

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PERFIL SANITÁRIO DE ASININOS ERRANTES DO NORDESTE BRASILEIRO

Rebeca Jéssica Falcão Câmara

Belo Horizonte / MG
2021

Rebeca Jéssica Falcão Câmara

PERFIL SANITÁRIO DE ASININOS ERRANTES DO NORDESTE BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Belo Horizonte / MG
2021

C172p Câmara, Rebeca Jéssica Falcão, 1992-
Perfil sanitário de asininos errantes do Nordeste brasileiro/Rebeca Jéssica Falcão Câmara. -
2021.
129 f.:il

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta Reis
Coorientadores: Érica Azevedo Costa
Sidnei Miyoshi Sakamoto

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciência Animal.

Bibliografias: f. 47 a 61; f. 73 a 77; f. 93 a 101; f. 109 a 112; f. 120 a 124
Anexos: f.126 a 128.

1. Equino – Doenças - Teses - 2. Virose em animais - Teses - 3. Ciência animal – Teses -
4. Asinino - Teses – I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta – II. Costa, Érica Azevedo – III. Sakamoto,
Sidnei Miyoshi - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

REBECA JÉSSICA FALCÃO CÂMARA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 29 de julho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins

Dr.(a). Graciela Kunrath Lima

Dr.(a). Lilian Silva Catenacci

Dr.(a). Enio Mori



Documento assinado eletronicamente por **Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Presidente de comissão**, em 29/07/2021, às 12:12, 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 **Graciela Kunrath Lima, Bióloga**, em 29/07/2021, às 15:17, 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 **Enio Mori, Usuário Externo**, em 29/07/2021, às 15:22, 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 **Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 17:24, 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 **Lilian Silva Catenacci, Usuário Externo**, em 02/08/2021, às 20:54, 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 **0857653** e o código CRC **70FB0F34**.

Aos meus amados pais, Rute e Murilo, ao meu noivo, André, por todo amor, incentivo e por sempre acreditarem em mim. As minhas irmãs, tias, primas e amigos, pela torcida, orações constantes e por sempre alegrarem-se com minhas conquistas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Após todos esses anos de dedicação, noites de estudos, fins de semana na bancada do laboratório, discussões, aprendizados, choros, risos, frustrações, mas também de vitórias. Chegou o momento de encerrar esse ciclo e dar início a um novo, agradecer aqueles que significaram muito nesse processo de pesquisa e produção.

Frente ao percurso desta pesquisa, agradeço primeiro a Deus, por me contemplar com a vida, por ser minha fortaleza e nunca me desamparar, por ter escolhido e me permitido viver com tantas pessoas especiais que participaram da minha história, compartilharam das minhas buscas, motivaram-me a enveredar pelas escolhas que fiz. Todas as minhas vitórias são para honra e glória do Teu nome.

À minha mãe, Rute, por seu apoio e amor incondicional, por ser a pessoa mais incrível deste mundo, que me ajudou a ser quem eu sou. Toda a minha gratidão a você.

Ao meu pai, Murilo, por seu amor, paciência e incentivo.

Às minhas irmãs Sara e Taliata, por todas as conversas, risadas, parceria e por acreditarem em mim. Aos meus sobrinhos Miguel, Maria Isabel e Ana Sofia pelas alegrias e sorrisos. Muito obrigada.

Ao meu noivo (e futuro marido) André, obrigada por todo amor, companheirismo, carinho, apoio e por não medir esforços para me ajudar, por sempre me escutar e ter os melhores conselhos para dar, por ser o meu porto seguro.

Aos meus tios Micheline e Isná, e seus filhos João Pedro e Pedro Augusto, por me acolherem amarem e incentivarem. Sou eternamente grata a vocês.

Aos meus sogros Pr. David e Iveth, por todo o carinho, orações e incentivo.

Aos meus tios, tias, primas, primos, cunhados, vocês são fundamentais para meu crescimento.

Ao meu orientador, Professor Dr. Jenner K. P. Reis, por todas as oportunidades, orientação, confiança, incentivo, paciência, ensinamentos e principalmente por ter me dado a oportunidade de pertencer a essa “família retrolabiridae”. Muito obrigada.

Aos meu coorientadores Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (meu pai-científico) e Prof^ª. Dr^ª Érica Azevedo Costa, pela orientação, paciência, ensinamentos, confiança e convívio durante todos esses anos de formação. Obrigada.

À minha família Retrolabiridae, Bruna, Breno, Cláudia, Emília, Francielli, Gabriel, Juliana, Mariana, Priscila, Raphael, Telissa e Thiago, que foram meu segundo lar durante esses

anos, compartilhamos sonhos, conhecimento, e muitas horas na bancada. Em especial agradeço a Bruna e Cláudia, que passaram horas ao meu lado me ajudando com minhas inúmeras amostras, PCRs e sorologias, que saiam tarde da noite do laboratório e me ajudavam nos finais de semana ou feriados.

Agradeço imensamente a Dr^a. Maria do Carmo, do Instituto Biológico de São Paulo, pela essencial parceria para realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Raimundo Alves Barreto Jr. por sua colaboração imprecidível nas coletas.

Aos técnicos e funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG por toda colaboração. Em especial a Grazielle, por todos os ensinamentos e ajuda com minhas centenas de amostras.

A todos os outros funcionários da Escola, porteiros, faxineiras, que com seus trabalhos sempre me ajudaram e me deram suporte.

À Bruno, pela amizade e parceria de sempre, por me acompanhar e ajudar em minhas coletas, processar e alíquotar amostras, não se importando com quantas horas isso iria levar. Obrigada por todos os momentos compartilhados, por sempre estar disponível para me ouvir e por sempre me incentivar.

A todos os meus amigos, em especial a Mariana Andrioli, Natália, João, Roberto e Izabelly, pelos incentivos, carinho e amizade, por eu sempre poder contar com vocês não importa a distância.

A célula LINK, obrigado pelo carinho, pelas risadas, pela troca de experiências, obrigado por me acolherem no meio de vocês.

À Professora Nadia, da Universidade Federal da Bahia (UFBA), pela parceria e disponibilização das amostras dos asininos de Euclides da Cunha.

Aos parceiros do Laboratório de Virologia Animal da UFRPE (LaViAn) Prof. Dr. Roberto e Dr. Sérgio, pela ajuda na execução dos testes para pesquisa de mormo.

A empresa EUROIMMUM pela parceria e doação dos testes sorológicos.

Aos alunos de graduação em Medicina Veterinária da UFERSA, por me ajudarem em minhas coletas de campo.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender durante esses anos de doutorado, meu muito obrigada.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e à Escola de Veterinária pela

oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pelo apoio financeiro de grande importância para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho, o meu muito obrigado.

“Corramos com perseverança a corrida que nos é proposta, tendo os olhos fixos em Jesus, autor e consumador da nossa fé.”

Hebreus 12. 1b-2a

RESUMO

A anemia infecciosa equina, a arterite viral equina, a febre do Nilo ocidental, as encefalomyelites equinas leste, oeste e venezuelana, as herpesvíroses equinas e o mormo são doenças infecciosas que acometem os membros da família *Equidae* (equinos, asininos e muares). A maioria dos estudos de prevalência dessas doenças foi conduzida em equinos (*Equus caballus*), com pouca informação comparativa sobre a infecção nas outras espécies da família, como os asininos (jumentos). O Brasil possui uma das maiores populações de jumentos (*Equus asinus*) do mundo, concentrada principalmente na região nordeste, sendo que muitos deles vivem de forma errante ou abandonados, com status sanitário desconhecido. O presente trabalho teve por objetivo pesquisar através de métodos sorológicos e moleculares a presença do *Equine infectious anemia virus* (EIAV), do *Alphaarterivirus equid*, o *West Nile virus* (WNV), *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV), *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) e dos *Equine herpesvirus* (EHV), além do mormo em asininos errantes do nordeste brasileiro. Os resultados encontrados, na população estudada, demonstraram que os asininos não estão infectados pela *Burkholderia mallei* e VEEV, porém os agentes EIAV, EHV, EEEV, WEEV, *Alphaarterivirus equid* e WNV estão circulando em algumas regiões do nordeste. Esse é o maior estudo feito para essas oito agentes em asininos no mundo, e permite avaliar o impacto dessa espécie como hospedeira natural dos respectivos agentes infecciosos nesta região do Brasil.

Palavras chaves: Doenças virais, asininos, arterite viral equina, mormo, EIAV, EHV, WNV, EEEV, WEEV, VEEV.

ABSTRACT

Equine infectious anemia, equine viral arteritis, West Nile fever, eastern, western and Venezuelan equine encephalomyelitis, equine herpesviruses and glanders are infectious diseases that affect members of the family Equidae (horses, donkeys and mules). The Most studies on prevalence of these diseases have been conducted in horses (*Equus caballus*), with little comparative information about the infection in other species of the family, such as donkeys. Brazil has one of the largest populations of donkeys (*Equus asinus*) in the world, concentrated mainly in the northeast region, and many of them live wandering or abandoned, with unknown health status. The present work aimed to investigate the presence of Equine infectious anemia virus (EIAV), Alphaarterivirus equid, West Nile virus (WNV), Eastern equine encephalitis virus (EEEV), Western equine encephalitis virus (WEEV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) and Equine herpesvirus (EHV), in addition to glanders in errant donkeys from northeastern Brazil, through serological and molecular methods. The results found in the studied population showed that donkeys are not affected by *Burkholderia mallei* and VEEV, but the agents EIAV, EHV, EEEV, WEEV, Alphaarterivirus equid and WNV are circulating in some regions of the northeast. This is the largest study carried out on these eight pathogens in donkeys in the world, and allows us to evaluate impact of this species as a natural host of the respective infectious agents in this region of Brazil.

Keywords: Viral diseases, donkeys, equine viral arteritis, glanders, EIAV, EHV, WNV, EEEV, WEEV, VEEV.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DAS FAZENDAS ONDE FORAM AMOSTRADOS OS 879 ASININOS, EM RELAÇÃO AO ESTADO E AO MUNICÍPIO DE ORIGEM DOS ANIMAIS.....	65
FIGURA 2 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% APRESENTANDO A AMPLIFICAÇÃO DO GENE DPOL DOS HERPESVÍRUS, EM ALTURA EQUIVALENTE A 215 E/OU 315 PB, DE DNA EXTRAÍDO DE PBMC. CANALETA PM: MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR (100PB, KASVI); CANALETAS NUMERADAS: AMOSTRAS POSITIVAS (EXCETO A 23, CUJO A AMOSTRA É NEGATIVA); CANALETA C+: CONTROLE POSITIVO; CANALETAS BRAN: CONTROLE DO MIX.....	90
FIGURA 3 - ALINHAMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DAS DUAS SEQUÊNCIAS DE AHV-5 OBTIDAS POR NESTED PCR COM UMA ESTIRPE DE REFERÊNCIA AHV-5 (NÚMERO DE ACESSO DO GENBANK FJ798319). APENAS NUCLEOTÍDEOS QUE DIFEREM DESSAS SEQUÊNCIAS DE EHV5 SÃO MOSTRADOS. BASES IDÊNTICAS SÃO MOSTRADAS POR UM “.” E AS LACUNAS SÃO MOSTRADAS POR UM “-”. OBSERVE UMA ÚNICA VARIAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS ENTRE AS DUAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	91
FIGURA 4 - ALINHAMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO DA AMOSTRA DE 97 PB OBTIDA NESTE ESTUDO: REFERÊNCIA ASININE HERPESVIRUS (AHV) -5 (NÚMERO DE ACESSO FJ798319); EQUUS ZEBRA GAMMAHERPESVIRUS (ZHV) (NÚMERO DE ACESSO AY495965.2); WILD ASS HERPESVIRUS (WAHV) (NÚMERO DE ACESSO AF141888.1); EQUINE HERPESVIRUS (EHV) -7 (NÚMERO DE ACESSO EU165547); EHV-5 (NÚMERO DE ACESSO JX125459); E ESTIRPES EHV-2 (NÚMERO DE ACESSO HQ247790). APENAS NUCLEOTÍDEOS QUE DIFEREM DESSAS SEQUÊNCIAS DE EHV5 SÃO MOSTRADOS. BASES IDÊNTICAS SÃO MOSTRADAS POR UM “.” E AS LACUNAS SÃO MOSTRADAS POR UM “-”.....	91
FIGURA 5 - ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DE AMINOÁCIDOS DO GENE ORF30 DE EHV-1 DO ISOLADO DE CAMPO BRAZILIAN DONKEY COM A ESTIRPE AB4 (NÚMERO GENBANK AY665713.1), ESTIRPE NEUROPATOGÊNICA DE REFERÊNCIA E REFERÊNCIA V592 (NÚMERO DO GENBANK AY46052.1).....	92
FIGURA 6 – PRINCIPAIS BIOMAS E ÁREAS IMPORTANTES PARA AVES MIGRATÓRIAS (ÁREAS REGULARES DE ROTA, POUISIO, DESCANSO, ALIMENTAÇÃO E REPRODUÇÃO) NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL (FONTE DOS DADOS UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DO MAPA: BARBOSA ET AL., 2020; IBGE, 2021).	104
FIGURA 7 - MAPA DAS PRINCIPAIS ROTAS DE MIGRAÇÃO DE AVES NAS AMÉRICAS (ICMBIO, 2016).	115
FIGURA 8 - POSIÇÃO DOS SUBSTRATOS NA LÂMINA E REFERÊNCIA DE LEITURA POSITIVA PARA OS VÍRUS PESQUISADOS.....	117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS ENTRE ASININOS E EQUINOS.	21
TABELA 2 - ESTUDOS DA OCORRÊNCIA DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM ASININOS E/OU MUARES, NO PERÍODO DE 2009 A 2019.....	23
TABELA 3 - ESTUDOS DE OCORRÊNCIA DA ARTERITE VIRAL EQUINA QUE INCLUEM ASININOS E/OU MUARES, NO PERÍODO DE 2009 A 2019.	29
TABELA 4 - PRINCIPAIS HERPESVIRUS DE ALGUNS MEMBROS DA FAMÍLIA EQUIDAE	32
TABELA 5 - ESTUDOS DE OCORRÊNCIA DO HERPESVÍRUS EQUINO QUE INCLUEM ASININOS E/OU MUARES, NO PERÍODO DE 2009 A 2019.	33
TABELA 6 - ESTUDOS DE SOROPREVALÊNCIA DO WNV QUE INCLUEM ASININOS E/OU MUARES.	37
TABELA 7 - RESUMO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS VIRAIS EQUINAS, LISTANDO OS AGENTES INFECCIOSOS, SEU AGRUPAMENTO TAXONÔMICO, HOSPEDEIROS NATURAIS, CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, MECANISMOS DE TRANSMISSÃO, MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E OS CUIDADOS NECESSÁRIOS PARA PREVENIR SUA DISSEMINAÇÃO, CONFORME DETERMINADO PELO MANUAL TERRESTRE DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE).....	42
TABELA 8 - ASININOS SOROPOSITIVOS PARA AIE- RESULTADOS DE ELISA PGP45, IDGA P26 E WB	69
TABELA 9 - INICIADORES E REGIÕES GÊNICAS AMPLIFICADAS NOS TESTES DE PCR UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DOS HERPESVIRUS.....	85
TABELA 10 - INICIADORES E SONDAS TAQMAN USADOS NO ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL	86
TABELA 11 - PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA ENCEFALOMIELE EQUINA LESTE, ENCEFALOMIELE EQUINA OESTE E ENCEFALOMIELE EQUINA VENEZUELA, EM ASININOS DOS ESTADOS DA BAHIA, CEARÁ E RIO GRANDE DO NORTE, SEGUNDO SMART ET AL. (1975)	106
TABELA 12 - RESULTADOS DO ANTI-WEST NILE VIRUS ELISA HORSE (IGG) (EUROIMMUN)	118
TABELA 13 - RESULTADO DA IFA: MOSAICO ARBOVÍRUS, NA DILUIÇÃO 1:100, INDICANDO A INTENSIDADE DA REATIVIDADE CONTRA CADA VÍRUS.	118

LISTA DE ABREVIATURAS

A₂₂₅₄: Estirpe não neuropatogênica de EHV-1

AHSV: *African horse sickness virus*

AHV-: *Asinine herpesvirus*

AIE: Anemia Infecciosa Equina

AVE: Arterite Viral Equina

BA: Bahia

CE: Ceará

C°: Graus Celsius

CO₂: Gás carbônico

CT: *cycle threshold*

DENV: *Dengue virus*

DPOL: Gene que codifica a DNA polimerase

eADAR1: Adenosina desaminase equina 1

EEEV: *Eastern equine encephalitis virus*

EEL: Encefalomielite equina do leste

EEO: Encefalomielite equina do oeste

EEV: Encefalomielite equina do venezuelana

EHM: Mieloencefalopatia por herpesvírus equino

EHV-: *Equine herpesvirus*

EIAV: *Equine infectious anemia virus*

EIAV_{DLV121}: Estirpe vacinal

EIAV_{DV117}: Estirpe patogênica obtida após 117 passagens da estirpe LN40 *in vitro*

EIAV_{FDDV13}: Estirpe vacinal adaptada em células FDD, após 13 passagens seriadas

EIAV_{LN}: Vírus da anemia infecciosa equina, estirpe Lianoing

EIAV_{PV}: Vírus da anemia infecciosa equina, estirpe pônei patogênica

EIV: *Equine influenza virus*

EJ: Encefalite japonesa

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

ESL: Encefalite de Saint Louis

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FDD: Células da derme de feto de jumento (fetal donkey derm)

FNO: Febre do Nilo Ocidental

G₂₂₅₄: Estirpe neuropatogênica de EHV-1

gB: Glicoproteína B

h: Hora

HCV: *Hepatitis C Virus*

HVE: Herpesvírus Equino

IB: Imunoblot

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDGA: Imunodifusão em gel de ágar

IE: Influenza equina

IFA: Imunofluorescência indireta

IV: *Influenza vírus*

JEV: *Japanese Encephalitis vírus*

LN40: EIAV_{LN}

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDBK: Células renais de bovino

MDM: Macrófagos derivados de monocitos

MEM: Meio essencial mínimo

Min: Minutos

mL: Mililitro

mM: miliMolar

mm: Milímetro

ng: Nanogramas

nPCR: Nested PCR

NPHV: *Nonptimate Hepacivírus*

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

ONGs: Organizações não governamentais

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: Tampão salino-fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PEA: Peste equina africana

PRNT: Teste de redução e neutralização de placa

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RABV: *Rabies virus*

RetroLab: Laboratório de Retrovíroses da Escola de Veterinária da UFMG

RN: Rio Grande do Norte

RT-PCR: Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa

SFB: Soro fetal bovino

SLEV: *Saint Louis encephalitis virus*

SPN: Polimorfismo de nucleotídeo único

TA: Temperatura ambiente

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VEEV: *Venezuelan equine encephalitis virus*

WEEV: *Western equine encephalitis virus*

WNV: *West Nile virus*

xg: Força G

ZIKV: *Zika vírus*

µL: Microlitros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
1. CAPÍTULO 1	
DOENÇAS VIRAIS QUE AFETAM ASININOS E MUARES.....	20
1.1. RESUMO.....	20
1.2. INTRODUÇÃO	20
1.3. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE).....	22
1.4. ARTERITE VIRAL EQUINA (AVE)	28
1.5. HEPACIVIRUS EQUINO	29
1.6. HERPESVÍRUS EQUINOS (HVEs).....	31
1.7. ENCEFALITES CAUSADAS POR FLAVIVIRUS.....	35
1.9. DEMAIS DOENÇAS VIRAIS QUE ACOMETEM OS EQUÍDEOS	43
1.10. RAIVA.....	43
1.11. ENCEFALITES CAUSADAS POR ALFAVÍRUS.....	44
1.12. CONCLUSÃO	46
1.13. REFERÊNCIAS	47
2. CAPÍTULO 2	
INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA PARA ARTERITE VIRAL EQUINA (AVE), ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (AIE) E MORMO EM ASININOS NO NORDESTE DO BRASIL	62
2.1. RESUMO.....	62
2.2. INTRODUÇÃO	62
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	64
2.4. RESULTADOS	69
2.5. DISCUSSÃO	69
2.6. CONCLUSÃO	73
2.7. REFERÊNCIAS	73
3. CAPÍTULO 3	
SOROPREVALÊNCIA E DETECÇÃO DAS ESTIRPES NEUROPATOGÊNICA DO <i>EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 (EHV-1)</i> E <i>ASININE HERPESVIRUS TYPE 5 (AHV-5)</i> EM ASININOS DO NORDESTE BRASILEIRO	78
3.1. RESUMO.....	78
3.2. INTRODUÇÃO	78
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	81
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.5. CONCLUSÕES.....	93
3.6. REFERÊNCIAS	93
4. CAPÍTULO 4	
SOROPREVALÊNCIA DOS VÍRUS DA ENCEFALITE EQUINA LESTE, OESTE E VENEZUELANA EM ASININOS (<i>EQUUS ASINUS</i>) DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL	102
4.1. RESUMO.....	102
4.2. INTRODUÇÃO	102
4.3. MATERIAL E MÉTODOS	104
4.4. RESULTADOS	105
4.5. DISCUSSÃO	106
4.6. CONCLUSÃO	109

4.7.	REFERÊNCIAS	109
5.	CAPÍTULO 5	
	EVIDÊNCIA SOROLÓGICA DA CIRCULAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM ASININOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL.....	113
5.1.	RESUMO.....	113
5.2.	INTRODUÇÃO	113
5.3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	116
5.4.	RESULTADOS	117
5.5.	DISCUSSÃO	118
5.6.	CONCLUSÃO	120
5.7.	REFERÊNCIAS	120
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
7.	ANEXOS	126

INTRODUÇÃO GERAL

O asinino doméstico (*Equus asinus*) é uma espécie única, cujos ancestrais, oriundos da África, evoluíram para sobreviver em ambientes semiáridos, com escassas fontes de alimentos e água. Domesticados há cerca de 5.000 anos, os asininos vêm sendo utilizados como animais de tração/carga e transporte (Kimura et al, 2010). Embora possuam um papel essencial no desenvolvimento humano e na história, sendo inclusive citados em muitos textos religiosos e históricos, os asininos (jumentos) têm sido desvalorizados e comparados, clinicamente, como pequenos equinos (*Equus caballus*); mesmo com o conhecimento das diferenças fisiológicas, anatômicas, genéticas e comportamentais consideráveis, quando comparados ao cavalo (Burden e Thiemann, 2015).

Os asininos apresentam características peculiares, que garantem sua grande utilização em regiões semi-áridas, tais como força, rusticidade e resistência, principalmente, ao clima quente e à escassez de alimentos. Possuem ainda susceptibilidade diferenciada a certas infecções e/ou manifestações clínicas quando comparados aos equinos. Em números oficiais, o Brasil possui a maior população de asininos da América do Sul (377 mil animais) e a 16ª do mundo (FAO, 2019). Aproximadamente 90% dessa população (339,3 mil animais) está no Nordeste brasileiro, e esse número está seguramente subestimado, visto que o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), órgão responsável por fazer o censo, não contabiliza animais errantes (IBGE, 2017).

Assim como em outras regiões do mundo os jumentos brasileiros estão sendo abandonados por seus proprietários, devido a mecanização da agricultura. Os animais abandonados e os nascidos em vida livre vivem errantes ou são recolhidos pelo poder público, a fim de evitar acidentes de trânsito e, em sua maioria, são mantidos em locais com condições sanitárias precárias ou inexistentes. Algumas exceções existem como por exemplo os animais que viviam em fazendas de abate clandestino na Bahia (BA), essas sim sem condições sanitárias mínimas, e foram adotados por uma OnG, e o DETRAN do estado do Ceará (CE) que em parceria com a Universidade Federal Rural do Semi-Árido e outras instituições de apoio, estabeleceu melhorias em sua estrutura e manejo dos animais, e diferente dos animais dos estados da BA e Rio Grande do Norte (RN), todos os animais recolhidos no CE passavam por um período de quarentena antes de serem introduzidos na fazenda de recolhimento.

Os animais errantes e os que vivem nas fazendas depositárias estão sujeitos a várias condições de doença e transmissão de agentes infecciosos, algumas de notificação

obrigatória, como a anemia infecciosa equina (AIE), o mormo, a febre do Nilo Ocidental (FNO) e as encefalomyelites equinas leste, oeste e venezuelana (EEL, EEO e EEV) (OIE, 2020). Outras doenças cuja ocorrência na região é pouco conhecida ou não relatada, como a arterite viral equina (AVE) e o herpesvírus equino (HVE) nunca foram pesquisadas nessa espécie. A provável presença desses agentes envolve tanto a saúde dos equinos como a humana, e chama a atenção para a importância da adoção de medidas de saúde para minimizar sua disseminação. Pouco se sabe sobre a ocorrência dessas doenças em asininos e tal conhecimento é tipicamente extrapolado de doenças que ocorrem em cavalos.

Dessa forma os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a ocorrência da AIE, AVE e do mormo em asininos dos estados da Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte, Brasil, por meio de técnicas de diagnóstico sorológico já bem estabelecidas.
- Avaliar a ocorrência de HVE em asininos dos estados da Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte, Brasil, por meio da técnica de soroneutralização e identificar quais HVEs estão em circulação nesse grupo de animais, através de ensaios moleculares (nPCR, semi-nested PCR e qPCR).
- Investigar a ocorrência de flavivírus em asininos dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, Brasil, utilizando um ELISA comercial e um mosaico de imunofluorescência indireta.
- Investigar a soroprevalência de EEL, EEO e EEV em asininos dos estados de Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte, Brasil, por meio da técnica sorológica de vírus neutralização, que já é bem estabelecida.

