460,90
	2 ^a	17/01/2020	N	0,12	0,14	38,00	1,21	2,35	12,00	309,00	8,46	20,00	231,00	638,00
	3 ^a	14/10/2020	N	0,18	0,25	29,00	1,27	1,84	7,00	335,00	6,87	20,00	289,00	325,00
34	1 ^a	22/07/2019	N	0,59	0,31	51,00	1,45	1,60	5,00	230,50	5,57	12,00	222,50	409,50
	2 ^a	17/01/2020	N	0,39	0,23	36,00	1,32	2,17	5,00	368,00	6,76	20,00	356,00	355,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
80	1 ^a	26/10/2019	N	0,35	0,80	27,00	1,43	2,53	11,00	337,00	6,61	45,00	497,00	547,00
	2 ^a	14/10/2020	N	0,32	0,55	20,00	1,45	2,61	12,00	338,00	7,32	50,00	416,00	447,00
	3 ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
72	1 ^a	07/09/2019	N	0,37	0,71	44,50	2,55	2,90	9,00	323,50	8,40	14,00	317,00	317,00
	2 ^a	30/11/2019	N	0,26	0,51	41,00	2,20	2,60	15,00	274,00	7,10	15,00	204,00	305,00
	3 ^a	13/10/2020	N	0,38	0,38	31,00	1,31	2,20	5,00	226,00	6,02	9,00	112,00	236,50

ID=IDENTIFICAÇÃO; VR=VALORES DE REFERÊNCIA; NC=NÃO CONSTA; ALT= ALANINA AMINOTRANSFERASE; AST=ASPARTATO AMINOTRANSFERASE; CK=CREATINA QUINASE; FA=FOSFATASE ALCALINA; GGT=GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASE.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Participação em eventos e trabalhos apresentados

- AULA MAGNA DA PÓSGRADUAÇÃO DO ICB 2021 - “Epidemiologia de viroses emergentes, com ênfase na disseminação do SARS-CoV-2 e suas variantes no mundo”, 2021.
- “VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021”, 2021.
- Simpósio de Imersão em Hematologia Equina, 2020.
- XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul held online, 2020.
- ✓ TRABALHO APRESENTADO: COSTA, V. M. D.; FILHO, R. N. de A.; NETO, I. G. da C.; MOUTA, T. B. M; BRAZ, G. F.; PAZ, C. F. R; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, B. M.; KROON, E. G. EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (EIAV) IN EQUIDES IN THE JERICOACOARA NATIONAL PARK, CEARÁ, BRAZIL, 2020.
- II WORKSHOP DO MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA do Centro Universitário Inta (UNINTA), 2019. Mesa redonda “Depoimentos dos Egressos”.
- III SIMPÓSIO CEARENSE DE MICROBIOLOGIA: Microrganismos Resistentes, 2019.
- ✓ TRABALHO APRESENTADO: COSTA, V. M. D.; CURSINO, A. E.; Luiz, A. P. M. F; FILHO, R. N. de A.; BRAZ, G. F.; TEIXEIRA, B. M.; KROON, E. G. ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E LABORATORIAL DE UM ASININO NATURALMENTE INFECTADO PELO EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (EIAV) – RELATO DE CASO, 2019.
- Workshop DivulgaMicro on Science Communication and Outreach, 2019.
- XXX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY & XIV MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 2019. Equine Infectious Anemia (EIA) in donkeys, Northeast, Brazil.
- ✓ TRABALHO APRESENTADO: TEIXEIRA, B. M.; COSTA, V. M. D.; CURSINO, A. E.; Luiz, A. P. M. F; BRAZ, G. F.; DRUMOND, B. P.; KROON, E. G. EQUINE INFECTIOUS ANEMIA (EIA) IN DONKEYS, NORTHEAST, BRAZIL, 2019.
- Mostra de Produção Científica Internacional do Grupo GORJ Universitário, 2018.
- ✓ TRABALHO APRESENTADO: COSTA, V. M. D.; BRAZ, G. F.; CAVALCANTE, P. H.; TEIXEIRA, B. M. COMPARAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS SOROLÓGICOS PARA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE) NA ESPÉCIE Equus asinus, 2018.
- Oficina Captação de recursos para pesquisa na Mostra de Produção Científica Internacional do Grupo GORJ Universitário, 2018.
- Oficina Plataforma Brasil e processo de cadastro de projetos na Mostra de Produção Científica Internacional do Grupo GORJ, 2018.

Artigos publicados em periódicos

- COSTA, VIVIANE MARIA DIAS; CURSINO, ANDREIA ELISA; FRANCO LUIZ, ANA PAULA MOREIRA; BRAZ, GISSANDRA FARIAS; CAVALCANTE, PAULO HENRIQUE; SOUZA, CINTIA DE ALMEIDA; SIMPLÍCIO, KALINA MARIA DE MEDEIROS GOMES; DRUMOND, BETANIA PAIVA; LIMA, MAURICIO TEIXEIRA; TEIXEIRA, BRUNO MARQUES; KROON, ERNA GEESIEN
Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): Evidence of Circulation in Donkeys from the Brazilian Northeast Region. **JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE**, v.108, p.103795 -, 2022.
- COSTA, V. M. D.; CURSINO, A. E.; Luiz, A. P. M. F; FILHO, R. N. de A.; BRAZ, G. F.; TEIXEIRA, B. M.; KROON, E.G.
ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E LABORATORIAL DE UM ASININO NATURALMENTE INFECTADO PELO EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS (EIAV) – RELATO DE CASO. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. Sobral/Ce, p.156 - 159, 2019.
- NETO, I. G. da C.; MOUTA, T. B. M; VILAROUCA, Y. S; FILHO, R. N. de A.; COSTA, V. M. D.; PAZ, C. F. R
PITIOSE CUTÂNEA EM EQUINO NO SERTÃO DO CEARÁ. **Ciência Animal**. Universidade Estadual do Ceará, p.177 - 185, 2022
- VILAROUCA, Y. S; MOUTA, T. B. M; NETO, I. G. da C.; FILHO, R. N. de A.; COSTA, V. M. D.; CARNEIRO, V. A; PAZ, C. F. R
ANTIBIOGRAMA COMO FERRAMENTA DECISIVA NO TRATAMENTO DE ARTRITE SÉPTICA DECORRENTE DE LUXAÇÃO ARTICULAR EM EQUINO. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. Sobral/Ce, p.160 - 162, 2019.
- RODRIGUES, A. K. P. P; MAGALHÃES, M. M. L; CAVALCANTE, R. O; FILHO, R. N. de A.; FERNANDES, N. N. U; COSTA, V. M. D.; TEIXEIRA, B. M.
MONITORAMENTO DOS RETROVÍRUS FELINOS NA VILA DE JERICOACOARA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. Sobral/Ce, p. 15 - 17, 2019.
- FERNANDES, N. N. U; JORGE, F. R; RODRIGUES, A. K. P. P; TEIXEIRA, B. M.; COSTA, V. M. D.; SERPA, M. C; LABRUNA, M. B
OCORRÊNCIA DE Ehrlichia canis E Rickettsia spp. EM CÃES DOMÉSTICOS URBANOS E SEUS CARRAPATOS NA REGIÃO NORTE DO CEARA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. Sobral/Ce, p.137 - 139, 2019.
- NETO, I. G. da C.; MOUTA, T. B. M; COSTA, V. M. D.; FILHO, R. N. de A.; PAZ, C. F. R; BRAZ, G. F.; TEIXEIRA, B. M.
West Nile virus (WNV) NO NORDESTE DO BRASIL – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. Sobral/Ce, p.77 - 78, 2019.