CAPÍTULO 1

Doenças virais que afetam asininos e muares

1.1. Resumo

Asininos (*Equus asinus*) e muares representam, aproximadamente, 50% de todo o rebanho de equídeos domésticos existentes no mundo e têm um papel essencial na vida de milhares de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento. Apesar de sua importância, os asininos são atualmente uma espécie negligenciada e ameaçada pelo abandono, abate indiscriminado e pela falta de manejo sanitário apropriado. O conhecimento específico sobre as doenças infecciosas virais que afetam esse grupo de equídeos ainda é limitado, com isso, jumentos e mulas comumente são tratados como cavalos e, as diferenças fisiológicas desenvolvidas entre estas espécies, normalmente não são levadas em consideração. A maioria das doenças infecciosas que acometem a família *Equidae* é exclusiva, e promovem um grande impacto econômico na equideocultura. No entanto, alguns vírus ultrapassam a barreira interespecie e acometem os seres humanos, representando um risco eminente para a saúde pública. Mesmo com tamanha importância, a maioria dos estudos é aplicada a cavalos (*Equus caballus*) e poucas são as informações comparativas sobre a infecção em asininos e muares. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é fornecer uma breve atualização sobre viroses que acometem os asininos e muares e que comprometem seu desempenho produtivo e bem-estar, chegando até a colocá-los em risco de extinção em algumas partes do mundo, devido ao descaso e às condições precárias em que vivem e, eventualmente, colocando em risco também a saúde e a sobrevivência de outras espécies.

1.2. Introdução

Cavalos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*) pertencem a um único gênero, *Equus*, que surgiu há aproximadamente 4,5 milhões de anos (Jónsson *et al.*, 2014). Embora exista uma herança compartilhada entre eles, são notavelmente diferentes em suas características físicas e comportamentais (Burden and Thiemann, 2015). O cruzamento dessas duas espécies resulta em um híbrido estéril, denominado muar ou mula, que combina as características das duas espécies progenitoras, gerando uma grande diversidade de tipos corporais e temperamentos, porém, assemelhando-se fisiologicamente aos cavalos (Matthews and van Loon, 2013; Matthews *et al.*, 2010).

Segundo estimativa da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, a população mundial de equídeos é de aproximadamente 116,7 milhões de animais, sendo composta por 57,7 milhões de cavalos, 50,4 milhões de jumentos e 8,5 milhões de mulas (FAO, 2019). A maioria dos jumentos e mulas reside na Ásia, em alguns países da América Central, América do Sul e na África, garantindo a subsistência de 500 milhões de pessoas em comunidades pobres em todo o mundo, sendo utilizados principalmente como animais de serviço para transporte de carga e pessoas e tração na agricultura (Toribio, 2019). No entanto, a industrialização e mecanização da agricultura também tem levado a um abandono crescente e global de animais, que passam a viver de forma “errante”, perambulando pelas estradas e causando acidentes de trânsito. Além disso, esses animais vadios representam uma potencial fonte de transmissão de doenças infecciosas para outras espécies, devido à falta de controle sanitário (Camillo *et al.*, 2018).

A análise do genoma completo de cavalos e burros mostrou divergências em genes diretamente envolvidos na resposta inflamatória ao trauma (ITIH4) e na regulação da síntese de colesterol (HMGCR). Esses genes foram selecionados positivamente em burros (Jónsson *et al.*, 2014; Orlando *et al.*, 2013) e, eles produzem diferenças significativas nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos quando comparados aos cavalos (Tabela 1). No entanto, muitos valores de referência ainda estão sendo estabelecidos para raças específicas de burros (Alberghina *et al.*, 2013; Burden and Thiemann, 2015; Mendoza *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Comparação de parâmetros fisiológicos entre asininos e equinos.

Parâmetros fisiológicos	Asininos	Equinos
Temperatura (°C)	36.5 – 37.8	37.5 – 38.5
Frequência cardíaca (batimentos/minuto)	36 – 52	30 – 40
Frequência respiratória (movimentos/minuto)	12 – 28	18 – 20
Parâmetros hematológicos e bioquímicos		
Contagem de RBC (10⁶/μL)	4.4 – 7.1	6.0 – 10
Hemoglobina (g/dL)	8.9 – 14.7	12 - 17
MCV (fl)	53 - 67	42 - 58
Triglicerídeos (mmol/L)	0.6 – 2.8	0.05 – 0.5
Bilirrubina total (μmol/l)	0.1 – 3.7	0.06 – 0.12

Fonte (Evans and Crane, 2018; Dunkel, 2018)

Os jumentos também possuem susceptibilidade diferenciada a certas infecções/manifestações clínicas quando comparados aos cavalos. Porém, são escassos os trabalhos científicos sobre patogenia, resposta imune e fisiologia, sendo assim, grande parte do conhecimento disponível proveniente da experiência clínica dos veterinários é extrapolado dos cavalos para os jumentos (Burden and Thiemann, 2015).

Assim como cavalos, asininos e muares também são suscetíveis à infecção por vírus importantes, como os causadores da anemia infecciosa equina (AIE), encefalomielite equina leste, oeste e venezuelana, encefalite japonesa (EJ), febre do Nilo Ocidental (FNO), arterite viral equina (EVA), herpesvírus equino (HVE), influenza equina (IE), bem como a peste equina e raiva que estão listadas no Código de Saúde Animal Terrestre da OIE (OIE, 2019), e os países são obrigados a relatar sua ocorrência. Além de serem relevantes para a indústria equina (Timoney, 2000), algumas delas, como a encefalomielite equina leste, oeste e venezuelana, JE, FNO, raiva e encefalite de Saint Louis (ESL) (OIE, 2020; CDC, 2019) são de grande importância para saúde única. Além disso, ainda existem vírus inexplorados, como o recém-descoberto *Hepacivírus Nonptimate* (NPHV) (Burbelo *et al.*, 2012), cujo impacto em equídeos ainda é pouco conhecido. Portanto, o objetivo principal deste artigo é revisar a literatura publicada e os recursos online (por exemplo, sites oficiais de asininos e organizações não governamentais (ONGs), compilando e fornecendo uma atualização sobre as principais doenças virais de equídeos em asininos e muares.

1.3. Anemia infecciosa equina (AIE)

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma enfermidade cosmopolita causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um *lentivirus* classificado na família *Retroviridae* que acomete exclusivamente os equinos, muares e asininos (Issel and Coggins, 1979). As estatísticas oficiais da AIE não informam, com exatidão, a prevalência da enfermidade nos países, uma vez que se referem, quase que exclusivamente, a exames laboratoriais realizados para o trânsito de animais e/ou participação em eventos controlados pelos serviços oficiais de defesa sanitária animal (Almeida *et al.*, 2006), o que na maioria das vezes envolve animais de valor zootécnico elevado. Acredita-se que essa estimativa seja ainda mais comprometida para muares e jumentos, que são em sua maioria animais de baixo valor zootécnico. Sendo assim, o pouco que sabemos sobre a ocorrência de AIE nessas espécies, vem de um limitado número de estudos que estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudos da ocorrência da anemia infecciosa equina em asininos e/ou muares, no período de 2009 a 2019.

Doença	Espécies	% positivos	Local	Referências
AIE	Asininos	0% (0/1568)	Itália	(Maresca <i>et al.</i> , 2012)
	Equinos	0,2% (41/23971)		
	Muares	3,5% (27/767)		
	Zebra	0% (0/3)		
	Asininos	0,2% (1/662)	Etiópia	(M. Getachew, F. Alemayehu, C. Chala, B. Amare, D. Kassa, F. Burden, 2014)
	Equinos	0% (0/289)		
	Muares	0% (0/51)		
	Asininos	3,27% (12/367)	Brasil	(Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
	Asininos	8,28% (14/169)	Sudão	(Wegdan <i>et al.</i> , 2017)
	Equinos	3,17% (6/189)		

O sangue de um equídeo infectado é a fonte mais importante do EIAV para transmissão a animais suscetíveis. A transmissão natural mais comum do EIAV é por meio de insetos hematófagos da família *Tabanidae* (por exemplo, moscas de cavalo e moscas de veado) (Cook *et al.*, 2013). Moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) também são capazes de transmitir o vírus, mas são menos eficientes do que os tabanídeos. Como o vírus não se replica dentro do inseto vetor, os insetos servem apenas como vetores mecânicos, transferindo sangue através de seu aparelho bucal (Williams *et al.*, 1981). O vírus pode ser transmitido iatrogenicamente por meio de agulhas ou instrumentos cirúrgicos, bem como por transfusão de hemoderivados contaminados. A transmissão do EIAV também pode ocorrer pelo contato do sangue infectado com feridas expostas de um animal saudável (Borges *et al.*, 2013). Além dessas rotas de transmissão, alguns estudos mostraram a possibilidade de propagação do EIAV por transmissão vertical por via uterina / perinatal (ou seja, no útero e no parto), ou após a ingestão de colostro infectado, bem como por aerossóis (Bolfá *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2020; Cook *et al.*, 2013; Cullinane *et al.*, 2007).

O curso clínico da AIE é bem descrito em cavalos e pôneis, com poucas informações sobre asininos e mulas. Sabe-se que a apresentação dos sinais clínicos pode variar de acordo com a virulência da estirpe infectante, a quantidade de vírus a que o animal foi exposto e o estado imunológico do portador (Cook *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 1998). Em cavalos, as três fases clínicas da AIE descritas são: aguda, crônica e inaparente. A fase aguda é caracterizada por viremia e trombocitopenia, e ocorre entre 5 e 30 dias após a infecção (Issel and Coggins, 1979; Sellon, 1993), também pode ser acompanhada por febre, letargia, inapetência e nos casos

mais graves pode apresentar petéquias e anemia hemolítica; no entanto, os sinais também podem ser leves ou ausentes (Issel *et al.*, 2014). Após a fase aguda, o animal infectado entra na fase crônica, caracterizada por ciclos recorrentes de viremia, perda de peso, edema, anemia, trombocitopenia e, menos frequentemente, sinais clínicos neurológicos (Issel and Coggins, 1979; Issel *et al.*, 2014; Leroux *et al.*, 2004). Se o animal sobreviver, os sinais clínicos da fase crônica diminuem gradualmente ao longo de um período de aproximadamente um ano (Spyrou *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2012). Após esse período, cerca de 90% dos cavalos infectados pelo EIAV evoluem para a fase de portador inaparente, onde os sinais clínicos estão ausentes e a viremia é indetectável na maioria dos casos (Dong *et al.*, 2012; Issel *et al.*, 2014).

Os achados clínicos – patológicos e laboratoriais dos muares, mostram que eles produzem sinais clínicos parecidos com os que são observados em equinos (Spyrou *et al.*, 2003). No entanto, os jumentos, apesar de serem susceptíveis ao EIAV, apresentam níveis de viremia muito baixos, o que pode explicar o fato de não demonstrarem, usualmente, os sinais clínicos da enfermidade. Cook e colaboradores (2001) realizaram infecção experimental de jumentos e cavalos com a estirpe patogênica do *Equine infectious anemia virus* (EIAV_{PV}). Todos os cavalos do experimento apresentaram sinais clínicos da AIE enquanto os jumentos permaneceram assintomáticos durante os 365 dias de observação. A soroconversão dos animais ocorreu entre 20 e 40 dias pós-infecção para cavalos e jumentos. Os jumentos apresentaram carga viral detectada em ensaios de RT-PCR 100.000 vezes menor, quando comparados aos cavalos durante as três primeiras semanas pós-infecção. Já na infecção com uma estirpe altamente virulenta do EIAV (EIAV Wyoming), a diferença na carga viral entre essas duas espécies, foi cerca de 1000 vezes menor nos jumentos, e a soroconversão dos animais foi detectada duas semanas após a infecção. Neste mesmo trabalho, macrófagos derivados de monócitos (MDM) equinos e asininos foram igualmente suscetíveis à infecção *in vitro*, sugerindo que as diferenças clínicas observadas entre essas duas espécies não estão relacionadas à permissividade da célula hospedeira.

Uma vacina contra a AIE, baseada em vírus vivo atenuado em leucócitos de jumento, foi desenvolvida em 1975 pelo Harbin Veterinary Research Institute, na China (HVRI, 2015). Essa vacina foi obtida por meio de um processo de atenuação em três etapas, a primeira etapa consistiu na passagem em série da estirpe EIAV_{LN} (LN40), uma estirpe altamente patogênica isolada de um cavalo em Liaoning. A segunda etapa foi a passagem da LN40 117 vezes *in vivo*,

em asininos. Após essa etapa a estirpe tornou-se ainda mais patogênica (EIAV_{DV117}). A atenuação foi obtida na terceira etapa, depois de 121 passagens seriadas *in vitro* da estirpe EIAV_{DV117} em cultivo primário de macrófagos derivados de monócitos de asininos (EIAV_{DLV121}), que forneceu 85% de proteção em cavalos e 100% em jumentos.

Devido ao custo e ao tempo gasto no isolamento de leucócitos, EIAV_{DLV121} foi cultivado em células FDD (células de derme de feto de jumento) e, após 13 passagens, a nova estirpe EIAV_{FDDV13} mostrou a mesma eficiência protetora que a estirpe anterior (EIAV_{DLV121}) (Shen *et al.*, 1979). Esse processo de atenuação viral mostra que a interação do EIAV com células de cavalo e jumentos é diferente, resultando em uma eficácia protetora vacinal distinta entre essas espécies, o que sugere que elas podem diferir em suscetibilidade. Após uma vacinação prévia com a estirpe atenuada (EIAV_{DLV121}), 25% dos cavalos e apenas 5% dos asininos não desenvolveram uma resposta imune eficaz ao EIAV quando foram desafiados com a estirpe patogênica (LN40) (Wang *et al.*, 2016). Para explicar a maior suscetibilidade dos cavalos mesmo após a vacinação, Yin *et al.*, 2013 demonstraram que o EIAV usa a maquinaria de tradução celular dos cavalos de forma mais eficiente do que quando comparado aos asininos e isso aumentaria a expressão de proteínas virais e, conseqüentemente, aumentaria a quantidade de vírions circulando no animal (Yin *et al.*, 2013). Além disso, outros estudos sugeriram que a enzima de edição de RNA adenosina desaminase equina (eADAR1) regula positivamente EIAV *in vitro* pelo aumento da expressão da proteína viral associada à região LTR e RRE na região env (Tang *et al.*, 2015). Uma análise genômica revelou múltiplas mutações, especialmente substituições de A para G, no genoma da estirpe EIAV_{DV117}, quando comparada à estirpe parental EIAV_{LN40}. As mutações foram encontradas principalmente nos dinucleotídeos 5'TpA e 5'ApA, que são comumente direcionados por ADAR1, portanto, ADAR1 é mais provável de estar relacionado na adaptação de EIAV de cavalos para asininos (Tang *et al.*, 2016).

Embora a indução de respostas imunes celulares e humorais já tenha sido demonstrada em animais vacinados com a vacina chinesa (Wang *et al.*, 2018), sua eficácia não é totalmente comprovada, principalmente quando os animais são desafiados com estirpes heterólogas do EIAV. Portanto, a eficiência da vacina estaria comprometida em outras regiões do mundo, devido à diversidade genética das estirpes do EIAV (Meng *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011). Uma desvantagem adicional dessa vacina é a impossibilidade de distinguir entre animais vacinados e infectados naturalmente, o que pode comprometer as medidas de controle baseadas em testes

sorológicos (Cook *et al.*, 2013). Com as limitações relatadas sobre a vacina desenvolvida na China, não existe vacina ou tratamento eficaz disponível para a AIE e seu controle ocorre por meio da identificação, segregação e / ou eutanásia de animais infectados com o EIAV (Italy, 2006; Brazil, 2004; USDA, 2007; Wang *et al.*, 2018). O método oficial para o diagnóstico da AIE em vários países ao redor do mundo é a técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), também conhecida como Teste de Coggins (WHO, 2019). Alguns países, como EUA, Brasil e Itália, utilizam o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) como método de triagem devido à sua alta sensibilidade (Brasil, 2014; Cook *et al.*, 2013; Issel and Cook, 1993; Scicluna *et al.*, 2013). Também existe um teste de imunoblotting, que pode ser usado como uma terceira técnica confirmatória, mas este teste não está disponível comercialmente e é usado apenas em laboratórios de referência nos Estados Unidos e na Itália (Cullinane *et al.*, 2007).

Um dos problemas de se usar apenas testes sorológicos para o diagnóstico da AIE é que existe uma “janela imunológica”, que se refere ao tempo entre a infecção e a soroconversão. Em cavalos e pôneis, este período é geralmente inferior a 45 dias, mas períodos de até 157 dias já foram relatados para o teste IDGA (Cullinane *et al.*, 2007). A soroconversão experimental em asininos levou o dobro do tempo que em equinos (Cook *et al.*, 2001). Durante o período da “janela imunológica” as cargas virais associadas ao sangue podem atingir seus níveis mais elevados, maximizando o risco de transmissão (Cook *et al.*, 2013). Também existe a hipótese de que o EIAV pode estabelecer infecções sorologicamente silenciosas semelhantes às observadas com o *woodchuck hepatitis virus* (WHV) e o *simian immunodeficiency virus* (SIV) (Ricotti *et al.*, 2016), ou seja, vírus e material genético são identificados, porém por um mecanismo ainda não elucidado, a replicação viral não estimula a resposta imune humoral detectável (Cook *et al.*, 2018; Romo-Sáenz *et al.*, 2021).

Scicluna e colaboradores (2013) observaram um aumento da eficiência do diagnóstico da AIE, ao usarem três métodos diferentes em sequência, primeiro o ELISA para triagem, segundo o teste de IDGA para confirmação dos resultados positivos no ELISA e terceiro o imunoblot (IB), para elucidar os resultados conflitantes entre os dois testes anteriores. Observou-se que a frequência de amostras com resultado IDGA negativo e ELISA/imunoblot positivo foi significativamente maior nos muarees do que nos equinos, o que sugere uma dificuldade no diagnóstico de muarees, sendo importante o papel dessa espécie híbrida na disseminação e manutenção do EIAV em rebanhos infectados.

Oliveira et al. (2017) avaliaram a soroprevalência do EIAV em uma população de jumentos do Brasil, usando o teste de IDGA, dois testes de ELISA e o IB para os resultados discordantes. A taxa de animais soropositivos encontrada usando o teste de IDGA nesse estudo foi de 1,6%, aumentando 100% quando as mesmas amostras foram submetidas aos testes de ELISA. As amostras com resultados discordantes entre os testes de IDGA e ELISA foram testadas com o IB, a partir dos resultados desse teste observou-se que os testes de ELISA assim como o teste de IDGA produziram resultados falsos, sendo a prevalência verdadeira do EIAV igual a 3%. O estudo de Oliveira et al. (2017) corrobora com estudos anteriores realizados em cavalos (Cullinane *et al.*, 2007; Issel *et al.*, 2013; Scicluna *et al.*, 2013), enfatizando a necessidade de uma nova abordagem diagnóstica para pesquisa do EIAV em equídeos, e principalmente em asininos, visto que eles normalmente apresentam reações extremamente fracas na IDGA produzindo resultados falso-negativos ou de difícil interpretação, provavelmente em decorrência do atraso na soroconversão ou baixos níveis de anticorpos quando comparados aos cavalos e pôneis (Cook *et al.*, 2001).

Os demais artigos citados na Tabela 2 utilizaram apenas um único teste de diagnóstico para AIE, o clássico IDGA (Getachew *et al.*, 2014; Maresca *et al.*, 2012; Chenchev *et al.*, 2011) ou o ELISA (Wegdan *et al.*, 2017). Por causa da limitação de técnicas empregadas nesses levantamentos é provável que a soropositividade encontrada esteja superestimada no Sudão e subestimada na Itália, Bulgária e Etiópia. Como relatado acima, apesar de muito específico, o IDGA é pouco sensível, elevando o número de diagnósticos com resultados falso-negativos (Scicluna *et al.*, 2013), devido a isso, acredita-se que as prevalências dos estudos que usaram somente o teste de IDGA estejam subestimadas. As ocorrências da AIE na Itália, Sudão e Brasil foram correlacionadas com a localização geográfica, regiões menos propícias a presença de vetores naturais, apresentaram uma soropositividade menor, quando comparadas a outras regiões dentro de cada um dos países (Maresca *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017; Wegdan *et al.*, 2017).

Nas circunstâncias em que a sorologia não é adequada, recomenda-se o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) e até o isolamento viral, mas essas técnicas apresentam limitações. O isolamento viral é extremamente complexo e raro, devido à dificuldade, custo e consumo de tempo para o cultivo de macrófagos derivados de monocitos, o que impede o uso rotineiro desta técnica (Cook *et al.*, 2013; OIE, 2018). O diagnóstico molecular por PCR é

limitado pelo fato de que o EIAV tem uma epidemiologia global muito complexa, apresentando um baixo nível de identidade entre as sequências de nucleotídeos conhecidas e sua divisão em diferentes clados (Cook *et al.*, 2020), dificultando o uso de *primers* de PCR universais para seu diagnóstico. A eficácia do diagnóstico molecular em asininos ainda é desconhecida, pois não existem isolados de campo nesta espécie que possam servir de base para ensaios de padronização.

1.4. Arterite viral equina (AVE)

A arterite viral equina (AVE) é uma doença respiratória e reprodutiva dos equídeos com distribuição mundial (Balasuriya *et al.*, 2013). O agente etiológico do AVE é o *Alphaarterivirus equid* (anteriormente conhecido como vírus da arterite equina [AVE]), um vírus de RNA de fita única de sentido positivo que pertence à família *Arteriviridae*, subfamília *Equarterivirinae* gênero *Alphaartevirus* na ordem *Nidovirales* (ICTV, 2020).

O *Alphaarterivirus equid* é transmitido por vias respiratórias ou venéreas em equinos, asininos e muares (Balasuriya *et al.*, 2018; Evans and Crane, 2018). A transmissão horizontal ocorre através do trato respiratório após a aerossolização de partículas virais presentes nas secreções respiratórias de cavalos com infecção aguda, facilitada pelo contato direto e / ou próximo com animais suscetíveis (Balasuriya *et al.*, 1999; McCollum *et al.*, 1971). Outras secreções corporais e excreções de animais infectados, como urina, fetos abortados e membranas fetais, também podem transmitir o vírus e desempenhar um papel significativo na precipitação de novos surtos de AVE (Guthrie *et al.*, 2010; McCollum *et al.*, 1971). A transmissão venérea ocorre exclusivamente através do sêmen de garanhão infectado na fase aguda ou crônica (Timoney *et al.*, 1987).

Embora o *Alphaarterivirus equid* esteja presente em todo o mundo, existem poucos estudos sobre a prevalência desta infecção em asininos e mulas (Tabela 3). Em cavalos, a prevalência de *Alphaarterivirus equid* varia entre países e entre cavalos de diferentes raças e idades dentro do mesmo país devido às práticas de manejo e genética das raças hospedeiras que fazem os garanhões se tornarem mantenedores de *Alphaarterivirus equid* de longo prazo (Balasuriya *et al.*, 2013; Balasuriya *et al.*, 2018); essas descobertas também podem se aplicar a jumentos. Nos últimos 10 anos, a presença de *Alphaarterivirus equid* em asininos foi relatada nos continentes asiático (Anatolia oriental, Turquia), europeu e americano (América do Sul e Central). A maior prevalência relatada foi na Bulgária (79,1%), e este estudo sugeriu que a taxa

elevada se devia à falta de medidas de controle para prevenir a doença (Chenchev *et al.*, 2011). Na África do Sul e no Chile, foram relatadas estirpes de *Alphaarterivirus equid* que infectam asininos diferentes das descritas em equinos (Chenchev *et al.*, 2011). A sequência genômica comparativa e as análises filogenéticas dessas estirpes com outras estirpes de *Alphaarterivirus equid* mostraram a existência de novos genótipos de *Alphaarterivirus* nessas regiões (Stadejek *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2017). Em um estudo conduzido por Bolfa *et al.* (2017), apenas um burro foi positivo para a presença de anticorpos contra *Alphaarterivirus equid*, e uma possível explicação é que esse animal era um portador assintomático que poderia ter sido importado.

Tabela 3 - Estudos de ocorrência da arterite viral equina que incluem asininos e/ou muares, no período de 2009 a 2019.

Doença	Espécies	% positivos	Local	Referências
AVE	Asininos	79,1% (152/192)	Bulgária	(Chenchev <i>et al.</i> , 2011)
	Asininos	20% (17/85)	Brasil	(Lara <i>et al.</i> , 2017)
	Asininos	2 animais	Chile	(Rivas <i>et al.</i> , 2017)
	Asininos	2,5% (1/40)	Índias Ocidentais	(Bolfa <i>et al.</i> , 2017)
	Asininos	8,3% (19/227)	Turquia	(Gür <i>et al.</i> , 2018)
	Equinos	15% (29/193)		
	Asininos	3,46% (53/1532)	Turquia	(Gür <i>et al.</i> , 2019)

Existem alguns estudos que levantam a hipótese de que os asininos são mais resistentes do que os equinos ao desenvolvimento da doença causada pelo *Alphaarterivirus equid*, apresentando na maioria das vezes infecções inaparentes ou sinais clínicos leves (McCollum *et al.*, 1995; PAWESKA *et al.*, 1997). Nos casos em que existem sinais clínicos evidentes, os asininos geralmente apresentam febre, depressão, secreção ocular e nasal (Evans and Crane, 2018). Semelhante aos garanhões equinos, 10–70% dos asininos se tornam portadores inaparentes e mantêm a disseminação viral através do sêmen. Todas as evidências indicam que os asininos são em sua maioria assintomáticos e também agem como reservatórios potenciais de *Alphaarterivirus equid* e ajudam a manter e perpetuar o vírus na população de equídeos (Evans and Crane, 2018; Balasuriya *et al.*, 2018).

1.5. Hepacivirus equino

Nonprimate Hepacivirus (NPHV), também conhecido como Equine Hepacivirus, pertence à família *Flaviviridae* e à espécie *Hepacivirus A*. Atualmente, o NPHV é descrito

como o vírus homólogo filogeneticamente mais próximo do *Hepatitis C Virus* (HCV) (ICTV, 2019).

Inicialmente descoberto em cães domésticos com doença respiratória (Kapoor *et al.*, 2011), em 2012 o NPHV foi identificado em cavalos, considerados alvos primários do vírus (Burbelo *et al.*, 2012). O NPHV foi identificado em amostras de soro coletadas de entre 1974 e 2016 em jumentos da Alemanha, Espanha, Bulgária, Itália, França e México bem como, em muares na Bulgária, onde foi detectado a presença de anticorpos em 31,5% (278/882) dos animais testados e de RNA viral em apenas 0,3% (3/882), que também eram soropositivos, sugerindo predominância de infecção aguda com rápida depleção viral (Walter *et al.*, 2016). Isso poderia explicar porque outros estudos falharam em detectar o vírus em asininos e muares no Brasil (n=1 e 35) (Figueiredo *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014), China (n=14) (Lu *et al.*, 2016), Reino Unido (n=16) (Lyons *et al.*, 2012) e Itália (n=134) (Elia *et al.*, 2017), uma vez que utilizaram apenas técnicas baseadas em PCR para rastrear o vírus e também um limitado número amostral.

Um trabalho recentemente publicado, identificou que uma sequência parcial de E2 do NPHV isolada de jumento infectado apresentou um grau de divergência de 22% entre os nucleotídeos da mesma sequência isolada de cavalo (Schlottau *et al.*, 2019). Isso indica que possivelmente o vírus adquire variabilidade genética quando ultrapassa a barreira interespecie. O acúmulo de variações pode produzir variantes antigenicamente distintas entre os equinos e asininos e, com isso, interferir no diagnóstico molecular em asininos.

O NPHV é hepatotrópico e a infecção é subclínica nos equídeos. Embora, a carga viral permaneça similar entre equinos e asininos, observou-se um leve aumento de enzimas hepáticas em cavalos, enquanto nos jumentos as concentrações enzimáticas permaneceram dentro da faixa de referência (Pfaender, Cavalleri, *et al.*, 2015; Walter *et al.*, 2016). A ausência de alterações em asininos pode ser um reflexo ao intervalo de tempo entre a infecção inicial e os testes realizados, uma vez que com o tempo, os equídeos acometidos pelo vírus tendem a debelar a infecção e recuperar as funções fisiológicas do organismo (Pfaender, Cavalleri, *et al.*, 2015). Todavia, pode-se especular que os asininos sejam mais resistentes ao NPHV e por isso debelam mais rapidamente a infecção, conforme já observado em outras doenças, como a AIE.

Contudo, ainda não está claro qual o impacto deste novo vírus para a equideocultura e, até o momento, o NPHV não representa risco para a saúde pública (Pfaender, Walter, *et al.*, 2015). Entretanto, o uso dos equídeos como modelo animal alternativo aos estudos com o HCV,

podem ajudar a elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na depleção viral e possivelmente na resistência natural da espécie asinina, podendo ter implicações consideráveis no desenvolvimento de medicamentos e vacinas eficazes frente a outros vírus filogeneticamente relacionados.

1.6. Herpesvírus equinos (HVEs)

Os herpesvírus equinos (HVEs) são patógenos que estabelecem infecções latentes e afetam todos os membros da família *Equidae* em todo o mundo. São vírus DNA, envelopados pertencentes à família *Herpesviridae* (ICTV, 2020). Existem até o momento nove herpesvírus equídeos identificados (EHV-1 a EHV-9) - seis deles pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae* e três a subfamília *Gamaherpesvirinae* – juntamente com uma série de herpesvírus asinino (AHV) (Tabela 4) (Allen *et al.*, 2004; Slater, 2014).

Tabela 4 - Principais herpesvirus de alguns membros da família equidae

Vírus	Sinônimo	Subfamília	Gênero	Tamanho do genoma (kpb)	Grau de identidade	Hospedeiro Natural	Doenças
EHV-1	Vírus do abortamento equino	<i>α</i>	<i>Varicellovirus</i>	150	EHV-4 55 a 96%	<i>Equus caballus</i>	Respiratória, abortamento, neurológica
EHV-2	Antigo citomegalovírus equino	<i>γ</i>	<i>Percavirus</i>	184	EHV-5 60%	<i>Equus caballus</i>	Rinite e conjuntivite
EHV-3	Vírus do exantema coital equino	<i>α</i>	<i>Varicellovirus</i>	151	EHV-1/EHV-4 /EHV-8/EHV-9 63%	<i>Equus caballus</i>	Exantema coital
EHV-4	Vírus da rinopneumonite equina	<i>α</i>	<i>Varicellovirus</i>	146	EHV-1 55 a 96%	<i>Equus caballus</i>	Respiratória
EHV-5	Antigo citomegalovírus equino	<i>γ</i>	<i>Percavirus</i>	179	EHV-2 60%	<i>Equus caballus</i>	Fibrose pulmonar multinodular
EHV-6	<i>Asinine herpesvirus type 1</i>	<i>α</i>	<i>Varicellovirus*</i>			<i>Equus asinus</i>	Exantema Coital
EHV-7	<i>Asinine herpesvirus type 2</i>	<i>γ</i>	<i>Rhadinovirus</i>			<i>Equus asinus</i>	-
EHV-8	<i>Asinine herpesvirus type 3</i>	<i>α</i>	<i>Varicellovirus</i>	149	EHV-1/EHV-9 89% / 92%	<i>Equus asinus</i>	Rinite
EHV-9	<i>Gazelle herpesvirus</i>	<i>α</i>	<i>Varicellovirus</i>	148	EHV-1 86 - 95%	<i>Equus grevyi</i>	Neurológica
AHV-4	<i>Asinine herpesvirus type 4</i>	<i>γ</i>	Não classificado			<i>Equus asinus</i>	Pneumonia
AHV-5	<i>Asinine herpesvirus type 5</i>	<i>γ</i>	Não classificado			<i>Equus asinus</i>	Pneumonia, Fibrose pulmonar multinodular
AHV-6	<i>Asinine herpesvirus type 6</i>	<i>γ</i>	Não classificado			<i>Equus asinus</i>	-
ZHV	<i>Zebra herpesvirus</i>	<i>γ</i>	Não classificado			<i>Equus zebra</i>	Pneumonia
WAHV	<i>Wildass herpesvirus</i>	<i>γ</i>	Não classificado			<i>Equus somalicus</i>	-

α: Alphaherpesvirinae; *γ*: Gammaherpesvirinae.

*Pode ser membro do gênero, porém ainda não foi aprovado como espécie

Fonte: Back et al. 2012; Fortier et al. 2010; Fukushi, Yamaguchi, and Yamada 2012; Garvey et al. 2018; Izume et al. 2017; King et al. 2011; Scheurer et al. 2020; Sijmons et al. 2014; Wilkie et al. 2016.

O EHV-1 e o EHV-4 são clinicamente, economicamente e epidemiologicamente os mais relevantes patógenos dentro desta família provocando problemas no trato respiratório de cavalos em todo o mundo (Patel and Heldens, 2005). Ambos foram associados com aborto e doenças respiratórias e neurológicas em asininos (Evans and Crane, 2018; Kapoor *et al.*, 2014; Thiemann, 2012). Embora incomum a mieloencefalopatia por herpesvírus equino (EHM) causada por EHV-1, foi descrita em jumentos e mulas, em surtos ocorridos na Etiópia nos anos de 2011-2013. O EHM foi fatal em jumentos, sendo observadas mortes sem sinais clínicos aparentes (Negussie *et al.*, 2017). Esses vírus são antígenicamente e geneticamente relacionados apresentando reação cruzada devido à similaridade entre 55 a 96% na sequência de aminoácidos das glicoproteínas de superfície (Kapoor *et al.*, 2014). Sabe-se que o EHV-1 e EHV-4 são amplamente distribuídos no mundo, em espécies de equídeos domésticos (Mori *et al.*, 2015; Pusterla and Hussey, 2014). No entanto, os estudos sobre a presença de anticorpos contra herpesvírus em jumentos ainda são poucos (Tabela 5).

Tabela 5 - Estudos de ocorrência do herpesvírus equino que incluem asininos e/ou muares, no período de 2009 a 2019.

Doença	Espécie	% positivos	Local	Referência
EHV	Asininos	24,2% (31/128)	Turquia	(Ataseven <i>et al.</i> , 2009)
	Equinos	14,5% (42/290)		
	Muare	37,2% (32/86)		
	Asininos	0% (0/4)	Brasil	(Lara <i>et al.</i> , 2010)
	Equinos	18,7% (140/749)		
	Muare	6,8% (5/73)		
	Asininos	69,7% (134/192)	Bulgária	(Chenchev <i>et al.</i> , 2011)
	Asininos	EHV-1 20,2% (21/104) EHV-4 84,6% (88/104)	Etiópia	(M. Getachew, F. Alemayehu, C. Chala, B. Amare, D. Kassa, F. Burden, 2014)
	Equinos	EHV-1 7% (7/100) EHV-4 91% (91/100)		
	Muare	EHV-1 0% (0/4) EHV-4 100% (4/4)		
	Asininos	EHV-1 33,3% (4/12) EHV-9 0% (0/12)		
	Somali wild ass	EHV-1 73,6% (14/19) EHV-9 5,2% (1/19)	Tanzânia e Namíbia	(Abdelgawad <i>et al.</i> , 2015)
	Zebra	EHV-1 61,8% (55/89) EHV-9 29,2% (26/89)		
	Asininos	2 animais	EUA	(Pusterla <i>et al.</i> , 2016)
	Equinos	115 animais		
	Muare	2 animais		
	Asininos	EHV-1 51,85% (126/243)	Turquia	

	EHV-4 64,2% (156/243)		
Equinos	EHV-1 52,48% (222/423)		(Yildirim <i>et al.</i> , 2015)
	EHV-4 83,69% (354/423)		
Asininos	69,5% (57/82)	Sudão	(Wegdan <i>et al.</i> , 2016)
Equinos	65,9% (83/126)		
Asininos			(Ali and Mohammadi, 2016)
Muare	14,8% (16/108)	Iran	
Asininos	82 animais	Etiópia	(Negussie <i>et al.</i> , 2017)
Equinos	6 animais		
Muare	3 animais		
Asininos	74,7% (201/269)	Etiópia	(Mekonnen <i>et al.</i> , 2017)
Equinos	66,7% (64/96)		
Muare	50% (6/12)		
Asininos	EHV-1 10% (4/40)	Índias Ocidentais	(Bolfá <i>et al.</i> , 2017)
	EHV-4 53% (21/40)		
Equinos	EHV-1 27,6% (39/140)		
	EHV-4 90% (126/140)		
Asininos	47% (40/85)	Brasil	(Lara <i>et al.</i> , 2017)

Alguns dos estudos relacionados na Tabela 5, descrevem uma maior taxa de prevalência dos herpesvírus equinos em jumentos, sugerindo que estes podem representar uma importante fonte de infecção para outros equídeos (Ali and Mohammadi, 2016; Ataseven *et al.*, 2009; Getachew *et al.*, 2014; Mekonnen *et al.*, 2017; Negussie *et al.*, 2017). Também foi sugerido que animais mais velhos teriam uma maior taxa de incidência da infecção e, que o sexo também estaria correlacionado com a ocorrência da infecção. A correlação entre idade e doença é facilmente explicada, pois animais mais velhos possuem um maior tempo de exposição a infecção, logo à medida que é desafiado naturalmente pelos HVEs e se recupera, ocorre um aumento na prevalência de anticorpos contra o vírus (Ataseven *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2010; Negussie *et al.*, 2017). Em relação a correlação entre sexo e doença houveram divergências de resultados nos diferentes trabalhos. Bolfá *et al.* (2017) sugeriram que machos são mais susceptíveis a infecção pelos EHV-1 e 4, enquanto Lara *et al.* (2017) e Negussie *et al.* (2017) sugeriram um possível papel das fêmeas na “manutenção” da doença no rebanho, por serem mais susceptíveis a infecção por HVE.

Nos asininos e muare têm sido relatadas algumas infecções por um gammaherpesvirus semelhante ao *Equine herpesvirus type 5* (EHV-5), isolado a partir de um swab da faringe de um jumento com doença neurológica em Ontario, Canada (Vengust *et al.*, 2008). O EHV-5 também foi detectado em jumentos com pneumonia intersticial, assim como o EHV-4 (Kleiboeker *et al.*, 2002). Outro gammaherpesvirus como o *Equid herpesvirus type 7* (EHV-7);

também conhecido como herpesvírus asinino 2 (AHV-2), foi isolado a partir do sangue de um jumento saudável e das secreções nasais de uma mula após um surto de doença respiratória (Bell *et al.*, 2008; Browning *et al.*, 1988). O primeiro AHV-2 descrito em 1988, foi isolado a partir de um jumento saudável, mas quando inoculado em dois jumentos recém-desmamados produziu um quadro de rinite aguda (Browning *et al.*, 1988). Outro estudo constatou que o EHV-7 foi recuperado de secreções nasais em aproximadamente 8% de mulas saudáveis (n = 114) e jumentos (n = 13) (Bell *et al.*, 2008). O EHV-8 (AHV-3), considerado como o progenitor do EHV-1, é um vírus de asininos e induz uma rinite leve nessa espécie. Asininos também podem apresentar lesões semelhantes ao exantema equino-coital, que pode ser causado pelo EHV-6 (equivalente ao AHV-1) (Barrandeguy and Carossino, 2018).

Não existem procedimentos terapêuticos e de biossegurança específicos para os herpesvírus asininos, as medidas que devem ser tomadas para os asininos infectados com algum herpesvirus, devem ser seguidas de acordo com os protocolos elaborados para tratamento de HVE em equinos (Mendoza *et al.*, 2018). Porém, a fisiologia única dos jumentos não deve ser negligenciada, como por exemplo, infecções respiratórias podem ser agravadas por causa da hiperlipidemia, que é comum em jumentos (Evans e Crane, 2018).

1.7. Encefalites causadas por flavivirus

O *West Nile virus* (WNV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV) e *Japanese Encephalitis virus* (JEV) são arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, (Go *et al.*, 2014). Esses vírus são transmitidos pela picada de mosquitos hematófagos e causam condições neurológicas fatais em humanos e cavalos (Go *et al.*, 2014). Na natureza, o ciclo de transmissão da encefalite, causada por esses três vírus, é mantido principalmente por vetores biológicos do gênero *Culex*. Aves da ordem Passeriformes podem atuar como reservatórios e amplificadores do WNV (Angenvoort *et al.*, 2013), assim como pássaros aquáticos e porcos são reservatórios potenciais para JEV (OIE, 2019b). Humanos e equinos são considerados hospedeiros finais acidentais e não são capazes de produzir viremia suficiente para infectar novos vetores (Go *et al.*, 2014).

Os sinais clínicos neurológicos causados por essas infecções em cavalos são semelhantes ou idênticos aos sinais induzidos por vários outros patógenos, incluindo o EHV-1 e o *Rabies virus* (Aleman *et al.*, 2018). Portanto, os exames laboratoriais são fundamentais para um diagnóstico preciso. Os ensaios ELISAs são cada vez mais usados porque são rápidos e

baratos. No entanto, a maioria dos flavivírus são antigenicamente relacionados, o que resulta em reatividade cruzada entre eles, especialmente o SLEV, JEV e WNV, o que torna o diagnóstico sorológico mais difícil (Go *et al.*, 2014; Tauro *et al.*, 2012). Frequentemente, é necessário usar testes confirmatórios adicionais, especialmente em certas regiões onde há co-circulação desses vírus relacionados, sendo os testes de neutralização viral e os testes de redução de placa (PRNT) os mais específicos (Barba *et al.*, 2019; OIE, 2019b). As técnicas baseadas em RT-PCR podem ser usadas para a detecção direta do vírus e são altamente específicas. No entanto, a natureza transitória da viremia de flavivírus representa uma limitação importante para o uso desta metodologia. As infecções por WNV, por exemplo, têm uma única fase virêmica de 4 a 6 dias em cavalos. Portanto, devido à possibilidade de resultados falso-negativos por PCR, a confirmação por testes sorológicos é necessária, geralmente ELISAs para IgM antiviral são usados para esse fim (Angenvoort *et al.*, 2013; Barba *et al.*, 2019).

Evidência sorológica da infecção por JEV foi relatada em muares no Himalaia e em asininos no Paquistão (Chakravarti *et al.*, 1981; Zohaib *et al.*, 2014). Dados da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) mostram que o JEV já foi identificado na Índia, Japão, Coreia, Bangladesh, Laos, Filipinas, Timor-Leste, China, Papua Nova Guiné e Austrália (OIE, 2020), porém não há descrição da espécie acometida. O JEV representa um grande problema de saúde pública na Ásia por ser a principal causa de encefalite viral em humanos, com aproximadamente 68.000 casos clínicos por ano (OIE 2019), aproximadamente 50% destes casos ocorrem na China (Campbell *et al.*, 2011), onde também é frequente a ocorrência de casos em equídeos (OIE, 2020). Na China encontra-se uma das maiores populações de asininos e muares do mundo (FAO, 2019), que têm apresentado um declínio significativo devido ao abate deliberado dessas espécies para obtenção do ejiao (gelatina chinesa feita a partir da pele do jumento), o que tem despertado preocupação dos especialistas (Zhu and Weng, 2018). A ocorrência de doenças infecciosas pode agravar ainda mais essa situação, como é o caso da encefalite japonesa, que tem alta taxa de mortalidade, podendo chegar até a 30-40% em casos mais graves (OIE, 2019).

A circulação do SLEV parece estar restrita às Américas, e estudos sorológicos em cavalos mostram sua ocorrência em países do Caribe (Nadin N. Thompson *et al.*, 2012), América Central (Carrera *et al.*, 2018) e América do Sul (Tauro *et al.*, 2012; Burgueño *et al.*, 2013). Porém, em asininos e muares, a ocorrência da doença só foi descrita no Panamá (Carrera

et al., 2018) e em dois estados do Brasil, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Costa *et al.*, 2019; Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2014).

De acordo com a OIE, a ocorrência do WNV já foi relatada em países de todos os continentes, exceto Antártida, com destaque para Israel, Hungria, Guatemala, Haiti, Canadá e EUA, que têm apresentado casos há vários anos consecutivos (OIE, 2020). A infecção por WNV já foi descrita em um jumento no sul da França com sinais neurológicos, que apresentou um curto período de remissão, seguido de insuficiência hepática grave (Murgue *et al.*, 2001). O vírus já foi identificado em fragmentos do sistema nervoso central de asininos sintomáticos no Brasil, que apresentavam tremores musculares, disfagia, ataxia de membro anterior, decúbito lateral e movimentos de remo nas primeiras 24 horas, seguido de paralisia dos membros pélvicos, perda de sensibilidade na coluna vertebral e trismo mandibular (Silva *et al.*, 2019). Nos EUA, três muare com sinais clínicos e diagnosticados com WNV sobreviveram e nenhum deles ficou em decúbito durante o curso da doença, enquanto um asinino não conseguiu se recuperar (Salazar *et al.*, 2004). Também já foram encontrados anticorpos em animais clinicamente saudáveis em vários países (Tabela 6).

Tabela 6 - Estudos de soroprevalência do WNV que incluem asininos e/ou muare.

Local	Espécie	% positivos	Referência
Província da Anatólia (Turquia)	Asininos	20% (14/70)	(Yildirim <i>et al.</i> , 2018)
	Equinos	0,8% (1/118)	
Turquia	Asininos	1,28% (3/234)	(Mehmet <i>et al.</i> , 2017)
	Equinos	4,15% (27/650)	
Tunísia	Equídeos ¹	28% (332/1189)	(Bargaoui <i>et al.</i> , 2013)
Borno (Nigéria)	Asininos	8,6% (5/58)	(Baba <i>et al.</i> , 2014)
	Equinos	11,5% (11/96)	
Paquistão	Asininos Equinos	55,4% (249/449)	(Zohaib <i>et al.</i> , 2014)
Senegal	Asininos	86,2% (25/29)	(Davoust <i>et al.</i> , 2016)
	Equinos	68,7% (44/64)	
Argélia	Asininos	14,4% (33/222)	(Lafri <i>et al.</i> , 2017)
	Equinos	26,8% (19/71)	
Palestina e Israel	Asininos	39,3% (50/127)	(Azmi <i>et al.</i> , 2017)
	Equinos	82,6% (380/460)	
Índias Ocidentais	Asininos	15% (6/40)	(Bolfa <i>et al.</i> , 2017)
	Equinos	18,6% (26/140)	
Egito	Asininos	12,7% (83/150)	(Selim <i>et al.</i> , 2020)
	Equinos	20,7% (83/400)	
Arquipélago de Guadalupe	Asininos	47,6% (10/21)	(Pradel <i>et al.</i> , 2009)
	Equinos/Pôneis	22,3% (69/309)	

Chiapas e Puebla (México)	Asininos/Muare Equinos	25% (4/16)	(Alonso- Padilla <i>et al.</i> , 2009)
Mato Grosso (Brasil)	Equídeos ¹	1,8% (4/217)	(Ometto <i>et al.</i> , 2013)

¹ Autores não especificaram a espécie avaliada

Alguns autores sugerem que asininos e muare podem ser mais resistentes à infecção pelo WNV ou podem apresentar sinais clínicos mais leves após a exposição, embora sinais mais graves possam ocorrer eventualmente (García-Bocanegra *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2004). Yildirim *et al.* (2018) detectaram RNA viral em 28,5% (4/14) dos jumentos soropositivos, sugerindo infecção com ausência de sinais clínicos. Durante um surto na Espanha, asininos e muare soropositivos foram detectados em municípios onde casos clínicos não haviam sido relatados, sugerindo que há maior disseminação geográfica do que se pensava e que essas espécies podem ser utilizadas como sentinelas para o WNV, uma vez que essa suposta resistência possibilita a maior permanência destes animais no plantel (García-Bocanegra *et al.*, 2012).

Trabalhos mostram que a soroprevalência para o WNV pode ser maior em asininos em relação aos equinos (tabela 6). Yildirim *et al.* (2018) atribuíram tal achado ao fato de que os jumentos do estudo eram utilizados principalmente para o transporte de água e por isso apresentariam maior risco de exposição aos vetores. Davoust *et al.* (2016) detectaram maior soroprevalência em asininos do que em equinos, porém sem diferença estatisticamente significativa, enquanto Bargoui *et al.* (2013) não observaram diferença na taxa de soroprevalência entre as ambas as espécies, o que já era esperado uma vez que os animais se encontravam em condições ambientais similares e eram utilizados para a mesma finalidade. Em contrapartida, alguns trabalhos mostram uma tendência de maior soroprevalência em equinos do que em asininos, mas sem significância estatística (Zohaib *et al.*, 2014; Selim *et al.*, 2020). Essa é uma relação complicada de se estabelecer e é comum uma discrepância na amostragem, a maioria dos trabalhos não exploram a fundo os resultados obtidos para os asininos e muare, alguns deles nem sequer fazem diferenciação entre as espécies na avaliação dos dados. Ao que parece, ambas as espécies têm a mesma susceptibilidade, porém diferenças de prevalência podem ocorrer por influência de fatores como: localização geográfica, tamanho da população e diferentes utilizações dos animais de cada espécie.

Os distúrbios neurológicos são importantes ameaças à saúde e à economia. Os trabalhos dos últimos 20 anos indicam que essa morbidade representa a quinta causa de morte entre cavalos adultos (Lecollinet *et al.*, 2020), mesmo assim poucas pesquisas foram realizadas para avaliar a carga de doenças neurológicas nesta espécie e menos ainda em asininos e muares, que são abundantes em regiões do mundo propícias à existência de infecções devido a altas cargas de vetores artrópodes (Barrandeguy and Carossino, 2018).

1.8. Influenza equina

O *Influenza virus* (IV), compõe um grande grupo de estirpes diretamente associado a infecções respiratórias graves em várias espécies. O IV é classificado na família *Orthomyxoviridae* e no gênero *Influenza* (Timoney, 1996). Por ser transmissível por via aérea e ser altamente variável, o IV é constantemente alvo de preocupações relacionadas à possível ocorrência de pandemias (Tellier, 2006). O *Influenza virus* foi classificado em 4 tipos denominados: A, B, C e D, com base nos genes da matriz e da nucleoproteína. Os vírus tipo A infectam animais e humanos, enquanto os vírus dos tipos B e C infectam apenas seres humanos. O subtipo D foi relatado em suínos, bovinos, ovinos e caprinos (Ferguson *et al.*, 2016).

Em equídeos, o *Equine influenza virus* (EIV), classificado no tipo A, é considerado um dos patógenos respiratórios virais mais importantes, desenvolvendo uma doença de alta morbidade. A gripe equina é causada principalmente pelos subtipos, H7N7, reconhecido pela primeira vez no ano de 1956 (Webster *et al.*, 1992) e H3N8, isolado pela primeira vez no ano de 1963 (Oxburgh *et al.*, 1994). Desde então, o aumento no trânsito de animais infectados, mas sem sinais clínicos e submetidos a procedimentos inadequados de quarentena disseminou o EIV para todo o mundo, com exceção de um pequeno número de países insulares, incluindo a Nova Zelândia e a Islândia (Cullinane and Newton, 2013).

Uma vez no hospedeiro, o EIV tem tropismo pelas células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior e inferior, induzindo à necrose das células epiteliais, exsudação de líquidos ricos em proteínas e aglomeração dos cílios (Singh *et al.*, 2018). O início dos sinais clínicos surge entre 5 a 14 dias pós infecção e em equinos são caracterizados por tosse seca, febre, letargia, anorexia, linfonodos aumentados, taquicardia, hiperemia das vias respiratórias e mucosas conjuntivais, corrimento nasal seroso, edemas dos membros, dor, rigidez muscular e abortos (van Maanen and Cullinane, 2002). Eventualmente, os animais infectados podem desenvolver sinais clínicos mais graves, caracterizados por miocardite e doença pulmonar

obstrutiva crônica. Apesar da alta morbidade, a taxa de mortalidade é baixa e normalmente ocorre, em casos de pneumonia com sequelas (Landolt and Olsen, 2007).

Asininos e muares, uma vez acometidos, desenvolvem sinais clínicos semelhantes aos equinos, todavia, em jumento os sintomas são agravados e quadros graves de pneumonia broncointersticial típica caracterizada por bronquiolite necrosante, hemorragias, presença de alvéolos extremamente inchados e exsudação fibrinosa são comumente descritas nestes animais (Yang *et al.*, 2018). Existem evidências proveniente de surtos que acometeram a China entre 1993 e 1994, que demonstraram que enquanto mulas e cavalos apresentavam sinais clínicos brandos, os jumentos infectados sob as mesmas condições de exposição ao vírus eram severamente atingidos e comumente evoluíam para o óbito (Timoney, 1996; Shortridge, 1995). A maior susceptibilidade dos asininos frente a infecção pelo EIV se deve à maior propensão destes animais em desenvolver broncopneumonia bacteriana (Thiemann and Bell, 2001), todavia, Rose *et al.* (1970) atribuiu a maior gravidade dos sinais clínicos nestes animais, a coinfeção recorrente por nematódeos pulmonares *Dictyocaulus arnfieldii* (Rose *et al.*, 1970).

Embora, aproximadamente 50,5% da população mundial de equídeos, sejam correspondentes aos asininos e muares (FAO, 2019), até o momento a infecção pelo EIV nestes animais é considerada rara, mesmo com a maior predisposição dos jumentos em desenvolverem a forma grave da doença, quando infectados. Os dados epidemiológicos referentes a presença do EIV em asininos, são limitados a surtos de doença respiratória, ocasionado pela sublinhagem H3N8 em Xinjuang no ano de 2007, acometendo aproximadamente 13,600 animais (Qi *et al.*, 2010), em Shandong no ano de 2017, limitada a uma propriedade, onde foram encontrados 300 animais soropositivos e uma mortalidade de 25% (Yang *et al.*, 2018) e mais recente, em 2020 na cidade de Liaocheng, onde de 120 jumentos não vacinados, foi encontrado uma soropositividade média de 32,5% (Yongfeng *et al.*, 2020), todos esses surtos foram descritos em províncias da China, indicando que o EIV é uma ameaça importante para as grandes fazendas de asininos do país.

Atualmente, a vacinação é a estratégia mais eficaz, juntamente com medidas de isolamento, controle no trânsito de animais e adoção de medidas de biossegurança básica, para prevenir infecções pelo EIV ou limitar suas consequências (Pica and Palese, 2013; Wong and Webby, 2013). Entretanto, devido a não obrigatoriedade, à vacinação contra o EIV em rebanhos, principalmente de asininos e muares, que são espécies negligenciadas, são pouco

frequentes e muitas vezes ausentes. Contudo, acreditamos que a circulação contínua do EIV enfatiza a necessidade de uma vigilância eficaz nos rebanhos de equídeos que inclui a manutenção do calendário vacinal atualizado e aplicação de testes diagnósticos a fim de detectar os casos subclínicos antes do trânsito dos animais entre as diferentes localidades.

As informações gerais (taxonomia, hospedeiro natural, transmissão, método de diagnóstico e prevenção) dos vírus acima mencionados estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Resumo das doenças infecciosas virais equinas, listando os agentes infecciosos, seu agrupamento taxonômico, hospedeiros naturais, caracterização clínica, mecanismos de transmissão, métodos de diagnóstico e os cuidados necessários para prevenir sua disseminação, conforme determinado pelo manual terrestre da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

Vírus	Sinônimo	Família	Gênero	Genoma		Hospedeiro natural	Doença	Transmissão	Método diagnóstico	Prevenção
				Tipo	Tamanho (kbp)					
EIAV	<i>Equine infectious anemia virus</i>	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	ssRNA +	8.2	<i>Equus caballus</i> <i>Equus asinus</i>	Doença aguda e crônica	Inoculação de sangue contaminado por meio de vetores artrópodes e fômites	IDGA, ELISA e IB*	Aplicação de medidas eficazes de biossegurança e controle do vetor
EAV	<i>Alphaarterivirus equid</i>	<i>Arteriviridae</i>	<i>Alphaartevirus</i>	ssRNA +	~12.7	<i>Equus caballus</i> <i>Equus asinus</i>	Desordens respiratórias e reprodutivas	Via respiratória e venérea	IV, RT-PCR, RT-qPCR, imunohistoquímica, ou testes sorológicos (ELISA, PRNT)	Aplicação de medidas eficazes de biossegurança e vacinação
NPHV	<i>Nonprimate hepacivirus or Equine hepacivirus</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	ssRNA +	9.5	<i>Equus caballus</i>	Hepatite subclínica	Transfusão de hemoderivados e possível transmissão vertical	Não padronizado	Testagem de hemoderivados antes de transfusão
WNV	<i>West Nile virus</i>					Aves aquáticas e passeriformes	Doença neurológica e possível morte			Controle dos vetores e vacinação (disponível para cavalos)
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	ssRNA +	~11.0	Aves	Sinais neurológicos leves ou graves. Morte raramente ocorre.	Picada de <i>Culex</i> spp.	PRNT, PCR e/ou ELISA-IgM	Controle dos vetores
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>					Porcos e aves aquáticas	Doença neurológica e possível morte			Controle dos vetores e vacinação (disponível para cavalos, suínos e humanos)
IV	<i>Influenza virus</i>	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenza</i>	ssRNA -	~13.3**	<i>Equus caballus</i> <i>Equus asinus</i>	Doenças respiratórias	Via respiratória e fômites contaminados	Diagnóstico clínico, IV, detecção do antígeno de influenza A, inibição da hemaglutinação e qPCR	Aplicação de medidas eficazes de biossegurança e vacinação

AGID: Imunodifusão em gel de agar; ELISA: Ensaio de imun absorção enzimática; IB: Teste western immunoblotting; IV: Isolamento viral; PCR: Reação em cadeia de polimerase; RT-PCR: Transcrição reversa – PCR; RT-qPCR: Tempo-real RT-PCR; qPCR: PCR quantitativa em tempo-real; PRNT: Teste de neutralização de redução de placa.

* Teste confirmatório, porém não disponível comercialmente.

** EIV virion consiste em oito segmentos de RNA de fita simples de sentido negativo variando de 866 a 2314pb.

Fonte: (Go *et al.*, 2014; OIE, 2019b; Cook *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2018; Balasuriya *et al.*, 2018; Angenvoort *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2018; A.M. King *et al.*, 2011)

1.9. Demais doenças virais que acometem os equídeos

Atualmente, existem várias doenças que afetam membros da família *Equidae* em todo o mundo consideradas de notificação compulsória pela OIE; no entanto, apenas onze são causados por vírus, e estas incluem a anemia infecciosa equina, a encefalomielite equina causada por flavivírus ou alfavírus, a influenza equina, infecção com EHV-1 e *Alphaarterivirus equid*, bem como a doença equina africana e a raiva (OIE, 2020). Embora vários estudos tenham demonstrado que asininos e muares, assim como cavalos também são afetados por essas doenças, quase todos os estudos experimentais, incluindo levantamentos epidemiológicos, são realizados em cavalos, e há pouca informação sobre a patogênese dessas doenças em asininos e muares.

1.10. Raiva

A raiva é uma doença zoonótica causada pelo *Rabies virus* (RABV), um *Lyssavirus* altamente neurotrópico, que pertence à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, cujo principal mecanismo de transmissão é através da mordida de animais carnívoros infectados (cães, chacais, hienas e raposas) ou de morcegos hematófagos (Evans and Crane, 2018).

Os equídeos são os animais mais suscetíveis ao RABV (Johnson *et al.*, 2006) e os primeiros sinais clínicos aparecem normalmente entre 2 a 9 semanas pós infecção e são inicialmente caracterizados por febre, claudicações leves e cólicas. Todavia, com a replicação ativa do vírus, os equídeos quando infectados podem desenvolver três formas distintas da raiva, a forma muda caracterizada por tremores musculares, salivação excessiva, ataxias e depressão (Green, 1997), a forma paralítica com paralisia ascendente, perda do tônus do esfíncter anal e da cauda (Hemachudha *et al.*, 1989) e a forma furiosa, caracterizada por hidrofobia, fotofobia, hipersensibilidade ao toque, dificuldade de deglutir, agressividade e automutilação (Hudson *et al.*, 1996). Em mulas e jumentos, sinais clínicos como vocalização anormal, hiperrestesia, cólica, auto-mordidas, tendência a morder outros animais, inquietação e salivação excessiva, são comumente encontrados, seguindo de cauda flácida, fimose, completo decúbito e óbito (Numan *et al.*, 2011).

Apesar de já existirem trabalhos demonstrando que principalmente os jumentos, de serviços, são uma importante fonte de transmissão do RABV para seres humanos, devido aos recorrentes acidentes envolvendo a mordida desses animais que provocam feridas profundas

com grande perda de tecido, principalmente em crianças (Droussi *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2016; Sheth *et al.*, 1992), o relato da ocorrência de raiva, em asininos, ainda é limitada a casos isolados no Canadá, na China e em alguns países da África e do Oriente Médio (Badiali and Ferris, 1966; Fekadu, 1982; Kariuki and Ngulo, 1985; Numan *et al.*, 2011; Tabel *et al.*, 1974).

1.11. Encefalites causadas por alfavírus

O *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV) e o *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) são vírus de RNA de fita simples e de sentido positivo que pertencem ao gênero *Alphavirus* na família *Togaviridae*, que causam doença neurológica em equídeos (cavalos, mulas, jumentos e zebras) e humanos (Stromberg *et al.*, 2020). O EEEV e o WEEV foram relatados em vários países nas Américas, enquanto o VEEV parece estar limitado às Américas do Sul e Central (Spickler, 2017; OIE, 2019a). Eles são transmitidos por mosquitos, como vetores biológicos. Passeriformes (EEEV e WEEV) e roedores (VEEV) são os principais hospedeiros reservatórios, com alta viremia para infectar vetores, enquanto equídeos e humanos são considerados hospedeiros sem saída, exceto para VEEV, onde equídeos são amplificadores eficientes do vírus e podem atuar como uma fonte de infecção para a transmissão do mosquito (Go *et al.*, 2014; Spickler, 2017).

Esses vírus afetam o sistema nervoso, de modo que os sinais clínicos podem ser idênticos para EEEV, VEEV e WEEV, com doença neurológica grave e frequentemente morte (Aleman *et al.*, 2018). A taxa de mortalidade de infecção por EEEV e VEEV pode chegar a até 90% na maioria dos casos equinos, enquanto WEEV é menos letal em cavalos, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% (Franklin *et al.*, 2002; The Center for Food Security & Public Health, 2009). Asininos e muares exibem suscetibilidade e sinais clínicos semelhantes aos cavalos (RANDALL and MILLS., 1944; Barrandeguy and Carossino, 2018). Em 1943, casos fatais de VEEV ocorreram entre cavalos, asininos e muares em Trinidad. Uma suspensão de tecido cerebral de jumento foi preparada e injetada intracerebral em cobaias, originando a virulenta estirpe *Trinidad Donkey*, a partir da qual foi desenvolvida a estirpe vacinal atenuada TC-83 (RANDALL and MILLS., 1944; Go *et al.*, 2014). A infecção por EEEV em asininos e mulas foi relatada no Brasil, com um caso fatal em um jumento no estado de Pernambuco (Silva *et al.*, 2011). Houve uma redução dramática nos casos de WEEV durante as últimas décadas, sem surtos entre equídeos relatados desde 1999 (OIE, 2019a). Mesmo para EEEV e VEEV, os relatos sobre asininos e muares são escassos. O descaso com essas espécies pode ter impactos

negativos, principalmente em relação ao VEEV, uma vez que também são amplificadores importantes do vírus. Por isso, os asininos e muares devem ser incluídos nos programas de vacinação. Isso é mais relevante em países como o Brasil, que possui uma das maiores populações de asininos selvagens do mundo (FAO, 2019).

1.11.1. Peste equina africana

A peste equina africana (PEA) é uma doença causada pelo *African horse sickness virus* (AHSV), um orbivirus pertencente à família *Reoviridae*, não-contagioso, transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides*. O AHSV tem uma predileção pelas células endoteliais vasculares, e os equídeos quando infectados podem desenvolver até quatro formas distintas da doença sendo: a forma cardíaca caracterizada principalmente por edemas, hemorragias ocular e na língua, a forma pulmonar onde o animal infectado apresenta dificuldade respiratória, dispneia, tosse e sudorese, a forma mista que ocorre uma combinação da forma cardíaca e pulmonar e a forma denominada febre doentia caracterizada por febre moderada e algum edema das fossas supra-orbitais (Geoffrey M. Thompson *et al.*, 2012). Embora o risco de mortalidade em equídeos acometidos possa chegar a 95% (Meiswinkel and Paweska 2003; Zientara *et al.* 2015), infecções experimentais realizadas em jumentos africanos, demonstraram a presença de poucas e leves lesões histopatológicas caracterizadas por acúmulo de líquidos na cavidade peritoneal, hemorragias petéquias e equimóticas no ligamento hepático esquerdo. Devido a isso, é aceito que na natureza, os jumentos e mulas são resistentes e a maioria desses animais quando acometidos, se tornam portadores assintomáticos da doença (Mellor *et al.*, 1998).

Atualmente a PEA é uma doença restrita a África subsaariana e dados epidemiológicos de Zimbabuê e da Etiópia, ambos países africanos, apontam uma prevalência variando de 59,3% a 75% em asininos, bem como de 55,5% em muares (Gordon *et al.*, 2017; Muluaem Teshome, 2012). Embora limitado ao norte da África e a países do Oriente Médio, eventos epizoóticos acometeram na Espanha, em 1987, após a importação de várias zebras infectadas e sem sinais clínicos aparentes. Todavia, em 1988 a doença reemergiu no país e levou a óbito cerca de 13.000 equídeos (Mellor and Hamblin, 2004; Rodriguez *et al.*, 1992) e os estudos indicaram que a reemergência viral na Espanha ocorreu devido à resistência clínica de mulas e jumentos que por não desenvolverem sinais clínicos, não foram diagnosticados e mantiveram a circulação silenciosa do vírus na região (Rodriguez *et al.*, 1992).

Embora a presença de infecções causadas pelo RABV, SLEV e AHV sejam consideradas de notificação compulsória, a baixa importância econômica dos asininos e muares, quando comparados aos equinos, tornam os estudos acerca da patogenia das doenças que acometem a família *Equidae*, cada vez mais escassos para essas espécies e, conseqüentemente, a população mundial de 50,4 milhões de jumentos e 8,5 milhões de mulas constitui um risco significativo, atuando como reservatório para a manutenção e transmissão de importantes vírus. Considerando a sua fisiologia única e sua resistência natural frente ao desenvolvimento de sinais clínicos quando acometidos por algumas enfermidades, seria importante que os asininos e muares tivessem o mesmo foco de interesse quando o assunto fosse doenças infecciosas, visto que são abundantes em número e tem uma convivência próxima com os cavalos em várias regiões do mundo.

1.12. Conclusão

A maioria das doenças virais que afetam a família *Equidae* são consideradas de notificação obrigatória pela OIE (OIE, 2020). Na ausência de uma vacina eficaz, o controle de uma doença infecciosa depende da quebra do ciclo de transmissão por meio do uso de métodos diagnósticos altamente sensíveis e específicos, capazes de detectar animais positivos, seguida da segregação deles do restante do rebanho, e relatórios às autoridades estaduais e / ou governamentais.

Asininos e mulas são suscetíveis à infecção por vírus como EIAV, *Alphaarterivirus equid*, NPHV, HVEs, WNV, SLEV, JEV, EIV, RABV, EEEV, WEEV, VEEV e AHSV. Porém, em muitos casos, quando infectados, apresentam resistência / baixa susceptibilidade ao desenvolvimento de sinais clínicos. Nessa situação, animais infectados dificilmente são identificados e permanecem por longos períodos como possíveis fontes de infecção para cavalos e outras espécies, inclusive humanos. Além disso, no que diz respeito à “resistência” natural de asininos e muares ligada à sua crescente desvalorização, há um significativo déficit de estudos relacionados à epidemiologia e patogênese das doenças infecciosas virais nesses animais. Como resultado, o controle de doenças infecciosas em asininos e mulas fica mais frequentemente comprometido. Seria importante o financiamento de estudos robustos de doenças infecciosas em asininos e muares, com o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para eles, quando necessário, e que a OIE e agências regionais em países onde

jumentos e mulas são abundantes adotem medidas preventivas contra a disseminação viral nessas populações.

1.13. Referências

- Abdelgawad, A., Hermes, R., Damiani, A., Lamglait, B., Czirják, G.Á., East, M., Aschenborn, O., Wenker, C., Kasem, S., Osterrieder, N., Greenwood, A.D. (2015) Comprehensive Serology Based on a Peptide ELISA to Assess the Prevalence of Closely Related Equine Herpesviruses in Zoo and Wild Animals.
- Alberghina, D., Fazio, F., Arfuso, F., Scianò, S., Zumbo, A., Piccione, G. (2013) Reference intervals of serum protein concentrations from clinically healthy female Ragusana Donkeys (*Equus asinus*) determined by cellulose acetate electrophoresis. *Journal of Equine Veterinary Science*. **33**(6), 433–436.
- Aleman, M., Nout-Lomas, Y.S., Reed, S.M. (2018) Disorders of the Neurologic System. In S. M. Reed, W. M. Bayly, & D. C. Sellon, eds. *EQUINE INTERNAL MEDICINE*. St. Louis, Missouri: Elsevier, pp. 580–708.
- Ali, S., Mohammadi, G. (2016) Detection of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 in mules and donkeys by real time PCR. *Veterinary Practitioner*. **17**(2), 160–163.
- Allen, G.P., Kydd, J.H., Slater, J.D., Smith, K.C. (2004) *Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections*. 2nd ed. Cape Town, South Africa: Oxford Press.
- 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. (2006) Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **58**(2), 141–148.
- Alonso-Padilla, J., Loza-Rubio, E., Escribano-Romero, E., Córdoba, L., Cuevas, S., Mejía, F., Calderón, R., Milián, F., Travassos da Rosa, A., Weaver, S.C., Estrada-Franco, J.G., Saiz, J.C. (2009) The continuous spread of West Nile virus (WNV): Seroprevalence in asymptomatic horses. *Epidemiology & Infection*. **137**(8), 1163–1168.
- Angenvoort, J., Brault, A.C., Bowen, R.A., Groschup, M.H. (2013) West Nile viral infection of equids. *Veterinary Microbiology*. **167**, 168–180.
- Ataseven, V.S., Dağalp, S.B., Güzel, M., Başaran, Z., Tan, M.T., Geraghty, B. (2009) Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Research in Veterinary Science*. **86**(2), 339–344.
- Azmi, K., Tirosh-Levy, S., Manasrah, M., Mizrahi, R., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Ereqat, S., Abdeen, Z., Lustig, Y., Gelman, B., Schwartz, G., Steinman, A. (2017) West Nile Virus: Seroprevalence in Animals in Palestine and Israel. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. **17**(8), 558–566.
- Baba, S.S., NNnadi, O.D., Hamman, K.D., Saidu, A., El-Yuguda, A., Oderinde, B.S. (2014) Preliminary Study on the Prevalence of West Nile Virus Antibody among Horses, Donkeys and Camels in Borno State, Nigeria. *Journal of Applied Virology*. **3**(2), 39–45.

- Back, H., Kendall, A., Grandón, R., Ullman, K., Treiberg-Berndtsson, L., Ståhl, K., Pringle, J. (2012) Equine multinodular pulmonary fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: a case report. *Acta veterinaria Scandinavica*. **54**(1), 57.
- Badiali, L., Ferris, D.H. (1966) A preliminary report on rabies in suspected equine encephalomyelitis cases in the United Arab Republic. *Bulletin of the World Health Organization*. **34**(5), 797–798.
- Balasuriya, U.B.R., Carossino, M., Timoney, P.J. (2018) Equine viral arteritis: A respiratory and reproductive disease of significant economic importance to the equine industry. *Equine Veterinary Education*. **30**(9), 497–512.
- Balasuriya, U.B.R., Go, Y.Y., MacLachlan, N.J. (2013) Equine arteritis virus. *Veterinary Microbiology*. **167**(1–2), 93–122.
- Balasuriya, U.B.R., Snijder, E.J., Van Dinten, L.C., Heidner, H.W., Wilson, W.D., Hedges, J.F., Hullinger, P.J., MacLachlan, N.J. (1999) Equine arteritis virus derived from an infectious cDNA clone is attenuated and genetically stable in infected stallions. *Virology*. **260**(1), 201–208.
- Barba, M., Fairbanks, E.L., Daly, J.M. (2019) Equine viral encephalitis: prevalence, impact, and management strategies. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. **10**, 99–110.
- Bargaoui, R., Lecollinet, S., Lancelot, R. (2013) Mapping the Serological Prevalence Rate of West Nile fever in Equids, Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases*. **62**(1), 55–66.
- Barrandeguy, M.E., Carossino, M. (2018) Infectious Diseases in Donkeys and Mules: An Overview and Update. *Journal of Equine Veterinary Science*. **65**, 98–105.
- Bell, S.A., Pusterla, N., Balasuriya, U.B.R., Mapes, S.M., Nyberg, N.L., MacLachlan, N.J. (2008) Isolation of a gammaherpesvirus similar to asinine herpesvirus-2 (AHV-2) from a mule and a survey of mules and donkeys for AHV-2 infection by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. **130**(1–2), 176–183.
- Bolfa, P., Jeon, I., Loftis, A., Leslie, T., Marchi, S., Sithole, F., Beck, C., Lecollinet, S., Zientara, S., Hans, A., Issel, C.J. (2017) Detection of West Nile Virus and other common equine viruses in three locations from the Leeward Islands, West Indies. *Acta Tropica*. **174**, 24–28.
- Bolfa, P., Nolf, M., Cadoré, J.L., Catoi, C., Archer, F., Dolmazon, C., Mornex, J.F., Leroux, C. (2013) Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Veterinary Research*. **44**(1).
- Borges, A.M.C.M., Silva, L.G., Nogueira, M.F., Oliveira, A.C.S., Segri, N.J., Ferreira, F., Witter, R., Aguiar, D.M. (2013) Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in Veterinary Science*. **95**(1), 76–81.
- Brasil (2014) Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de anemia infecciosa equina. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária*. (1), 136.
- Brazil (2004) Portaria nº 378, de 17 de dezembro de 2014. In *Diário Oficial da União*.

- Browning, G.F., Ficorilli, N., Studdert, M.J. (1988) Asinine herpesvirus genomes: comparison with those of the equine herpesviruses. *Archives of Virology*. **101**(3–4), 183–190.
- Bueno, B.L., Câmara, R.J.F., Moreira, M.V.L., Galinari, G.C.F., Souto, F.M., Victor, R.M., Bicalho, J.M., Ecco, R., dos Reis, J.K.P. (2020) Molecular detection, histopathological analysis, and immunohistochemical characterization of equine infectious anemia virus in naturally infected equids. *Archives of Virology*.
- Burbelo, Peter.D., Dubovi, Edward.J., Simmonds, P., Medina, J.L., Henriquez, J.A., Mishra, N., Wagner, J., Tokarz, R., Cullen, J.M., Iadarola, M.J., Rice, C.M., Ian Lipkin, W., Kapoor, A. (2012) Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *Journal of Virology*. **86**(11), 6171–6178.
- Burden, F., Thiemann, A. (2015) Donkeys are different. *Journal of Equine Veterinary Science*. **35**(5), 376–382.
- Burgueño, A., Spinsanti, L., Díaz, L.A., Rivarola, M.E., Arbiza, J., Contigiani, M., Delfraro, A. (2013) Seroprevalence of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus (Flavivirus, Flaviviridae) in horses, Uruguay. *BioMed Research International*. **2013**.
- Camillo, F., Rota, A., Biagini, L., Tesi, M., Fanelli, D., Panzani, D. (2018) The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. *Journal of Equine Veterinary Science*. **65**, 44–49.
- Campbell, G.L., Hills, S.L., Fischer, M., Jacobson, J.A., Hoke, C.H., Hombach, J.M., Marfin, A.A., Solomon, T., Tsai, T.F., Tsu, V.D., Ginsburg, A.S. (2011) Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*. **89**(10), 766–774.
- Carrera, J.-P., Bagamian, K.H., Rosa, A.P.Travassos., Wang, E., Beltran, D., Gundaker, N.D., Armien, B., Arroyo, G., Sosa, N., Pascale, J.M., Valderrama, A., Tesh, R.B., Vittor, A.Y., Weaver, S.C. (2018) Human and equine infection with alphaviruses and flaviviruses in Panamá during 2010: A cross-Sectional study of household contacts during an encephalitis outbreak. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **98**(6), 1798–1804.
- CDC: Center for Disease Control and Prevention (2019) Rabies. *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of High-Consequence Pathogens and Phatology*.
- CDC: Center for Disease Control and Prevention (2020) Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). [online]. Available from: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/> [Accessed November 8, 2020].
- Chakravarti, S.K., Sardana, D.N., Mukherjee, K.K., Mitra, A.C., Chakrabarty, M.S. (1981) Serological evidence of infection with Japanese encephalitis virus in mules of eastern Himalayan region. *Indian Journal of Medical Research*. **73**(1), 4–7.
- Chenchev, I., Rusenova, N., Sandev, N. (2011) Seroepidemiological Studies Of Donkeys' Blood For Detection Of Some Virus Infections On Ungulates. *Trakia Journal of Sciences*. **9**, 82–86.
- Cook, R.F., Barrandeguy, M., Lee, P. -Y. A., Tsai, C. -F., Shen, Y. -H., Tsai, Y. -L., Chang, H. -F. G., Wang, H. -T. T., Balasuriya, U.B.R. (2018) Rapid detection of equine infectious

anaemia virus nucleic acid by insulated isothermal RT-PCR assay to aid diagnosis under field conditions. *Equine Veterinary Journal*. **51**(4), 489–494.

Cook, R.F., Cook, S.J., Berger, S.L., Leroux, C., Ghabrial, N.N., Gantz, M., Bolin, P.S., Mousel, M.R., Montelaro, R.C., Issel, C.J. (2003) Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virology*. **313**(2), 588–603.

Cook, R.F., Leroux, C., Issel, C.J. (2013) Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Veterinary Microbiology*. **167**(1–2), 181–204.

Cook, S.J., Cook, R.F., Montelaro, R.C., Issel, C.J. (2001) Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Veterinary Microbiology*. **79**(2), 93–109.

Cook, S.J., Li, G., Zheng, Y., Willand, Z.A., Issel, C.J., Cook, R.F. (2020) 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*. **85**, 102852.

Costa, G.B., Marinho, P.E.S., Vilela, A.P.P., Saraiva-Silva, A.T., Crispim, A.P.C., Borges, I.A., Dutra, A.G.S., Lobato, Z.I.P., Reis, J.K.P. Dos, De Oliveira, D.B., Drumond, B.P., Kroon, E.G., Trindade, G.D.S. (2019) Silent circulation of the saint louis encephalitis virus among humans and equids, Southeast Brazil. *Viruses*. **11**(11), 1–10.

Cullinane, A., Newton, J.R. (2013) Equine influenza-A global perspective. *Veterinary Microbiology*. **167**(1–2), 205–214.

Cullinane, A., Quinlivan, M., Nelly, M., Patterson, H., Kenna, R., Garvey, M., Gildea, S., Lyons, P., Flynn, M., Galvin, P., Neylon, M., Jankowska, K. (2007) Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Veterinary Record*. **161**(19), 647–652.

Williams, D.L., Issel, C.J., Steelman, C.D., Adams Jr, W.V., Benton, C.V. (1981) 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*. **42**, 1469–1473.

Davoust, B., Maquart, M., Roqueplo, C., Gravier, P., Sambou, M., Mediannikov, O., Leparc-Goffart, I. (2016) Serological Survey of West Nile Virus in Domestic Animals from Northwest Senegal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. **16**(5), 359–361.

Dong, J.B., Zhu, W., Cook, F.R., Goto, Y., Horii, Y., Haga, T. (2012) Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Archives of Virology*. **157**(11), 2105–2111.

Droussi, H., Amrani, D. El, Dlimi, M., Elatiqi, K., Boukind, S., Exadaktylos, A.K., Weiner, S., Ettalbi, S. (2014) Domestic donkey (*Equus africanus asinus*) bites: An unusual aetiology of severe scalp injuries in Morocco. *African Journal of Emergency Medicine*. **4**(4), e5–e8.

Dunkel, B. (2018) Disorders of the Hematopoietic System. In S. M. Reed, W. M. Bayly, & D. C. Sellon, eds. *Equine Internal Medicine*. St. Louis, Missouri: Elsevier, pp. 991–1028.

- Elia, G., Lanave, G., Lorusso, E., Parisi, A., Cavaliere, N., Patruno, G., Terregino, C., Decaro, N., Martella, V., Buonavoglia, C. (2017) Identification and genetic characterization of equine hepaciviruses in Italy. *Veterinary Microbiology*. **207**, 239–247.
- Evans, L., Crane, M. eds. (2018) *The Clinical Companion Of The Donkey*. 1st ed. The Donkey Sanctuary.
- FAO: Food and Agriculture Organizations of the United Nations (2019) FAOSTAT. *Live Animals*. [online]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> [Accessed May 11, 2020].
- Fekadu, M. (1982) Rabies in Ethiopia. *American Journal of Epidemiology*. **115**(2), 266–273.
- Feng, Y., Shi, Y., Yu, M., Xu, W., Gong, W., Tu, Z., Ding, L., He, B., Guo, H., Tu, C. (2016) Livestock rabies outbreaks in Shanxi province, China. *Archives of Virology*. **161**(10), 2851–2854.
- Ferguson, L., Olivier, A.K., Genova, S., Epperson, W.B., Smith, D.R., Schneider, L., Barton, K., McCuan, K., Webby, R.J., Wan, X.-F. (2016) Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle. *Journal of Virology*. **90**(12), 5636–5642.
- Figueiredo, A.S., Lampe, E., Espírito-Santo, M.P., Mello, F.C. do A., Almeida, F.Q., Lemos, E.R.S., Godoi, T.L.O.S., Dimache, L.A.G., Santos, D.R.L., Villar, L.M. (2015) Identification of two phylogenetic lineages of equine hepacivirus and high prevalence in Brazil. *Veterinary Journal*. **206**(3), 414–416.
- Fortier, G., van Erck, E., Pronost, S., Lekeux, P., Thiry, E. (2010) Equine gammaherpesviruses: Pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *Veterinary Journal*. **186**(2), 148–156.
- Franklin, R.P., Kinde, H., Jay Laura D Kramer, M.T., Green, E.G.N., Chiles, R.E., Ostlund, E., Husted, S., Smith, J., Parker, M.D. (2002) Eastern equine encephalomyelitis virus infection in a horse from California. *Emerging Infectious Diseases*. **8**(3), 283–288.
- Fukushi, H., Yamaguchi, T., Yamada, S. (2012) Complete Genome Sequence of Equine Herpesvirus Type 9. *Journal of Virology*. **86**(24), 13822–13822.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Jaén-Téllez, J.A., Napp, S., Fernández-Morente, M., Arenas, A. (2012) Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection. *The Veterinary Journal*. **194**(2), 262–264.
- Garvey, M., Suárez, N.M., Kerr, K., Hector, R., Moloney-Quinn, L., Arkins, S., Davison, A.J., Cullinane, A. (2018) Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. *PLoS ONE*. **13**(2).
- Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., Lee, C. (2014) Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. **3**(1), 58–77.
- Gordon, S.J.G., Bolwell, C., Rogers, C.W., Musuka, G., Kelly, P., Guthrie, A., Mellor, P.S., Hamblin, C. (2017) The sero-prevalence and sero-incidence of African horse sickness and equine encephalosis in selected horse and donkey populations in Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. **84**(1), 1–5.

- Green, S.L. (1997) Rabies. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice.* **13**(1), 1–11.
- Gür, S., Gürçay, M., İrehan, B., Turan, T. (2018) Serological investigation of equine viral arteritis infection in donkeys and horses in the Eastern Anatolia Region. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* **7**(2), 186–191.
- Gür, S., İrehan, B., Gürçay, M., Turan, T. (2019) Serological investigation of equine viral arteritis in donkeys in eastern and south-eastern anatolia regions of Turkey. *Acta Veterinaria Brno.* **88**(4), 385–391.
- Guthrie, A.J., Howell, P.G., Hedges, J.F., Bosman, A.-M., Balasuriya, U.B.R., Mccollum, W.H., Timoney, P.J., Maclachlan, N.J. (2010) Lateral transmission of equine arteritis virus among Lipizzaner stallions in South Africa. *Equine Veterinary Journal.* **35**(6), 596–600.
- Hemachudha, T., Tirawatnpong, S., Phanthumchinda, K. (1989) Seizures as the initial manifestation of ocular paralytic rabies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* **52**(6), 808–810.
- Hudson, L.C., Weinstock, D., Jordan, T., Bold-Fletcher, N.O. (1996) Clinical presentation of experimentally induced rabies in horses. *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* **43**(5), 277–285.
- HVRI: Harbin Veterinary Research Institute (2015) At HVRI - Harbin Veterinary Research Institute, CAAS. [online]. Available from: <http://www.hvri.ac.cn/en/aboutus/athvri/index.htm> [Accessed May 12, 2020].
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (2019) Genus: Hepacivirus - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [online]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/362/genus-hepacivirus [Accessed June 5, 2020].
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (2011) Herpesviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses. [online]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae [Accessed May 11, 2020].
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (2020) ICTV Taxonomy history: Alphaarterivirus equid. [online]. Available from: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201901827 [Accessed September 8, 2020].
- Issel, C.J., Coggins, L. (1979) Equine infectious anemia: current knowledge. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **174**(7), 727–733.
- Issel, C.J., Cook, R.F. (1993) A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* **5**(1), 137–41.
- Issel, C.J., Cook, R.F., Mealey, R.H., Horohov, D.W. (2014) Equine infectious anemia in 2014: Live with it or eradicate it? *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice.* **30**(3), 561–577.

- 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. (2013) Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record*. **172**(8), 210.
- Italy (2006) Ordinanza Ministeriale 14 novembre 2006. Disposizioni urgenti in materia di sorveglianza dell'anemia infettiva degli equidi. *Gazzetta Ufficiale*.
- Izume, S., Kirisawa, R., Ohya, K., Ohnuma, A., Kimura, T., Omatsu, T., Katayama, Y., Mizutani, T., Fukushi, H. (2017) The full genome sequences of 8 equine herpesvirus type 4 isolates from horses in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. **79**(1), 206–212.
- Johnson, N., Phillpotts, R., Fooks, A.R. (2006) Airborne transmission of lyssaviruses. *Journal of Medical Microbiology*. **55**(6), 785–790.
- Jónsson, H., Schubert, M., Seguin-Orlando, A., Ginolhac, A., Petersen, L., Fumagalli, M., Albrechtsen, A., Petersen, B., Korneliussen, T.S., Vilstrup, J.T., Lear, T., Myka, J.L., Lundquist, J., Miller, D.C., Alfarhan, A.H., Alquraishi, S.A., Al-Rasheid, K.A.S., Stagegaard, J., Strauss, G., Bertelsen, M.F., Sicheritz-Ponten, T., Antczak, D.F., Bailey, E., Nielsen, R., Willerslev, E., Orlando, L. (2014) Speciation with gene flow in equids despite extensive chromosomal plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**(52), 18655–18660.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J.A., Firth, C., Hirschberg, D.L., Rice, C.M., Shields, S., Lipkin, W.I. (2011) Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**(28), 11608–11613.
- Kapoor, S., Sharma, H., Singh, M., Ranjan, K., Patel, S.V., Kumar, P., Kumari, A., Khirbat, R. (2014) Equine Herpesviruses: a Brief Review Review Article.
- Kariuki, D.P., Ngulo, W.K. (1985) Epidemiology of Animal Rabies in Kenya (1900–1983). *Rabies in the Tropics*, 451–464.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B. (2011) *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B. eds. (2011) *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 1st ed. Elsevier.
- Kleiboeker, S.B., Schommer, S.K., Johnson, P.J., Ehlers, B., Turnquist, S.E., Boucher, M., Kreeger, J.M. (2002) Association of two newly recognized herpesviruses with interstitial pneumonia in donkeys (*Equus asinus*). *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* **14**(4), 273–80.
- Lafri, I., Prat, C.M., Bitam, I., Gravier, P., Besbaci, M., Zeroual, F., Ben-Mahdi, M.H., Davoust, B., Leparç-Goffart, I. (2017) Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **50**, 8–12.
- Landolt, G.A., Olsen, C.W. (2007) Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*.

- Lara, M. do C.C. de S.H., Torelli, C.S., Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Cunha, M.S., Bello, A.C.P.P., Cunha, A.P., Reis, J.K.P., Leite, R.C., Mori, E. (2010) Serological survey of equine herpesvirus infection in Minas Gerais state. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **47**(5), 352–356.
- Lara, M.C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Oliveira, J.V. De, Nassar, A.F. de C., Silva, L.M.P., Okuda, L.H., Romaldini, A.H. de C.N., Cunha, M.S., Marques, E.C., Mori, E. (2017) Occurrence of viral diseases in donkeys (*Equus asinus*) in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **54**(2), 154.
- Lecollinet, S., Pronost, S., Couplier, M., Beck, C., Gonzalez, G., Leblond, A., Tritz, P. (2020) Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe? *Viruses*. **12**(1).
- Leroux, C., Cador, J.-L., Montelaro, R.C. (2004) Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary Research*. **35**(4), 485–512.
- Lin, Y.Z., Shen, R.X., Zhu, Z.Y., Deng, X.L., Cao, X.Z., Wang, X.F., Ma, J., Jiang, C.G., Zhao, L.P., Lv, X.L., Shao, Y.M., Zhou, J.H. (2011) An attenuated EIAV vaccine strain induces significantly different immune responses from its pathogenic parental strain although with similar in vivo replication pattern. *Antiviral Research*. **92**(2), 292–304.
- Lu, G., Sun, L., Xu, T., He, D., Wang, Z., Ou, S., Jia, K., Yuan, L., Li, S. (2016) First description of hepacivirus and pegivirus infection in domestic Horses in China: A study in guangdong province, heilongjiang province and Hong Kong district. *PLoS ONE*. **11**(5), 1–12.
- Lyons, S., Kapoor, A., Sharp, C., Schneider, B.S., Wolfe, N.D., Culshaw, G., Corcoran, B., McGorum, B.C., Simmonds, P. (2012) Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*. **18**(12), 1976–1982.
- M. Getachew, F. Alemayehu, C. Chala, B. Amare, D. Kassa, F. Burden, R.W. and U.W. (2014) A cross-sectional sero-survey of some infectious diseases of working equids in Central Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. **6**(9), 231–238.
- van Maanen, C., Cullinane, A. (2002) Equine influenza virus infections: An update. *Veterinary Quarterly*. **24**(2), 79–94.
- Maresca, C., Scoccia, E., Faccenda, L., Zema, J., Costarelli, S. (2012) Equine Infectious Anemia: Active Surveillance in Central Italy 2007-2009. *Journal of Equine Veterinary Science*. **32**(9), 596–598.
- Matthews, N., van Loon, J.P.A.M. (2013) Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. *Equine Veterinary Education*. **25**(1), 47–51.
- Matthews, N.S., Taylor, T.S., Hartsfield, S.M. (2010) Anaesthesia of donkeys and mules. *Equine Veterinary Education*. **15**(S7), 102–107.
- McCullum, W.H., Prickett, M.E., Bryans, J.T. (1971) Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Research in Veterinary Science*. **12**(5), 459–464.
- McCullum, W.H., Timoney, P.J., Tengelsen, L.A. (1995) Clinical, virological and serological responses of donkeys to intranasal inoculation with the KY-84 strain of equine arteritis virus. *Journal of Comparative Pathology*. **112**(2), 207–211.

- Mehmet, K., Sibel, G., Orhan, Y., Nuri, M., Sibel, Y., Sibel, H., Oya, B., Metin, G. (2017) Serological investigation of West Nile Virus infection in domestic horses and donkeys in Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*. **37**(1), 51–54.
- Meiswinkel, R., Paweska, J.T. (2003) Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. *Preventive Veterinary Medicine*. **60**(3), 243–253.
- Mekonnen, A., Eshetu, A., Gizaw, D. (2017) Equine herpesvirus 1 and/or 4 in working equids: seroprevalence and risk factors in North Shewa Zone, Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*. **21**(2), 28.
- Mellor, P.S., Baylis, M., Hamblin, C. (1998) *African Horse Sickness*. 1st ed. P. P. p. C. Mertens, ed. Colorado, USA: Springer Wien New York.
- Mellor, P.S., Hamblin, C. (2004) African horse sickness. *Veterinary Research*.
- Mendoza, F.J., Perez-Ecija, R.A., Toribio, R.E., Estepa, J.C. (2013) Thyroid hormone concentrations differ between donkeys and horses. *Equine Veterinary Journal*. **45**(2), 214–218.
- Mendoza, F.J., Toribio, R.E., Perez-Ecija, A. (2018) Donkey Internal Medicine—Part II: Cardiovascular, Respiratory, Neurologic, Urinary, Ophthalmic, Dermatology, and Musculoskeletal Disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*. **65**, 86–97.
- Meng, Q., Lin, Y., Ma, J., Ma, Y., Zhao, L., Li, S., Liang, H., Zhou, J., Shen, R., Zhang, X., Shao, Y. (2011) A pilot study on an attenuated Chinese EIAV vaccine inducing broadly neutralizing antibodies. *Archives of Virology*. **156**(8), 1455–1462.
- Mori, E., Maria Do Carmo, C.S.H.L., Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Mori, C.M.C., Soares, R.M., Brandão, P.E., Fernandes, W.R., Richtzenhain, L.J. (2015) Molecular characterization of Brazilian equid herpesvirus type 1 strains based on neuropathogenicity markers. *Brazilian Journal of Microbiology*. **46**(2), 565–570.
- Mulualem Teshome, (2012) Seroprevalence and risk factors of African horse sickness in mules and donkeys in selected sites of West Amhara Region, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*. **6**(19).
- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J., Zeller, H. (2001) West Nile Outbreak in Horses in Southern France, 2000: The Return after 35 Years. *Emerging Infectious Diseases*. **7**(4), 692–696.
- Negussie, H., Gizaw, D., Tessema, T.S., Nauwynck, H.J. (2017) Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy, an Emerging Threat of Working Equids in Ethiopia. *Transboundary and Emerging Diseases*. **64**(2), 389–397.
- Numan, M., Qureshi, Z.A., Shauket, M., Hashmi, H.A., Iqbal, M., Gill, Z.J., Habib, M., Siddique, M. (2011) Rabies out-break in mules at Mansehra, Pakistan. *Research in Veterinary Science*. **90**(1), 160–162.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2019) Terrestrial Animal Health Code. [online]. Available from: https://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_diagnostic_tests.htm [Accessed November 8, 2020].

- OIE, W.A.H.I.S. (2018) Equine Viral Arteritis (Infection with Equine Arteritis Virus). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. pp. 1334–1349.
- OIE, W.A.H.I.S. (2020) OIE-Listed diseases 2020: OIE - World Organisation for Animal Health. [online]. Available from: <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/> [Accessed September 29, 2020].
- 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. (2017) Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. **140**, 30–37.
- Ometto, T., Durigon, E.L., de Araujo, J., Aprelon, R., Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Melo, R.M., Levi, J.E., de Azevedo Júnior, S.M., Petry, M.V., Neto, I.S., Serafini, P., Villalobos, E., Cunha, E.M.S., Lara, M. do C.C.S.H., Nava, A.F.D., Nardi, M.S., Hurtado, R., Rodrigues, R., Sherer, A.L., de Fátima Martins Sherer, J., Geraldi, M.P., de Seixas, M.M.M., Peterka, C., de Souza Bandeira, D., Pradel, J., Vachieri, N., Labruna, M.B., de Camargo, L.M.A., Lanciotti, R., Lefrançois, T. (2013) West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **107**(11), 723–730.
- Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., Stiller, M., Schubert, M., Cappellini, E., Petersen, B., Moltke, I., Johnson, P.L.F., Fumagalli, M., Vilstrup, J.T., Raghavan, M., Korneliussen, T., Malaspina, A.S., Vogt, J., Szklarczyk, D., Kelstrup, C.D., Vinther, J., Dolocan, A., Stenderup, J., Velazquez, A.M.V., Cahill, J., Rasmussen, M., Wang, X., Min, J., Zazula, G.D., Seguin-Orlando, A., Mortensen, C., Magnussen, K., Thompson, J.F., Weinstock, J., Gregersen, K., Røed, K.H., Eisenmann, V., Rubin, C.J., Miller, D.C., Antczak, D.F., Bertelsen, M.F., Brunak, S., Al-Rasheid, K.A.S., Ryder, O., Andersson, L., Mundy, J., Krogh, A., Gilbert, M.T.P., Kjær, K., Sicheritz-Ponten, T., Jensen, L.J., Olsen, J. V., Hofreiter, M., Nielsen, R., Shapiro, B., Wang, J., Willerslev, E. (2013) Recalibrating equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*. **499**(7456), 74–78.
- Oxburgh, L., Berg, M., Klingeborn, B., Emmoth, E., Linné, T. (1994) Evolution of H3N8 equine influenza virus from 1963 to 1991. *Virus Research*. **34**(2), 153–165.
- Patel, J.R., Heldens, J. (2005) Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) - Epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Veterinary Journal*. **170**(1), 14–23.
- Pauvolid-Corrêa, A., Campos, Z., Juliano, R., Velez, J., Nogueira, R.M.R., Komar, N. (2014) Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **8**(2).
- Paweska, J.T., Binns, M.M., Woods, P.S.A., Chirnside, E.D. (1997) A survey for antibodies to equine arteritis virus in donkeys, mules and zebra using virus neutralisation (VN) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Equine Veterinary Journal*. **29**(1), 40–43.
- Pfaender, S., Cavalleri, J.M.V., Walter, S., Doerrbecker, J., Campana, B., Brown, R.J.P., Burbelo, P.D., Postel, A., Hahn, K., Anggakusuma, Riebesehl, N., Baumgärtner, W., Becher, P., Heim, M.H., Pietschmann, T., Feige, K., Steinmann, E. (2015) Clinical course of infection and viral tissue tropism of Hepatitis C Virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. *Hepatology*. **61**(2), 447–459.

- Pfaender, S., Walter, S., Todt, D., Behrendt, P., Doerrbecker, J., Wölk, B., Engelmann, M., Gravemann, U., Seltsam, A., Steinmann, J., Burbelo, P.D., Klawonn, F., Feige, K., Pietschmann, T., Cavalleri, J.-M.V., Steinmann, E. (2015) Assessment of cross-species transmission of hepatitis C virus-related non-primate hepacivirus in a population of humans at high risk of exposure. *Journal of General Virology*. **96**, 2636–2642.
- Pica, N., Palese, P. (2013) Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Prospects and Challenges. *Annual Review of Medicine*. **64**(1), 189–202.
- Pradel, J., Monfray, K.C., Molia, S., Vachiéry, N., Rousteau, A., Imbert, D., Martinez, D., Sabatier, P., Lefrançois, T. (2009) Risk factors for West Nile virus seropositivity of equids in Guadeloupe. *Preventive Veterinary Medicine*. **92**, 71–78.
- Pusterla, N., Hussey, G.S. (2014) Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. **30**(3), 489–506.
- Pusterla, N., Mapes, S., Akana, N., Barnett, C., Mackenzie, C., Gaughan, E., Craig, B., Chappell, D., Vaala, W. (2016) Prevalence factors associated with equine herpesvirus type 1 infection in equids with upper respiratory tract infection and/or acute onset of neurological signs from 2008 to 2014. *Veterinary Record*. **178**(3), 70.
- Qi, T., Guo, W., Huang, W., Dai, L., Zhao, L., Li, H., Li, X., Zhang, X., Wang, Y., Yan, Y., He, N., Xiang, W. (2010) Isolation and genetic characterization of H3N8 equine influenza virus from donkeys in China. *Veterinary Microbiology*. **144**(3–4), 455–460.
- Romo-Sáenz, C. I., Tamez-Guerra, P., Olivas-Holguin, A., Ramos-Zayas, Y., Obregón-Macías, N., González-Ochoa, G., ... & Gomez-Flores, R. (2021). Molecular detection of equine infectious anemia virus in clinically normal, seronegative horses in an endemic area of Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10406387211006195.
- RANDALL, R., MILLS., J.W. (1944) Fatal Encephalitis in Man due to the Venezuelan Virus of Equine Encephalomyelitis in Trinidad. [online]. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19441000327> [Accessed September 8, 2020].
- Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C. eds. (2018) *Equine Internal Medicine*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Ribeiro, D.B., Silva, J.S., Moraes, L.A., Ribeiro, A.S.S., Assunção, P.W.L. (2014) Hepacivirus infection in domestic horses, Brazil, 2011–2013. *Emerging infectious diseases*. **20**(12), 2180–2182.
- Ricotti, S., Garcia, M.I., Veaute, C., Bailat, A., Lucca, E., Cook, R.F., Cook, S.J., Soutullo, A. (2016) Serologically silent, occult equine infectious anemia virus (EIAV) infections in horses. *Veterinary Microbiology*. **187**, 41–49.
- Rivas, J., Neira, V., Mena, J., Brito, B., Garcia, A., Gutierrez, C., Sandoval, D., Ortega, R. (2017) Identification of a divergent genotype of equine arteritis virus from South American donkeys. *Transboundary and Emerging Diseases*. **64**(6), 1655–1660.
- Rodriguez, M., Hooghuis, H., Castaño, M. (1992) African horse sickness in Spain. *Veterinary Microbiology*.
- Rose, M.A., Round, M.C., Beveridge, W.I. (1970) Influenza in horses and donkeys in Britain, 1969. *The Veterinary record*.

- Russell, K.E., Walker, K.M., Miller, R.T., Sellon, D.C. (1998) Hyperglobulinemia and lymphocyte subset changes in naturally infected, inapparent carriers of equine infectious anaemia virus. *American Journal of Veterinary Research*. **59**(8), 1009–1015.
- Salazar, P., Traub-Dargatz, J.L., Morley, P.S., Wilmot, D.D., Steffen, D.J., Cunningham, W.E., Salman, M.D. (2004) Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **225**(2), 267–274.
- Scheurer, L., Bachofen, C., Herteman, N., Hilbe, M., Wolfer, N., Schoster, A. (2020) A case series highlighting the role of different gamma-herpesviruses in Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis. *Zurich Open Repository and Archive*, 245–256.
- Schlottau, K., Fereidouni, S., Beer, M., Hoffmann, B. (2019) Molecular identification and characterization of nonprimate hepaciviruses in equines. *Archives of Virology*. **164**(2), 391–400.
- Scicluna, M.T., Issel, C.J., Cook, F.R., Manna, G., Cersini, A., Rosone, F., Frontoso, R., Caprioli, A., Antonetti, V., Autorino, G.L. (2013) Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology*. **165**(1–2), 123–134.
- Selim, A., Radwan, A., Arnaout, F., Khater, H. (2020) The Recent Update of the Situation of West Nile Fever among Equids in Egypt after Three Decades of Missing Information. *Pakistan Veterinary Journal*. **8318**.
- Sellon, D.C. (1993) Equine Infectious Anemia. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. **9**(2), 321–336.
- Shen, R.X., Xu, Z.D., HE YS, Z.S. (1979) Development of a EIAV donkey leucocyte attenuated vaccine. *China Agriculture Sciences*. **4**, 1–15.
- Sheth, S.S., Gharpure, V., Nair, K., Nadkarni, U.B., Deshmukh, C.T., Desai, A.P., Jain, M.K., Shah, M.D. (1992) Fatal rabies encephalomyelitis despite chick embryo vaccine prophylaxis. *Indian Pediatrics*. **29**(6), 766–769.
- Shortridge, K.E. (1995) Influenza, Hong Kong, and the China Traveler. *Journal of Travel Medicine*. **2**(4), 257–259.
- Sijmons, S., Vissani, A., Tordoya, M.S., Muylkens, B., Thiry, E., Maes, P., Matthijssens, J., Barrandeguy, M., Van Ransta, M. (2014) Complete genome sequence of equid herpesvirus 3. *Genome Announcements*. **2**(5).
- Silva, A.S.G., Matos, A.C.D., da Cunha, M.A.C.R., Rehfeld, I.S., Galinari, G.C.F., Marcelino, S.A.C., Saraiva, L.H.G., Martins, N.R. da S., Maranhão, R. de P.A., Lobato, Z.I.P., Pierezan, F., Guedes, M.I.M.C., Costa, E.A. (2019) West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transboundary and Emerging Diseases*. **66**, 445–453.
- Silva, M.L.C.R., Galiza, G.J.N., Dantas, A.F.M., Oliveira, R.N., Iamamoto, K., Achkar, S.M., Riet-Correa, F. (2011) Outbreaks of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **23**(3), 570–575.
- Singh, R.K., Dhama, K., Karthik, K., Khandia, R., Munjal, A., Khurana, S.K., Chakraborty, S., Malik, Y.S., Virmani, N., Singh, R., Tripathi, B.N., Munir, M., van der Kolk, J.H. (2018)

A comprehensive review on equine influenza virus: Etiology, epidemiology, pathobiology, advances in developing diagnostics, vaccines, and control strategies. *Frontiers in Microbiology*. **9**(SEP), 1–26.

Slater, J. (2014) Equine herpesviruses. In *Equine Infectious Diseases*. WB Saunders, pp. 151–168.

Spickler, A.R. (2017) Eastern, Western and Venezuelan Equine Encephalomyelitis. [online]. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php> [Accessed September 7, 2020].

Spyrou, V., Papanastassopoulou, M., Psychas, V., Billinis, C., Koumbati, M., Vlemmas, J., Koptopoulos, G. (2003) Equine infectious anemia in mules: Virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*. **95**(1–2), 49–59.

Stadejek, T., Mittelholzer, C., Oleksiewicz, M.B., Paweska, J., Belák, S. (2006) Highly diverse type of equine arteritis virus (EAV) from the semen of a South African donkey: Short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*. **54**(2), 263–270.

Stromberg, Z.R., Fischer, W., Bradfute, S.B., Kubicek-Sutherland, J.Z., Hraber, P. (2020) Vaccine advances against venezuelan, eastern, and western equine encephalitis viruses. *Vaccines*. **8**(2), 273.

Tabel, H., Corner, A.H., Webster, W.A., Casey, C.A. (1974) History and epizootiology of rabies in Canada. *Canad. Vet. J.*. **15**(10), 271–281.

Tang, Y.D., Na, L., Fu, L.H., Yang, F., Zhu, C.H., Tang, L., Li, Q., Wang, J.Y., Li, Z., Wang, X.F., Li, C.Y., Wang, X., Zhou, J.H. (2015) Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase 1 (ADAR1) promotes EIAV replication and infectivity. *Virology*. **476**, 364–371.

Tang, Y.D., Zhang, X., Na, L., Wang, Xue feng, Fu, L.H., Zhu, C.H., Wang, Xiaojun, Zhou, J.H. (2016) Double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase 1 (ADAR1) is proposed to contribute to the adaptation of equine infectious anemia virus from horses to donkeys. *Archives of Virology*. **161**(10), 2667–2672.

Tauro, L., Marino, B., Diaz, L.A., Lucca, E., Gallozo, D., Spinsanti, L., Contigiani, M. (2012) Serological detection of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus in equines from Santa Fe, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **107**(4), 553–556.

Tellier, R. (2006) Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerging Infectious Diseases*. **12**(11), 1657–1662.

The Center for Food Security & Public Health (2009) Equine Encephalitis. *Fast Facts*. [online]. Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/FastFacts/pdfs/easter_wester_venezuelan_equine_encephalomyelitis_F.pdf [Accessed September 8, 2020].

Thiemann, A.K. (2012) Respiratory disease in the donkey. *Equine Veterinary Education*. **24**(9), 469–478.

Thiemann, A.K., Bell, N.J. (2001) The Peculiarities of Donkey Respiratory Disease. *Equine Respiratory Diseases*, P. Lekeux.

- Thompson, Geoffrey M., Jess, S., Murchie, A.K. (2012) A review of african horse sickness and its implications for Ireland. *Irish Veterinary Journal*. **65**(1), 1–8.
- Thompson, Nadin N., Auguste, A.J., Coombs, D., Blitvich, B.J., Carrington, C.V.F., Rosa, A.P.T., Wang, E., Chadee, D.D., Drebot, M.A., Tesh, R.B., Weaver, S.C., Adesiyun, A.A. (2012) Serological evidence of Flaviviruses and Alphaviruses in Livestock and Wildlife in Trinidad. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. **12**(11), 969–978.
- Timoney, P.J. (1996) Equine influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Timoney, P.J. (2000) Factors influencing the international spread of equine diseases. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*. **16**(3), 537–551.
- Timoney, P.J., McCollum, W.H., Murphy, T.W., Roberts, A.W., Willard, J.G., Carswell, G.D. (1987) The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. **35**, 95–102.
- Toribio, R.E. (2019) Dear Donkey and Mule: You Deserve More Appreciation and Better Medicine. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. **35**(3), xiii–xiv.
- USDA (2007) *Equine Infectious Anemia: Uniform Methods and Rules*.
- Vengust, M., Wen, X., Bienzle, D. (2008) Herpesvirus-associated neurological disease in a donkey. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. **20**(6), 820–3.
- Walter, S., Rasche, A., Moreira-Soto, A., Pfaender, S., Bletsa, M., Corman, V.M., Aguilar-Setien, A., García-Lacy, F., Hans, A., Todt, D., Schuler, G., Shnaiderman-Torban, A., Steinman, A., Roncoroni, C., Veneziano, V., Rusenova, N., Sandev, N., Rusenov, A., Zapryanova, D., García-Bocanegra, I., Jores, J., Carluccio, A., Veronesi, M.C., Cavalleri, J.M. V., Drosten, C., Lemey, P., Steinmann, E., Drexler, J.F. (2016) Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine Hepaciviruses in Donkeys. *Journal of Virology*. **91**(1), 1–14.
- Wang, H.N., Rao, D., Fu, X.Q., Hu, M.M., Dong, J.G. (2018) Equine infectious anemia virus in China. *Oncotarget*. **9**(1), 1356–1364.
- Wang, X.F., Lin, Y.Z., Li, Q., Liu, Q., Zhao, W.W., Du, C., Chen, J., Wang, X., Zhou, J.H. (2016) Genetic Evolution during the development of an attenuated EIAV vaccine. *Retrovirology*. **13**(1), 1–13.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1992) Evolution and ecology of influenza a viruses. *Microbiological Reviews*. **56**(1), 153–174.
- Wegdan, H., Intisar, K., Shaza, M., Algezoli, O., Ballal, A., Ihsan, H., Sahar, M., Baraa, A., Manal, H., Muna, E., Taha, K., Nada, E., Ali, Y. (2016) Serological Detection of Equine Herpes Virus (EHV) Type 1 and 4 in Sudan. *British Microbiology Research Journal*. **14**(6), 1–6.
- Wegdan, H.A., Sahar, M.E., Ballal, A., Intisar, K.S., Shaza, M.M., Algezoli, O.A., Ihsan, H.A., Baraa, A.M., Taha, K.M., Nada, E.M., Manan, A.A., Ali, Y.H., Nouri, Y.M. (2017)

- Sero Prevalence of Equine Infectious Anemia (EIA) Virus in Selected Regions in Sudan. *Microbiology Research Journal International*, 1–6.
- WHO – World Health Organization (2019) Equine Infectious Anemia. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.
- Wilkie, G.S., Kerr, K., Stewart, J.P., Studdert, M.J., Davison, A.J. (2016) Genome sequences of equid herpesviruses 2 and 5. *Genome Announcements*. **3**(2).
- Wong, S.S., Webby, R.J. (2013) Traditional and new influenza vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*. **26**(3), 476–492.
- World Organization For Animal Health (OIE) (2019a) Equine Encephalomyelitis. In *Terrestrial Manual 2019*.
- World Organization For Animal Health (OIE) (2019b) Japanese Encephalitis. In *OIE Technical Disease Cards*.
- World Animal Health - OIE (2020) World Animal Health Information System. [online]. Available from: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines.
- Yang, H., Xiao, Y., Meng, F., Sun, F., Chen, M., Cheng, Z., Chen, Y., Liu, S., Chen, H. (2018) Emergence of H3N8 equine influenza virus in donkeys in China in 2017. *Veterinary Microbiology*. **214**(November 2017), 1–6.
- Yildirim, Y., Yilmaz, V., Kirmizigul, A.H. (2015) Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey. *Iranian Journal of Veterinary Research*. **16**(4), 341–344.
- Yildirim, Y., Yilmaz, V., Yazici, K., Özic, C., Ozkul, A. (2018) Molecular and serological investigation of West Nile virus (WNV) infection in donkeys, horses and native geese in Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **169**(4–6), 87–92.
- Yin, X., Lin, Y., Cai, W., Wei, P., Wang, X. (2013) Comprehensive analysis of the overall codon usage patterns in equine infectious anemia virus. *Virology Journal*. **10**(1), 1–6.
- Yongfeng, Y., Xiaobo, S., Nan, X., Jingwen, Z., Wenqiang, L. (2020) Detection of the epidemic of the H3N8 subtype of the equine influenza virus in large-scale donkey farms. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. **8**(1), 26–30.
- Zhu, M., Weng, Q. (2018) China: Will the donkey become the next pangolin? *Equine Veterinary Journal*. **50**, 276.
- Zientara, S., Weyer, C.T., Lecollinet, S. (2015) African horse sickness. *OIE Revue Scientifique et Technique*.
- Zohaib, A., Saqib, M., Beck, C., Hussain, M.H., Lowenski, S., Lecollinet, S., Sial, A., Asi, M.N., Mansoor, M.K., Saqalein, M., Sajid, M.S., Ashfaq, K., Muhammad, G., Cao, S. (2014) High prevalence of West Nile virus in equines from the two provinces of Pakistan. *Epidemiology and Infection*. **143**(9), 1931–1935.

CAPÍTULO 2

Investigação sorológica para arterite viral equina (AVE), anemia infecciosa equina (AIE) e Mormo em asininos no Nordeste do Brasil

2.1. Resumo

Dentre as doenças que acometem os equídeos, a anemia infecciosa equina (AIE), a arterite viral equina (AVE) e o mormo assumem um papel de fundamental importância, do ponto de vista sanitário e econômico. Na literatura nacional, existem poucos relatos sobre a ocorrência de enfermidades infecciosas nos asininos. Tendo em vista a importância dos asininos em atividades laborais em países subdesenvolvidos, como o Brasil, além da falta de informações sobre enfermidades que acometem esses animais, teve-se como objetivo estudar a ocorrência de anticorpos anti-EIAV, anti- *Alphaarterivirus equid* e anti-mormo em 879 soros de asininos errantes nos estados da Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte, através das técnicas sorológicas de ELISA, Immunoblot e soroneutralização. Observou-se que 1,14% (10/875) apresentavam anticorpos contra o EIAV e 1,94% (17/875) apresentavam anticorpos contra o *Alphaarterivirus equid*. Nenhuma das 345 amostras do Ceará foram sororeagentes contra o mormo. Os resultados obtidos sugerem que o EIAV e o *Alphaarterivirus equid*, circulam entre os asininos do Nordeste brasileiro, enfatizando a necessidade de uma rotina diagnóstica e estudos epidemiológicos para essas enfermidades nos equídeos da região.

2.2. Introdução

O asinino doméstico (*Equus asinus*) é uma de características singulares, cujos ancestrais, oriundos da África, evoluíram para sobreviver em ambientes semiáridos, com escassas fontes de alimentos e água (Burden and Thiemann, 2015). Segundo a FAO, o Brasil possui o maior rebanho de asininos da América do Sul (FAO, 2021) e aproximadamente 90% dele pode ser encontrado na região Nordeste do Brasil (IBGE, 2017). No Brasil a criação de asininos está relacionada a uma herança social e econômica, ligada a atividades agrícolas (Carneiro *et al.*, 2018), porém com o advento da tecnologia esses animais estão sendo substituídos por máquinas e abandonados por seus proprietários. Os asininos abandonados vivem errantes ou são recolhidos pelo poder público, a fim de evitar acidentes de trânsito (Carneiro *et al.*, 2018), e são mantidos, em sua maioria, em locais com condições sanitárias precárias. Os asininos que vagam livremente pelas rodovias e/ou são recolhidos pelo poder público, passam por diversas situações de estresse como, captura e colocação em grupos com

animais desconhecidos, altas temperaturas, baixa oferta de água e alimentos. Essa combinação de situações estressantes, somando a aglomeração de animais potencializa a transmissão de patógenos infecciosos como, anemia infecciosa equina (AIE), mormo e arterite viral equina (AVE), todos eles causadores de doenças infecciosas listadas pela OIE em vigor no ano de 2021 (OIE, 2021).

A AVE é uma doença respiratória e reprodutiva dos equídeos com distribuição mundial, causada pelo *Alphaarterivirus equid* um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo que pertence à ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae*, subfamília *Equarterivirinae* gênero *Alphaartevirus* (ICTV, 2020). No Brasil, o primeiro surto ocorreu em 1993, na cidade de Ibiúna, Estado de São Paulo, em uma propriedade com criação de cavalos Mangalarga Paulista (Balasuriya *et al.*, 2013). Por falta de diagnóstico de rotina, poucos estudos foram realizados até hoje com ocorrências relatadas variando entre 0 e 53% (Rocha *et al.*, 2020); porém é desconhecido o real status epidemiológico da AVE no país (Bello *et al.*, 2007). Considerando o nordeste brasileiro, apenas dois estudos sem evidências sorológicas da presença da AVE foram realizados até a presente data: ambos no estado do Rio Grande do Norte, e em grupos de equídeos compostos majoritariamente por equinos (Bello *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2018).

Assim como a AVE, a AIE também possui distribuição mundial, sendo causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um *Lentivírus* que pertence à família *Retroviridae* e afeta exclusivamente equinos, muares e asininos (Issel and Coggins, 1979). A AIE é, hoje, um grande obstáculo ao desenvolvimento da equideocultura, por ser uma doença transmissível e incurável, que provoca prejuízos econômicos aos criadores de equídeos, além de ser uma importante barreira sanitária (Jara *et al.*, 2020). Segundo as estatísticas oficiais, mais de 77.759 casos de AIE foram registrados no Brasil entre os anos de 2009 e 2019, sendo 14,63% dos casos foram registrados nos estados da Bahia/BA, Ceará/CE e Rio Grande do Norte/RN (MAPA, 2021). Porém não é informado com precisão a taxa de prevalência da enfermidade no país, uma vez os exames laboratoriais para estas enfermidades são realizados apenas para o trânsito interestadual e/ou participação em eventos agropecuários controlados pelos serviços oficiais de defesa sanitária animal (Almeida *et al.*, 2006). Estudos apontam que a média da prevalência da AIE no Brasil varia entre 2-3%, no entanto regiões como o Pantanal Mato-grossense, Norte do Brasil e do Estado de Minas Gerais possuem uma elevada prevalência de infecção pelo EIAV em seus rebanhos (Borges *et al.*, 2013; Almeida *et al.*,

2006; Freitas *et al.*, 2015). A prevalência da AIE em asininos é pouco estudada, até hoje apenas um estudo para essa finalidade foi realizado na população de asininos do Rio Grande do Norte, encontrando uma prevalência de 3% (12/367) (Oliveira *et al.*, 2017).

O mormo é uma doença de solípedes (equinos, asininos e muares), zoonótica, contagiosa e potencialmente fatal causada pela infecção com a bactéria *Burkholderia mallei* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Ela também pode acometer carnívoros, incluindo os humanos, embora os equídeos sejam seus reservatórios naturais. A doença é caracterizada por ulcerações nodulares e lesões de pele e mucosas e atinge órgãos linfáticos e o trato respiratório dos hospedeiros (Khan *et al.*, 2013). Apesar do mormo ter sido erradicado da maioria dos países, ele recuperou o status de doença reemergente por causa dos inúmeros surtos recentes (Kettle and Wernery, 2016). Atualmente, a doença é restrita a América do Sul, norte da África e partes da Ásia e Oriente Médio (OIE, 2021). No Brasil 1.561 casos foram reportados, em todo país, entre os anos de 2009 e 2019 (12,62% dos casos foram registrados nos estados da BA, CE e RN) (MAPA, 2021).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de anticorpos contra essas doenças em asininos de três estados do Nordeste brasileiro, Bahia (BA), Ceará (CE) e Rio Grande do Norte (RN), estimando uma soroprevalência dessas doenças na região Nordeste.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Declaração de ética

O projeto foi submetido e aprovado pelos comitês de ética no uso de animais CEUA – UFMG, nº processo 206/2017 (Anexo 1), e CEUA – UFRSA nº processo 23091.010510/2017-75 (Anexo 2).

2.3.2. Área de estudo

O estudo foi realizado na região Nordeste do Brasil, em animais pertencentes a fazendas de recolhimento nos estados do Rio Grande do Norte, Município de Apodi (latitude: -5.64953, longitude: -37.7958), e Ceará, no município de Santa-Quitéria (latitude: -4.33238, longitude: -40.15734), além de uma fazenda com animais tutelados por uma Organização não Governamental no estado e Bahia, no município de Euclides da Cunha (latitude: -10.5061, longitude: -39.0092) (Figura 1).

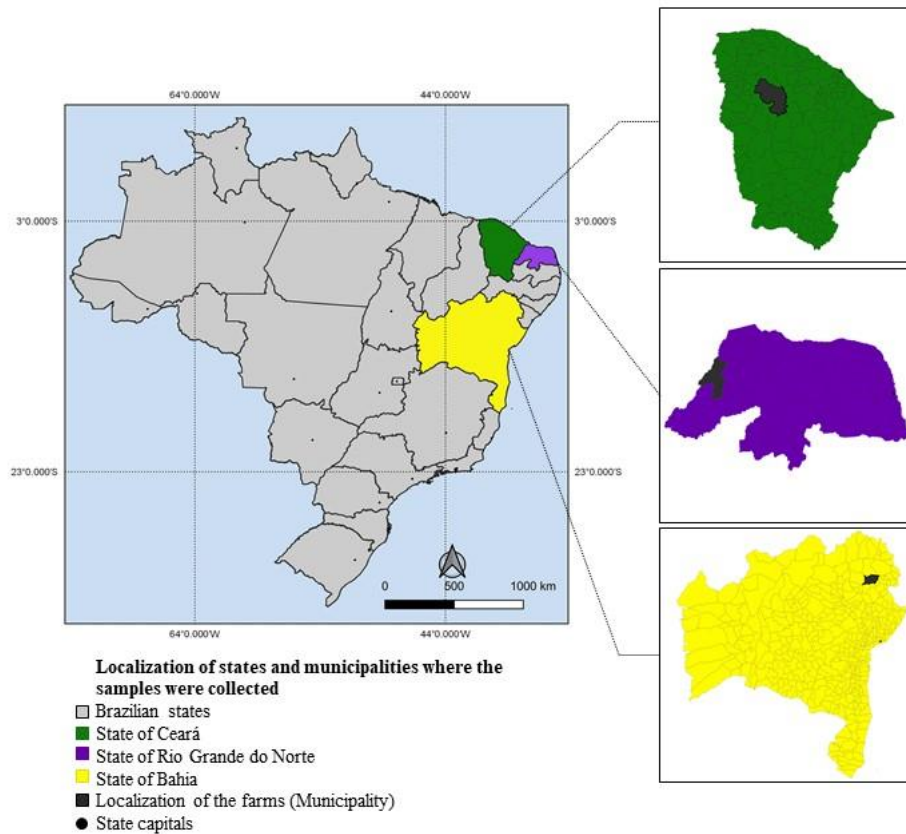


Figura 1 - Localização das fazendas onde foram amostrados os 879 asininos, em relação ao estado e ao município de origem dos animais.

2.3.3. Grupo de estudo e coleta de amostras biológicas

Todos os animais envolvidos neste estudo eram asininos semi-selvagens ou domesticados, abandonados e recolhidos pelo poder público (CE e RN) e OnG (BA) das estradas e interiores de todo o RN e CE, e em uma fazenda de abate clandestino no interior da BA. Com exceção dos animais da Bahia, os demais não possuíam histórico clínico, eram de idades variáveis e de ambos os sexos. Avaliações clínicas no momento da coleta das amostras demonstraram que todos os animais não apresentavam nenhum sinal evidente de doença, incluindo qualquer sinal que pudesse ser considerado compatível com AVE, AIE e mormo.

As amostras de sangue foram coletadas por meio de venopunção asséptica da veia jugular, utilizando tubos a vácuo e agulhas individuais, ambos estéreis (Vacuette®, Greiner Bio One, Alemanha) de um total de 879 asininos, sendo 386 animais do RN, 345 animais do CE e 144 animais da BA. Para obtenção do soro os tubos de sangue foram centrifugados por dez minutos em centrífuga clínica a 1.900 xg, em seguida foram estocados a -20°C até o momento

dos ensaios sorológicos. As amostras de sangue de asininos do estado do RN foram coletadas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015, e pertencem ao banco de soro do Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (RetroLab). As amostras do CE foram coletadas em outubro de 2019. As amostras da BA foram coletadas em novembro de 2019, e foram gentilmente cedidas ao RetroLab pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Bahia.

*Os animais da Bahia eram oriundos de um grupo maior que já havia passado por uma triagem prévia para AIE e mormo.

2.3.4. Diagnóstico sorológico

Para a AIE, os soros foram encaminhados para o Laboratório de Retrovírus da Escola de Medicina Veterinária da UFMG (RetroLab), onde foram realizados os testes de ELISA pgp45, imunodifusão em gel de agar (IDGA) e *immunoblotting* (IB). O ELISA pgp45 foi realizado conforme descrito por Naves *et al.* (2019). Resumidamente, o antígeno peptídico da glicoproteína do envelope viral (pgp45) foi sintetizado usando o método Merrifield em conjunto com um sintetizador automático (ResPepSL / Spot Automatic Synthesizer Intavis GmbH, Koln, Alemanha) (Naves *et al.*, 2019). Em seguida, cada poço de uma placa ELISA de 96 poços (Nunc-Immuno Plate Maxisorp) foi adsorvida com antígeno pgp45 a 0,5 ng/ poço em tampão de carbonato / bicarbonato 50 mM (pH 9,6) e incubado por 18h a 4° C. As placas foram lavadas 2 vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,0) contendo Tween 20 a 0,01%(PBS-Tween) e depois incubadas por 1 h com solução de bloqueio consistindo em leite desnatado (5%) em PBS-Tween. Após 3 lavagens em PBS-Tween, foram adicionados 100µL de cada amostra de soro equino (diluído a 1/100) em duplicata e incubados por 1 h em temperatura ambiente. Além disso, as amostras de soro de referência positivas e negativas para AIE (2 poços cada) foram incluídas em cada placa como controles. No final do período de incubação, todas as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e incubadas por mais 1 h em temperatura ambiente com conjugado de IgG de coelho anti-cavalo- peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído para 1: 5000 em PBS-Tween. Após 3 lavagens adicionais com PBS-Tween, 100µL de o-fenilendiamina do substrato (OPD) a 0,5mg / mL mais peróxido de hidrogênio (H₂ O₂) em tampão fosfato-citrato (ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M a pH 5) foi adicionado e incubado por 10min à temperatura ambiente. A reação foi parada com ácido sulfúrico 1M e as densidades ópticas lidas em um espectrofotômetro no

comprimento de onda de 492nm. Após normatização dos valores de DO em relação as DOs dos controles, os resultados foram considerados positivos quando os valores de densidade óptica foram superiores a 0,225 (Naves *et al.*, 2019).

Todas as amostras positivas no ELISA pgp 45 foram submetidas ao teste de IDGA para confirmação dos resultados. Os testes de IDGA foram realizados com as amostras de soro sem diluir, utilizando o kit comercial para o diagnóstico da AIE aprovado pelo MAPA, de acordo com as recomendações do fabricante (Laboratórios Bruch, Brasil). Resumidamente, 4,5 mL de solução de ágar noble 1% em tampão borato (pH 8.6), após aquecida em micro-ondas, foi distribuída em lâminas de microscopia (25 x 75 mm). Após a solidificação, o gel foi perfurado com furador próprio, que contém um orifício central e seis periféricos, medindo 4 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre eles. Um volume de 25 µL dos soros a serem testados foram distribuídos, intercalados com os soros controles positivos e no orifício central, adicionou-se 25 µL do antígeno. As lâminas foram incubadas entre 20-25°C, por 48 h e lidas a olho nu, sob fonte de luz indireta, para verificação das linhas de precipitação e identidade entre o antígeno e o soro controle positivo.

No caso de amostras conflitantes entre o ELISA pgp45 e a IDGA, a técnica de IB foi utilizada. As membranas de imunoblot foram preparadas conforme descrito por Issel and Cook, (1993). O protocolo usado para o IB também foi seguido conforme descrito previamente (Issel *et al.*, 2013), com exceção de que todas as amostras de soro testadas foram diluídas 1:20 e o conjugado de coelho anti- IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA) foi usado na diluição de 1:1500, ambos com volume final de 1 mL. Resumidamente, as membranas de imunoblot foram bloqueadas em tampão salina fosfato (PBS) (pH 7.2) contendo 5% de leite desnatado, por 1 h sob agitação. A membrana foi cortada em tiras de 4 mm de largura, para serem utilizadas individualmente por amostra e controle, sendo incubadas com as amostras de soro diluídos 1:20, por 1 h à TA, sob agitação, seguido por 4 lavagens com PBS saturado com 0.85 M de NaCl e acrescido de 0,05% de Tween 20 e subsequente adição de conjugado de coelho anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:1500 em PBS contendo 1% de leite em pó desnatado. Após 1h de incubação à TA, sob agitação, as membranas foram lavadas em PBS saturado com 0.85 M de NaCl acrescido de 0,05% de Tween 20, por 10 minutos, sob agitação, seguido de 10 minutos de lavagem com PBS saturado com 0.85 M NaCl, sob agitação e última lavagem com PBS por 10 minutos, à TA sob agitação. A ligação de

anticorpos foi detectada pela adição de substrato 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine – TMB (Promega Corporation, EUA), por 5 minutos, parando a reação com água destilada, após retirar o substrato. As amostras foram consideradas positivas no imunoblot quando os anticorpos se ligaram em pelo menos duas das três principais proteínas do EIAV (p26, gp45 e/ou 26 gp90) (Issel *et al.*, 2013; Scicluna *et al.*, 2013).

Com relação a AVE, os soros foram encaminhados ao Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico de São Paulo, onde foi realizado o teste de soroneutralização em placa de 96 cavidades, segundo protocolo descrito por Senne *et al.* (1985), para detecção da presença de anticorpos séricos contra o *Alphaarterivirus equid*. Animais com anticorpos neutralizantes anti-virus no soro diluído 1:4, foram considerados positivos.

Para diagnóstico das amostras de mormo, o teste ELISAi foi realizado conforme recomendações do fabricante (BIOVETECH LTDA), e somente as amostras coletadas no CE foram submetidas a este teste, por causa da quantidade insuficiente de kits. Resumidamente, adicionamos em cada poço individualmente, 100uL do soro controle positivo, 100uL do soro controle negativo e 100uL de cada amostra diluída em tampão de diluição na proporção de 1:50 e, logo após incubamos por 1h a 37° C. Após 3 lavagens com 300uL de tampão de lavagem por poço, adicionamos 100uL do conjugado em cada poço e incubamos por 45min a 37° C. Todas as placas foram lavadas 4 vezes, conforme lavagem anterior, e adicionamos 50 uL de substrato TMB em cada poço, incubando por 15min à temperatura ambiente, protegendo as placas da luz. A reação foi concluída com solução de parada (50uL/ poço), as densidades ópticas foram lidas com um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram porcentagem de positividade (PP) ≥ 20 . O PP foi calculado conforme a fórmula $PP = \frac{DO\ da\ amostra \times 100\%}{DO\ do\ soro\ controle\ positivo}$.

As amostras positivas para mormo no ELISAi foram submetidas ao *western blotting* (WB). O WB foi realizado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco (LFDA / PE), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Resumidamente, o protocolo seguiu os seguintes passos: após a corrida eletroforética, o antígeno LPS extraído de *B. mallei* foi transferido para membrana de PVDF de 0,45µm (Invitrogen, EUA). Antes do uso, a membrana foi ativada por imersão em metanol. Foram utilizadas tiras de membrana de três milímetros para analisar a amostra de soro e os controles

na diluição de 1: 100. Conjugado IgG anti-cavalo marcado com fosfatase alcalina produzida em coelho (Sigma Aldrich, EUA) foi utilizado em uma diluição de 1: 10.000. A detecção foi feita pela coloração NBT-BCIP (Sigma Aldrich, EUA).

2.4. Resultados

Todas as 879 amostras foram testadas quanto à presença de anticorpos contra o EIAV usando o ELISA pgp45 para triagem e o IDGA para confirmação do resultado. Apenas 1,02% (9/879) das amostras de soro foram positivas no IDGA em comparação com 1,48% (13/879) no ELISA pgp45 (Tabela 8). Amostras com resultados discordantes entre os dois testes foram submetidas à análise pelo teste de IB, para validação do resultado. No teste de IB uma das quatro amostras discordantes foi categorizada como positiva para AIE, por reagir com pelo menos duas das três proteínas estruturais virais imunodominantes (Tabela 8), resultando em uma prevalência de 1,14% (10/879).

Tabela 8 - Asininos soropositivos para AIE- Resultados de ELISA pgp45, IDGA p26 e WB

Local	Ano da coleta	Identificação do animal	IDGA	ELISA pgp45	WB	Classificação
RN	2014	7	Neg	Pos	Pos	Pos
RN	2014	122B	Pos	Pos	NA	Pos
RN	2014	156R	Neg	Pos	Neg	Neg
CE	2019	1762	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	3213	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	3825	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	5752	Neg	Pos	Neg	Neg
CE	2019	6401	Neg	Pos	Neg	Neg
CE	2019	7275	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	7956	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	8529	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	8815	Pos	Pos	NA	Pos
CE	2019	Pig	Pos	Pos	NA	Pos

NA – Não se aplica; Pos – Positivo; Neg - Negativo.

A presença de anticorpos contra *Alphaarterivirus equid* foi observada em apenas 1,93% (17/879) das amostras - 2,59% (10/386) do RN e 4,86% (7/144) da BA, nenhum dos asininos do CE foram positivos para AVE. Não houve evidência sorológica da circulação da *Burkholderia mallei* nos asininos testados neste estudo.

2.5. Discussão

A população de asininos do Nordeste brasileiro está entre as 20 maiores do mundo (IBGE, 2017; FAO, 2021), e os estados da Bahia, Rio Grande do Norte e Ceará albergam mais de 40% dessa população (IBGE, 2017). Embora os asininos já tenham exercido um papel importante na sociedade agrícola, muitos desses animais foram abandonados por seus donos e, atualmente, milhares de asininos vivem errantes pelas estradas do Nordeste brasileiro (Carneiro *et al.*, 2018).

No Brasil a AIE é uma importante doença para a Defesa Sanitária Animal, e assim como para o mormo, o MAPA adota como medida de controle a eutanásia obrigatória sem indenização dos animais infectados com o EIAV, com exceção das regiões endêmicas, como Pantanal. Nessas regiões os animais infectados com o EIAV devem ser isolados do rebanho negativo pra AIE (Oliveira *et al.*, 2011; MAPA, 2004).

No presente estudo, a prevalência sorológica geral do EIAV foi de 1,14%, o que é até 27 vezes menor do que as relatadas em outras áreas do Brasil (Borges *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2015). No entanto, considerando outros dois estudos realizados em equinos e asininos no Nordeste, o resultado foi similar com 2,69 e 3%, respectivamente (Silva *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2017). A pesquisa realizada por Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 2013) amostrou equinos dos estados da Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte, e foi conduzida usando exclusivamente o teste de IDGA, a taxa de soropositividade geral encontrada por eles foi de 2,69% (151/5615) que é 2,6 vezes maior que os 1,02% relatados aqui usando a mesma técnica de diagnóstico. Embora a pesquisa anterior tenha apresentado uma prevalência maior e certamente tenha produzido uma subestimativa da incidência de infecção pelo EIAV por causa de reações falso-negativas que são comuns ao teste de IDGA (Scicluna *et al.*, 2013; Issel *et al.*, 2013), ela em conjunto com Oliveira *et al.* (Oliveira *et al.*, 2017), que encontrou uma soroprevalência para EIAV de 3% (12/367) em asininos do RN, nos fazem crer que a prevalência de infecções por EIAV na região Nordeste é significativamente menor do que em outras áreas do Brasil, como o Pantanal, Pará e norte de Minas Gerais (Almeida *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2015).

Sugere-se investigar os fatores que contribuem para essa menor incidência. Contudo, a baixa carga de vetores hematófagos na região e o fato da maioria desses animais não pertencerem a nenhum proprietário, são pouco manipulados em procedimentos de vacinação, ou uso de equipamentos equestres, por exemplo, são hipóteses que podem ajudar a justificar a

baixa incidência do EIAV na região. A densidade de insetos hematófagos, vetores naturais da doença, pode estar relacionada com a época das chuvas, apresentando uma menor densidade em regiões quentes e secas (Instituto Evandro Chagas, 2001) como no Nordeste brasileiro. Além da alta densidade de insetos hematófagos, as regiões do Brasil que apresentam uma maior prevalência de EIAV possuem em comum áreas de inundações que ocorrem regularmente em algumas seções do Pantanal e norte do Pará (Ilha de Marajó) tendo o efeito de forçar os equídeos a se reunirem em terrenos mais altos, próximos uns dos outros, aumentando assim o potencial de transmissão mediada por insetos (Borges *et al.*, 2013). A vacinação e o compartilhamento de equipamentos equestres são fatores que já foram apontados como contribuintes para uma maior incidência de infecção pelo EIAV em equinos (artigo em preparação) (Borges *et al.*, 2013). A vacinação contra encefalomielite e raiva é uma prática comum em animais com a desvantagem de que a reutilização de agulhas de seringa constitui um mecanismo muito mais eficaz para a transmissão do EIAV do que qualquer inseto vetor. Por exemplo, o volume de sangue residual contido dentro de uma agulha de seringa é aproximadamente 5.000 vezes maior do que o encontrado no aparelho bucal dos insetos vetores (Foil *et al.*, 1987), além disso o EIAV permanece infeccioso por pelo menos 96 h em uma agulha, enquanto perde 99% da infectividade após 1h no aparelho bucal do inseto vetor, tornando-se totalmente indetectável 4 h após a alimentação (Williams *et al.*, 1981).

Finalmente, como a maioria dos asininos vivem livres, sem vacinação e compartilhamento de equipamentos equestres, acredita-se que a principal forma de transmissão do EIAV nesses animais seja mediada por inseto hematófago. A transmissão por inseto hematófago é puramente mecânica, ou seja, a probabilidade de ocorrer é maior durante os episódios febris, quando a carga viral associada ao sangue atinge seus níveis mais elevados. No entanto, os asininos podem constituir um risco menor de transmissão através dessa via do que os equinos, conforme sugerido por Cook e colaboradores (Cook *et al.*, 2001), que mostraram que os asininos exercem um controle mais rigoroso sobre a replicação viral e, como resultado, têm cargas virais associadas ao sangue mais baixas juntamente com a ausência de sinais clínicos.

Até o momento não existiam evidências sorológicas da presença do *Alphaarterivirus equid* em equídeos no Nordeste do Brasil, sendo os únicos dois estudos conduzidos nessa região foram realizados no estado do RN e não encontraram animais com anticorpos contra o *Alphaarterivirus equid* (Bello *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2018). Apesar do *Alphaarterivirus*

equid ainda não ter sido isolado no Brasil, a detecção de anticorpos para esse agente em São Paulo (Braga *et al.*, 2012; Lara *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 1999; Lara *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2003; Carvalho P.R. *et al.*, 2013), Minas Gerais (Bello *et al.*, 2007), Rio de Janeiro (Diaz *et al.*, 2015), Paraná (Lara *et al.*, 2003; Sartori *et al.*, 2016) e no Rio Grande do Sul (Diel *et al.*, 2006) sugere sua circulação nos rebanhos de equídeos desses estados. Da mesma forma, a taxa de animais soropositivos apresentada neste estudo sugere que o vírus está presente na BA e no RN, já que a presença de anticorpos específicos em animais não vacinados é um indicativo de exposição prévia ao vírus.

A prevalência detectada neste estudo merece atenção especial, pois envolve animais de vida livre, que em teoria teriam menores chances de contraírem a doença, pois a maioria dos estudos associam a presença da AVE com regiões que possuem maior aglomeração de animais e intensa atividade equestre e reprodutiva (Lara *et al.*, 2002; Diel *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2006; Lara, *et al.*, 2003a; Lara *et al.*, 2003b; Braga *et al.*, 2012; Balasuriya *et al.*, 2013). Considerando que os animais deste estudo eram assintomáticos e que essa apresentação é relativamente comum, medidas de profilaxia e controle devem ser tomadas a fim de se evitar a disseminação viral e o surgimento de surtos da enfermidade nos estados do RN e BA e em nível nacional.

O mormo também é uma das doenças mais importantes para o Serviço de Defesa Sanitária Animal, como medida de controle, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina o sacrifício obrigatório de animais infectados com mormo, sem direito a indenização do proprietário (MAPA, 2018). Do ano de 2009 a 2019, casos de mormo foram registrados em todos os estados brasileiros, sendo a região Nordeste a responsável por mais de 57% dos casos (MAPA, 2021). Todavia, em nosso estudo não encontramos evidências sorológicas da presença de mormo nos animais pesquisados. O fato de os animais envolvidos neste estudo serem errantes, ou seja, não viviam em grandes grupos, pode ter favorecido a ausência da doença nesta população, visto que a maioria dos surtos são relatados em contextos nos quais os equídeos são alojados em condições de superlotação e saneamento precário (Kettle and Wernery, 2016), sendo infectados, principalmente, pela ingestão de água e ração contaminadas por secreções nasais de animais infectados (Wagg and DeShazer, 2004). Os asininos infectados com *Burkholderia mallei*, na maioria das vezes, apresentam a forma aguda/fatal da doença evoluindo a óbito em 7-10 dias (Barrandeguy and Carossino, 2018); esse quadro rápido e letal associado ao comportamento gregário desses animais errantes, provavelmente, influenciou o resultado encontrado.

2.6. Conclusão

O presente estudo representa a pesquisa sorológica mais extensa realizada em asininos até o momento e foi conduzida para investigar a ocorrência de anticorpos contra as doenças mormo, AIE e AVE. Os resultados obtidos são um indicativo da exposição prévia desses animais aos vírus pesquisados, demonstrando a circulação desses agentes nos asininos errantes do Nordeste do Brasil. Outra observação importante foi que os anticorpos contra o mormo estavam ausentes nos animais pesquisados. Nossos dados apoiam a necessidade de atualização do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, adotando novas medidas, como por exemplo a inclusão de uma vigilância sorológica ativa em animais domiciliados e errantes, para conhecimento da verdadeira prevalência e elaboração de medidas de controle adequadas para essas doenças em nível regional e nacional. As evidências relatadas neste estudo indicam que os asininos são suscetíveis a infecções naturais dos agentes aqui mencionados.

2.7. Referências

- 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. (2006) Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **58**(2), 141–148.
- Balasuriya, U.B.R., Go, Y.Y., MacLachlan, N.J. (2013) Equine arteritis virus. *Veterinary Microbiology*. **167**(1–2), 93–122.
- Barrandeguy, M.E., Carossino, M. (2018) Infectious Diseases in Donkeys and Mules: An Overview and Update. *Journal of Equine Veterinary Science*. **65**, 98–105.
- Bello, A.C.P.P., Cunha, A.P., Braz, G.F., Lara, M.C.S.H., Reis, J.K.P., Haddad, J.P.H., Rocha, M.A., Leite, R.C. (2007) Frequency of equine viral arteritis in Minas Gerais State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **59**(4), 1077–1079.
- Borges, A.M.C.M., Silva, L.G., Nogueira, M.F., Oliveira, A.C.S., Segri, N.J., Ferreira, F., Witter, R., Aguiar, D.M. (2013) Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in Veterinary Science*. **95**(1), 76–81.
- Braga, P.R.C., Lara, M.C.C.S.H., Dias, A., Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Ribeiro, M.G., Borges, A.S. (2012) Soroprevalência da arterite viral equina em mesorregiões paulistas entre 2007 e 2008 Seroprevalence of equine viral arteritis in paulista mesoregions between 2007 and 2008. *Semina: Ciências Agrárias*. **33**(4), 1501–1506.
- Burden, F., Thiemann, A. (2015) Donkeys are different. *Journal of Equine Veterinary Science*. **35**(5), 376–382.
- Câmara, R.J.F., Bueno, B.L., Resende, C.F., Balasuriya, U.B.R., Sakamoto, S.M., Reis, J.K.P. dos (2020) Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules. *Animals*. **10**(12), 2203.
- Carneiro, G.F., Cavalcante Lucena, J.E., de Oliveira Barros, L. (2018) The Current Situation

and Trend of the Donkey Industry in South America. *Journal of Equine Veterinary Science*. **65**, 106–110.

Carvalho P.R., E.V.M., C., E.S., C., M.C.C.S.H., L. (2013) Seroepidemiology surveys of equine Arteritis virus in equids population of center-west region of São Paulo State, Brazil. *Global Veterinária*. **10**(2), 223–232.

Cook, S.J., Cook, R.F., Montelaro, R.C., Issel, C.J. (2001) Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Veterinary Microbiology*. **79**(2), 93–109.

Williams, DL, Issel, CJ, Steelman, CD, Adams Jr, WV e Benton, CV (1981). Estudos com o vírus da anemia infecciosa equina: tentativas de transmissão por mosquitos e sobrevivência do vírus em aparelhos bucais de vetores e agulhas hipodérmicas e em cultura de tecidos de mosquitos. *American Journal of Veterinary Research*, **42** (9), 1469-1473.

Diaz, K.A.F., De Oliveira Hübner, S., Vargas, G.D. ávil., Fischer, G., Lilenbaum, W., De Lima, M. (2015) Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e vírus da arterite equina em rebanhos equinos do estado do rio de janeiro. *Ciencia Animal Brasileira*. **16**(3), 410–418.

Diel, D.G., De Almeida, S.R., Weiblen, R., Frandoloso, R., Anziliero, D., Kreutz, L.C., Groff, F.H.S., Flores, E.F. (2006) Prevalence of antibodies to influenza virus, viral arteritis and herpesvirus in horses of the Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ciencia Rural*. **36**(5), 1467–1473.

Eiko YABUUCHI, Yoshimasa KOSAKO, Hiroshi OYAIZU, Ikuya YANO, Hisako HOTTA, Y.H., Takayuki EZAKI, M.A. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*. **36**(12), 1251–1275.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021) FAOSTAT. [online]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> [Accessed March 7, 2021].

Fernandes, W.R., Do, M., Custódio De Souza, C. (1999) Determinação sorológica da Arterite Viral Equina em equinos hípidos, com abortamento e com sintomas de alteração do sistema respiratório Serological determination of equine arteritis virus in horses with abortion and symptoms of respiratory alteration. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. **6**(3).

Ferreira, H.I.P., Calabuig, C., Borges, P.A.C., De Medeiros Oliveira, I.V.P., De Carvalho Freire, D.A., Villalobos, E.M.C., De Souza Hunold Lara, M. do C.C., Pituco, E.M., De Campos Nogueira Romaldini, A.H., Cunha, E.M.S., De Stefano, E., Azevedo de Paula Antunes, J.M. (2018) Seroprevalence of viral agents in vaquejada horses. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. **40**(1), 54218.

Foil, L.D., Adams, W. V., McManus, J.M., Issel, C.J. (1987) Bloodmeal Residues on Mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the Potential for Mechanical Transmission of Pathogens. *Journal of Medical Entomology*. **24**(6), 613–616.

Freitas, N.F.Q.R., Oliveira, C.M.C., Leite, R.C., Reis, J.K.P., Oliveira, F.G., Bomjardim, H. dos A., Salvarani, F.M., Barbosa, J.D. (2015) Equine infectious anemia on Marajo Island at the mouth of the Amazon river. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **35**(12), 947–950.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017). IBGE | Resultados do Censo Agro 2017. [online]. Available from: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75642 [Accessed March 9, 2021].

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (2020) ICTV Taxonomy history: Alphaarterivirus equid. [online]. Available from: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201901827 [Accessed September 8, 2020].

Instituto Evandro Chafgas. (2001). *Memórias do Instituto Evandro Chagas: Parasitologia AS diversas formações da ilha.*

Issel, C.J., Coggins, L. (1979) Equine infectious anemia: current knowledge. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **174**(7), 727–733.

Issel, C.J., Cook, R.F. (1993) A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* **5**(1), 137–41.

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. (2013) Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record.* **172**(8), 210.

Jara, M., Frias-De-Diego, A., & Machado, G. (2020). Phylogeography of equine infectious anemia virus. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *8*, 127.

Kettle, A.N.B., Wernery, U. (2016) Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. *Equine Veterinary Journal.* **48**(5), 654–658.

Khan, I., Wieler, L.H., Melzer, F., Elschner, M.C., Muhammad, G., Ali, S., Sprague, L.D., Neubauer, H., Saqib, M. (2013) Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases.* **60**(3), 204–221.

Lara, M. C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Oliveira, J.V. De, Nassar, A.F. de C., Silva, L.M.P., Okuda, L.H., Romaldini, A.H. de C.N., Cunha, M.S., Marques, E.C., Mori, E. (2017) Occurrence of viral diseases in donkeys (*Equus asinus*) in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* **54**(2), 154.

Lara, M.C.C.S., Furman, K.E., Barros Filho, I.R., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Deconto, I., Bonacim, J., Utime, R.A., Biondo, A.W. (2006). Detection of antibodies against equine viral arteritis virus (evav) and equine herpesvirus type 1 (ehv-1) in cart horses from curitiba and surroundings, southern Brazil. *Archives of Veterinary Scienc*, 11–14.

Lara, M.C.C.S.H., Fernandes, W.R., Timoney, P.J., Birgel, E.H. (2002) Prevalence of equine arteritis virus specific antibodies in horses of São Paulo State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia.* **54**(3), 223–227.

Lara, M., Cunha, E. M. S., Ferrari, C. I. L., Gregory, L., Castro, A. F., Silva, L. H. Q., ... & Birgel, E. H. (2003a) Ocorrência de anticorpos contra o Vírus da Arterite dos Equinos em cavalos criados na região de Araçatuba, SP. *Veterinária Notícias.* **9**(2), 69–73.

Lara, M.C.C.S.H., Barros Filho, I.R., Viana, F., Gregory, L., Cunha, E.M.S., Castro, A.F.,

- Birgel, E.H., Fernandes, W.R. (2003b) Pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Arterite dos Equinos (VAE) e Herpes Equino tipo 1 (HVE-1), em cavalos criados em Curitiba, PR. *A Hora Veterinária*. **23**(135), 51–53.
- MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2004) Normas para prevenção e controle da anemia infecciosa equina - AIE. *Instrução Normativa SDA/MAA 45/2004*, 1–12.
- MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2018) Mormo. *Portaria Nº 35, de 17 de abril de 2018*.
- MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2021) MAPA Indicadores. [online]. Available from: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm> [Accessed March 30, 2021b].
- 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. (2019) 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*. **266**, 49–57.
- OIE: World Organisation for Animal Health (2021) Listed diseases 2021: OIE [online]. Available from: <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2021/> [Accessed March 30, 2021d].
- OIE: World Organisation for Animal Health (2021) OIE - WAHIS. [online]. Available from: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/qd-dashboard> [Accessed March 25, 2021e].
- Oliveira, A.L.C., Montezuma, E.S., Ravaglia, E., Juliano, R.S., Nogueira, M.F. (2011) *Avaliação da Prevenção e Controle da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal*. Corumbá, MS.
- 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. (2017) Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. **140**, 30–37.
- Rocha, L.L.L., Diniz, D.D.M., de Jesus, T.K.S., Júnior, J.W.P., Villalobos, E.M.C., de Souza Hunold Lara, M. do C.C., Rizzo, H. (2020) Occurrence of antibodies against herpesvirus and arteritis virus in equines from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*. **48**(0), 1748.
- Sartori, L., Lara, M. do C.C. de S.H., Villalobos, E.M.C., Lisbôa, J.A.N. (2016) Prevalência de anticorpos contra o vírus da arterite equina nas mesorregiões Noroeste, Centro Ocidental e Norte Central do Paraná. *Arquivos do Instituto Biológico*. **83**(0).
- Scicluna, M.T., Issel, C.J., Cook, F.R., Manna, G., Cersini, A., Rosone, F., Frontoso, R., Caprioli, A., Antonetti, V., Autorino, G.L. (2013) Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology*. **165**(1–2), 123–134.
- Senne, D. A., Pearson, J. E., & Carbrey, E. A. (1985). Equine viral arteritis: a standard procedure for the virus neutralization test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. In *Proceedings of the 89th annual meeting of the United States Animal Health Association* (pp. 29-34). WI: Milwaukee.

Silva, C.F., Pequeno, N. F., Clementino, I. J., Azevedo, S. S., Silva, A. (2013) 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*. **50**(1), 12–17.

Wagg, D.M., DeShazer, D. (2004) Glanders, new insights into an old disease. In L. E. Lindler, F. J. Lebeda, & G. W. Korch, eds. *Biological Weapons Defense: Infectious Diseases and Counterterrorism*. Totowa: Humana Press, pp. 209–238.\zz

CAPÍTULO 3

Soroprevalência e detecção das estirpes neuropatogênica do *Equine herpesvirus type 1* (EHV-1) e *Asinine herpesvirus type 5* (AHV-5) em asininos do Nordeste brasileiro

3.1. Resumo

Os herpesvírus equinos (HVE) são importantes patógenos causadores de doenças respiratórias, reprodutivas e neurológicas na população de equídeos de todo o mundo, com escassos relatos em asininos. Sabendo da importância dos asininos para região Nordeste do Brasil e a falta de informação sobre os HVE que acometem esses animais, o objetivo deste estudo foi realizar um levantamento sorológico e detecção molecular dos HVEs em 876 asininos dos estados do Rio Grande do Norte (396), Ceará (341) e Bahia (139). Observou-se que 54,1% dos animais apresentavam anticorpos contra EHV-1, EHV-4 ou EHV-8 e 67,68% possuíam HVE no sangue. Foi constatada pela primeira vez no Brasil a presença das variantes neuropatogênicas (G₂₂₅₄) e não neuropatogênicas (A₂₂₅₄) do EHV-1 e do herpesvírus asinino tipo 5 (AHV-5) em asininos clinicamente saudáveis. Os resultados obtidos sugerem uma alta prevalência de EHV e indicam a circulação do AHV-5 e das variantes de EHV-1 entre os asininos da região Nordeste do Brasil, enfatizando a importância do estabelecimento do diagnóstico e do desenvolvimento de estudos epidemiológicos nessa espécie.

3.2. Introdução

Os herpesvírus equídeos são importantes causas de mortalidade e apresentam grande morbidade em equídeos no mundo todo. Eles pertencem a ordem *Herpesvirales* e a família *Herpesviridae*, que é subdividida em *Alpha-*, *Beta-* e *Gamma-herpesvirinae* (ICTV, 2011). Atualmente são conhecidos 9 herpesvírus que acometem equídeos, seis pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae* (EHV-1, EHV-3, EHV-4, EHV-6, EHV-8 e EHV-9) e três à subfamília *Gammaherpesvirinae* (EHV-2, EHV-5 e EHV-7) (Davison *et al.*, 2009). Os herpesvírus que infectam asininos foram descritos como herpesvírus equídeos (EHV) e asininos (AHV), dois deles pertencem a subfamília *Alphaherpesvirinae* (AHV-1/EHV-6 e AHV-3/EHV-8) e quatro a subfamília *Gammaherpesvirinae* (AHV-2/EHV-7, AHV-4, AHV-5 e AHV-6) (Jerele *et al.*, 2020; Davison *et al.*, 2009).

O EHV-1 é indiscutivelmente um dos herpesvírus mais importantes que afetam equídeos em todo o mundo, podendo causar doenças que variam de rinopneumonite leve a aborto e mieloencefalopatia letal (Patel and Heldens, 2005). Devido à alta similaridade genética

existente entre EHV-1 e - EHV-4, até 1981 foram considerados variantes de um único agente (Studdert *et al.*, 1981), sendo essa alta similaridade genética responsável pela reação cruzada entre esses dois vírus nos testes sorológicos. O EHV-1 já foi descrito na literatura causando doença respiratória e aborto em asininos (Jerele *et al.*, 2020). Acredita-se que quase todas as estirpes de EHV-1 são capazes de causar aborto, no entanto apenas algumas estirpes possuem o potencial de causar doença neurológica (Nugent *et al.*, 2006). Apesar de a maioria dos casos de doenças causadas por EHV-1 serem descritas em equinos, artigos já relataram a quebra das barreiras naturais entre espécies, descrevendo casos de EHV-1 em alpacas, antílopes, lhamas, gazelas e ursos (revisado por Mori *et al.*, 2014).

Em 1983 Allen *et al.* observaram a existência de uma predominância de duas estirpes de EHV-1, denominadas P e B, nos animais estudados. Posteriormente estudos relataram um predomínio da variante P em isolados de EHV-1, relacionados, principalmente, com quadros de aborto (revisado por Mori *et al.*, 2014). Em 2008, Powell *et al.* confirmaram a diminuição da frequência de casos de abortos induzido por EHV-1. Isso pode ter ocorrido devido a pressões biológicas e antigênicas, como a imunidade vacinal, que leva a uma seleção e emergência de novas estirpes virais em detrimento das mais antigas. Em contrastes com a diminuição de casos de abortos, os casos de doença neurológica causadas por EHV-1 aumentaram a partir do ano 2000 (Smith *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos e no Reino Unido, por exemplo (APHIS, 2007), houve aumento de 32 vezes na ocorrência de surtos, e a taxa de letalidade variou entre 20-50% no Canadá, África do Sul, Suíça, Irlanda e outras nações europeias (Slater *et al.*, 2006; Goehring *et al.*, 2006). Nesse mesmo período foi detectado o primeiro caso de doença neurológica causado por EHV-1 em equino no Brasil (Lara *et al.*, 2008). O primeiro relato da detecção de EHV-1 em asininos foi realizado a partir do isolamento do vírus, em tecido de dois potros de seis meses de idade que evoluíram para óbito na Índia (Tewari *et al.*, 1989).

Variações genéticas entre o EHV-1 tipo P e B estão associadas a mutações do gene ORF64 que podem estar ligadas com a neuropatogenicidade do vírus (Pagamjav *et al.*, 2005). Acredita-se também, que a ocorrência de doença neurológica associada a EHV-1 está relacionada a um único polimorfismo de nucleotídeo no gene da polimerase viral (ORF 30), no qual a troca de adenina por guanina na posição 2254 que resulta em uma substituição de asparagina (N) por ácido aspártico (D) na posição 752 (Nugent *et al.*, 2006). Goodman e colaboradores (2007) comprovaram através de um estudo experimental o potencial neuropatogênico de EHV-1 (G₂₂₅₄ / D₇₅₂). Eles sugeriram que a enzima DNA polimerase da

estirpe G₂₂₅₄ / D₇₅₂ que é modificada devido a mutação sofrida, leva a uma maior “agressividade” na replicação viral e na duração da viremia associada a leucócitos (Allen e Breathnach, 2006).

No início do século XXI o genótipo neuropatogênico de EHV-1 foi identificado como agente causador de inúmeros surtos de aborto, doença respiratória e neurológica em diversas regiões do mundo (Negussie *et al.*, 2017; Fortier *et al.*, 2010; Sutton *et al.*, 2019; Fritsche and Borchers, 2011; Garvey *et al.*, 2019; European College of Equine Internal Medicine, 2021; Henninger *et al.*, 2007; Vissani *et al.*, 2009; Perkins *et al.*, 2009; Pusterla *et al.*, 2009; Goehring *et al.*, 2006). A estirpe neuropatogênica de EHV-1 foi identificada em asininos pela primeira vez em 2010 na França, onde causou um quadro de aborto em uma fêmea de asinino (Pronost *et al.*, 2010), e apenas em 2017 houve o primeiro relato de caso de mieloencefalopatia por herpesvirus em um asinino na Etiópia (Negussie *et al.*, 2017). No Brasil a estirpe neuropatogênica de EHV-1 foi identificada pela primeira vez em 2011 por Mori *et al.*, causando problemas neurológicos e até o presente momento, são escassos os estudos com a identificação molecular do vírus (Costa *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2019). Até o nosso conhecimento não existem informações publicadas sobre a presença de EHV-1 (G₂₂₅₄) em asininos no Brasil.

Informações limitadas estão disponíveis sobre os herpesvírus asininos, principalmente sobre os AHV-4 e AHV-6 (Jerele *et al.*, 2020; Câmara *et al.*, 2020). Sabe-se que o AHV-2 é semelhante aos *gamaherpesvírus* EHV-2 e EHV-5 (Fortier *et al.*, 2010), e pode causar doença respiratória e ser isolado de asininos clinicamente saudáveis (Bell *et al.*, 2008). O AHV-3, também conhecido como EHV-8, está relacionado a casos de rinite em asininos (Bell *et al.*, 2008). Recentemente, na Irlanda, um caso de doença neurológica em asinino e dois casos de aborto em éguas foram atribuídos ao EHV-8 (Garvey *et al.*, 2018). Análise filogenética realizada por Ficorilli *et al.* (1995) revelou uma distância evolutiva mais curta entre EHV-8/AHV-3 e EHV-1 do que entre EHV-1 e EHV-4, sugerindo que o AHV-3 pode ser o precursor de EHV-1. A infecção por herpesvírus asinino 5 (AHV-5), foi descrita pela primeira vez em 2002 causando pneumonia intersticial em jumentos de Missouri, EUA (Kleiboeker *et al.*, 2002). Posteriormente foi associada a casos de fibrose nodular equina e pneumonia piogranulomatosa em cavalos na Suécia, Estados Unidos e França (Back *et al.*, 2012; De Witte *et al.*, 2012; Fortier *et al.*, 2009), e foi associada a um caso de doença neurológica relacionada a herpesvírus, no Canadá (Vengust *et al.*, 2008). Porém, também já foi encontrado, em equídeos clinicamente saudáveis, na Áustria e França, o que junto ao baixo número de estudos dificulta a compreensão

da patogenia do vírus (Fortier *et al.*, 2009; Rushton *et al.*, 2014). No Brasil ainda não foi descrito nenhum caso/ocorrência de AHV.

De acordo com a FAO, o Brasil possui o maior rebanho de asininos da América do Sul (FAO, 2019), e mais de 90% dele está albergada na região Nordeste do Brasil (IBGE, 2017). Esses equídeos já possuíram papel essencial na subsistência dos nordestinos, contudo com o advento da tecnologia foram substituídos por máquinas e abandonados, vivendo errantes pelas estradas, servindo como possíveis reservatórios/fontes de doenças para outros equídeos (Carneiro *et al.*, 2018). Considerando o tamanho da população de asininos, a negligência em relação aos aspectos sanitários e a escassez de informações sobre os herpesvírus nesta espécie, este estudo teve por objetivo estimar a soroprevalência, investigar e caracterizar as estirpes de EHV que estão presentes na população de asininos de três estados do nordeste brasileiro.

3.3. Material e métodos

3.3.1. Declaração de ética

A avaliação de risco foi submetida e aprovada pelos comitês de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), nº processo 206/2017 (Anexo 1), e da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) nº processo 23091.010510/2017-75 (Anexo 2).

3.3.2. Área de estudo

O estudo foi realizado na região Nordeste do Brasil, em animais pertencentes a fazendas de recolhimento nos estados do Rio Grande do Norte, Município de Apodi (latitude: -5.64953, longitude: -37.7958), e Ceará, no município de Santa-Quitéria (latitude: -4.33238, longitude: -40.15734), além de uma fazenda com animais tutelados por uma Organização não Governamental no estado e Bahia, no município de Euclides da Cunha (latitude: -10.5061, longitude: -39.0092).

3.3.3. Amostras

Todos os asininos envolvidos neste estudo eram de vida livre, recolhidos pelo poder público (CE e RN) e por uma OnG (BA), das estradas e interiores do RN e CE, e em uma fazenda de abate clandestino no interior da BA. Eles não possuíam histórico clínico, tinham idades variáveis e eram de ambos os sexos. Avaliações clínicas realizadas no momento da coleta

das amostras demonstraram que todos os animais eram clinicamente saudáveis, não apresentavam nenhum sinal evidente de doença respiratória e/ou neurológica.

As amostras de sangue e de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram coletadas por meio de venopunção asséptica da veia jugular, utilizando tubos a vácuo (com e sem anticoagulante) e agulhas individuais, ambos estéreis (Vacuette®, Greiner Bio One, Alemanha) de um total de 876 asininos (396 animais do RN, 341 animais do CE e 139 animais da BA). Para obtenção do soro, os tubos de sangue sem anticoagulante foram centrifugados por dez minutos em centrífuga clínica a 1.900 xg, em seguida foram estocados a -20°C até o momento dos exames laboratoriais. Para obtenção da camada de células mononucleadas (PBMC) os tubos de sangue com anticoagulante foram centrifugados seguindo as mesmas condições usadas para obtenção do soro. O armazenamento foi feito a -20° C, até o momento do processamento das amostras para realização dos exames.

As amostras de asininos do estado do RN foram coletadas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015, e pertencem ao banco de soro do Laboratório de Retrovírus (RetroLab) da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras do CE foram coletadas em outubro de 2019. As amostras da BA foram coletadas em novembro de 2019, e foram gentilmente cedidas ao RetroLab pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Bahia.

3.3.4. Soroneutralização

A detecção de anticorpos contra o EHV-1 foi realizada pela técnica de soroneutralização viral em culturas de linhagem contínua de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK), utilizando-se isolado de EHV-1, previamente caracterizado por Costa et al. (2008).

Resumidamente, os soros testados foram inativados a 56 °C por 30 minutos, antes da realização da técnica. Foi feita uma diluição seriada na base 2, do soro inativado, para um volume final de 50 µL, adicionando-se igual volume de vírus com título de 100 TCID₅₀. Após incubação por 1 hora a 37°C, foram adicionados 50 µL de uma suspensão de células MDBK contendo 38.000 células/mL, com 2% de soro fetal bovino. A leitura foi realizada após 72 horas de incubação a 37° C, em estufa com 5 % de CO₂, segundo metodologia descrita por Kotait et al. (1988).

O título de anticorpos neutralizantes foi definido pelo inverso da maior diluição do soro capaz de inibir 100% do efeito citopático induzido pelo EHV nas células MDBK. O animal foi considerado positivo quando o título do soro foi maior ou igual a 4.

3.3.5. Biologia molecular

Os tubos contendo sangue total foram centrifugados a $4.000 \times g$, a 4°C , por 10 minutos e a camada plasmática leucocitária (“*Buffy Coat*”) foi aliquoteada e armazenadas a -20°C . O DNA total dos materiais aliquoteados da camada leucocitária foi extraído utilizando o Kit de extração Kit GenElute™ Blood Genomic DNA (Sigma-Aldrich™, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA total extraído foi analisado e quantificado por leitura em espectrofotômetro Gene Quant RNA/DNA Calculator (Pharmacia). As amostras que apresentaram concentração muito baixa ou razão entre a $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ menor que 1,7 foram submetidas à nova extração para garantir a pureza e viabilidade do DNA extraído.

3.3.5.1. nPCR para Pan Herpesvírus

As amostras de DNA total foram submetidas à técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) *nested* (nPCR), utilizando iniciadores degenerados (Pan Herpesvirus), tendo como alvo uma região altamente conservada do gene que codifica a DNA polimerase (DPOL) herpesviral (Tabela 9), conforme padronizado por VanDevant (1996).

O nPCR amplifica fragmentos de tamanhos que variam de 215 a 315 pb, conforme espécie herpesviral analisada. Como controle positivo, foi utilizado um isolado de EHV-1 neuropatogênico previamente caracterizado por Costa et al., (2015). Para controle negativo das PCR, o DNA foi substituído por água livre de DNA/RNases (Kasvi, Brasil), um controle negativo foi inserido a cada nove amostras de campo.

Os ensaios de PCR da primeira reação do nPCR foram feitos em um volume de reação final de $25 \mu\text{L}$ contendo 1,25 U de Taq DNA polimerase (GoTaq Polimerase, Promega, EUA), 1X de tampão 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega, EUA), 2 mM de MgCl_2 (Promega, EUA), 200 μM de dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega, EUA), 0,4 μM de cada um dos iniciadores e 3 μL de DNA total. A ciclagem utilizada consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 46°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos e uma etapa de extensão final de 72°C durante 7 minutos. As PCR foram feitas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). Para a segunda reação, a concentração dos

reagentes e ciclagem foram as mesmas descritas para a primeira reação, porém, como *template*, foram utilizados 2 µL do *amplicon* da primeira reação.

Após a amplificação, os produtos obtidos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de 1,5 % de agarose diluído em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5 X (89 mM Tris-borato pH 8.3, 25 mM EDTA) corado com brometo de etídio (concentração de 0,001%), à temperatura ambiente sob voltagem constante (120 V) por aproximadamente 40 minutos e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Foi aplicado 10 µL de cada *amplicon*, homogeneizado com 2 µL de tampão de amostra 5 X (Phoneutria, Brasil). Para determinar o tamanho do produto amplificado foi incluído em cada gel de agarose um marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Kasvi, Brasil).

3.3.5.2. Semi - Nested PCR para EHV-4

As amostras de DNA total positivas na nPCR Pan Herpesvírus, foram submetidas a uma semi-nested PCR para pesquisa de EHV-4, conforme descrito por Varrasso et al., (2001). Esse semi-nested PCR tem como alvo a amplificação de 323 pb do gene que codifica a glicoproteína B (gB) dos EHV-4. As sequências dos iniciadores estão disponíveis na tabela 9.

Como controle positivo, foi utilizado um isolado de EHV-4, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mauricio Resende. Para controle negativo das PCR, o DNA foi substituído por água livre de DNA/RNases (Kasvi, Brasil).

Os ensaios de PCR da primeira reação do nPCR foram feitos em um volume de reação final de 25 µL contendo 1,25 U de Taq DNA polimerase (GoTaq Polimerase, Promega, EUA), 1X de tampão 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega, EUA), 2 mM de MgCl₂ (Promega, EUA), 200 µM de dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega, EUA), 0,4 µM de cada um dos iniciadores e 3 µL de DNA total. A ciclagem utilizada consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos. As PCR foram feitas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). Para a segunda reação, a concentração dos reagentes e ciclagem foram as mesmas descritas para a primeira reação, porém, foram utilizados 2 µL do *amplicon* da primeira reação como *template* na segunda reação.

Após a amplificação, os produtos obtidos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de 1,5 % de agarose 1,5% diluído em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5 X (89 mM Tris-

borato pH 8.3, 25 mM EDTA) corado com brometo de etídio (concentração de 0,001%), à temperatura ambiente sob voltagem constante (120 V) por aproximadamente 40 minutos e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

No gel de agarose foram aplicados 10 µL de cada *amplicon*, homogeneizado com 2 µL de tampão de amostra 5 X (Phoneutria, Brasil). Para determinar o tamanho do produto amplificado foi incluído em cada gel um marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Kasvi, Brasil).

Tabela 9 - Iniciadores e regiões gênicas amplificadas nos testes de PCR utilizados para detecção dos herpesvirus.

Gene alvo	Primers	Sequência 5' – 3'	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
DPOL	1R DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYC C	215 - 315	VanDevanter <i>et al.</i> , 1996
	1R ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYS GCNMTNAA		
	1R KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNAC NCCYTT		
	2R TGV	TGTAACCTCGGTGTAYGGNTT YACNGGNGT		
	2R IYG	CACAGAGTCCGTRTCNC CRT ADAT		
gB	1R 1Fw	CTGCTGTCATTATGCAGGGA	509	Varrasso <i>et al.</i> , 2001
	1R 1Rv	CGTCTTCTCGAAGACGGGTA		
	2R 2Rv	CGCTAGTGTCATCATCGTCG	323	

1R : Iniciadores utilizados na primeira reação da nPCR ou Semi nPCR

2R : Iniciadores utilizados na segunda reação da nPCR ou Semi nPCR

3.3.5.3. PCR em tempo real (qPCR) para EHV-1 neuropatogênica (G₂₂₅₄) e não neuropatogênica (A₂₂₅₄)

Um ensaio de qPCR Taq-Man duplex foi realizado em placas de 96 poços para a discriminação alélica das estirpes com marcador não neuropatogênicas (A₂₂₅₄) e neuropatogênicas (G₂₂₅₄) de EHV-1, utilizando a plataforma QuantStudio 1 system Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os primers e sondas, bem como as condições de reação, foram utilizados conforme descrito por Allen (2007) (Tabela 10). A sonda específica para EHV-1 não neuropatogênico (A₂₂₅₄) foi marcada com o fluoróforo repórter 5' - VIC1 e a sonda específica para EHV-1 neuropatogênico (G₂₂₅₄), com o fluoróforo repórter 5' - FAM1, sendo ambas as sondas marcadas com o inibidor não fluorescente NFQ 5 (*quencher*)

(Integrated DNA Technologies-IDT, EUA). Para cada reação de volume final de 20 µL, 2,5 µL de DNA total foram acrescentados em 10 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix 2x (Promega®, EUA), 30 nM de CXR *Reference Dye*, 0,4 µM de cada iniciador e 0,2 µM de cada sonda. As seguintes condições de termociclagem foram utilizadas: desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguida por 35 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 60 segundos. Os controles negativos foram utilizados em triplicata e a curva padrão de 2 controles positivos (um isolado de EHV-1 neuropatogênico e um isolado de EHV-1 não neuropatogênico, previamente caracterizados) feita a partir de 10 diluições seriadas na base 10 dos dois controles positivos, em duplicata. Antes de iniciar a análise das amostras teste, a validação do ensaio de qPCR de discriminação alélica foi feita a partir da curva padrão dos isolados de EHV-1 de genótipo neuropatogênicos e não neuropatogênicos. Os controles positivos de EHV-1 neuropatogênico e não neuropatogênico, foram gentilmente cedidos pela Profa Dra Erica Azevedo Costa da Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as 457 amostras analisadas foram testadas em duplicata. A análise pós-execução para detecção e identificação do genótipo de DNA de EHV-1 presente em cada amostra de teste foi realizada usando o software de análise de discriminação alélica QuantStudio 1 Firmware (versão 1.0.1).

Tabela 10 - Iniciadores e sondas TaqMan usados no ensaio de PCR em tempo real

Iniciadores/ Sonda Posição no genoma	Sequência 5' – 3'	Referência	
EHV-1 ORF30 Iniciadores			
EHV-1 ORF30 – Fw 2204 - 2218	CCA CCC TGG CGC TCG	Allen, 2007	
EHV-1 ORF30 – Rv 2328 - 2348	AGC CAG TCG CGC AGC AAG ATG		
Sondas TaqMan®			
EHV-1 ORF30 A₂₂₅₄ 2246 - 2261	VIC-CAT CCG TCA* ACT ACT C-MGB†-NFQ‡		
EHV-1 ORF30 G₂₂₅₄ 2248 - 2261	6-FAM-TCC GTC G*AC TAC TC-MGB†-NFQ‡		

*As diferenças nas sequências das sondas são mostradas em negrito; † MGB = 5 ligante menor; ‡ NFQ 5 = inibidor não fluorescente.

3.3.5.4. Sequenciamento

O sequenciamento de nucleotídeos dos amplificadores foi realizado pelo laboratório CT Vacinas (Belo Horizonte, Minas Gerais), utilizando o método Sanger (Sanger *et al.*, 1997). Amostras positivas no PCR Pan herpesvirus e para EHV-1 (G₂₂₅₄ / D₇₅₂), com amplificação de bandas entre 215 a 315 pb, foram extraídas do gel de agarose utilizando-se o kit GenElute™

Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich™), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas em triplicata, em ambas as direções, utilizando os iniciadores específicos (senso e antisenso) da segunda reação (Tabela 1). A qualidade das sequências de nucleotídeos gerados nos eletroferogramas foi avaliada através do Programa FASTQC disponível online na plataforma <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, sendo as edições e montagem de sequências consenso de cada amostra feitas utilizando-se o SeqMan Software 7.1.0 (DNASStar Inc.). Para análise de similaridade, as sequências consenso obtidas de cada amostra foram alinhadas com sequências disponíveis no banco de genomas NCBI (BLAST® - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), com auxílio do programa ClustalW multiple alignment disponível no software MEGA X, versão 10.2.6 (Thompson et al., 1994; Kumar et al., 2018).

3.3.6. Estudo de prevalência

Um estudo de prevalência utilizando o método exato descrito por Collet D. (1999), com intervalo de confiança de 95% foi realizado (Wald, 1943). A fim de comparar o resultado de prevalência foi feito também um estudo de regressão logística múltipla para determinar a associação entre o estado, idade e sexo e a presença de EHV. As análises estatísticas foram realizadas por meio da linguagem de programação R (<https://cran.r-project.org/>).

3.4. Resultados e Discussão

Do total de amostras testadas, 54,1% (474/876) foram soropositivas para EHV-1, EHV-4 ou EHV-8, dentre elas 29,75% (141/474) apresentaram títulos entre 1:16 – 1:256, sendo que 73,05% (103/141) foram do CE. Além de ser o estado com maior número de animais com títulos entre 16 – 256, o CE foi o que apresentou maior positividade 77,42% (264/341), seguido pela BA 70,5% (98/139) e RN, com 28,28% (112/396). Apesar do teste de soroneutralização ter sido realizado para o EHV-1, devido a alta similaridade genética entre este vírus e o EHV-4 e EHV-8 (AHV-3) (Ficorilli *et al.*, 1995), a chance de ter ocorrido reatividade cruzada entre eles não pode ser descartada. Ao analisar as proteínas/glicoproteínas de AHV-3, EHV-1 e -4, Crabb e Sturddet (1990) notaram semelhanças entre os três vírus, constatando extensa reatividade cruzada antigênica entre eles, principalmente entre AHV-3 e EHV-1. Visto isso, as amostras que foram positivas para EHV-1, também podem ser positivas para AHV-3 e EHV-4, principalmente aquelas que apresentaram títulos mais baixos. O teste também não distingue anticorpos vacinais, daqueles induzidos pela infecção natural (Kapoor *et al.*, 2014), contudo os

animais que foram analisados, apesar de não terem um histórico clínico, provavelmente não foram vacinados, pois a vacinação contra herpesvírus equinos não é uma prática comum aos criadores da região.

Outros estudos de soroprevalência realizados, principalmente em equinos, no Brasil mostraram uma ampla distribuição do HVE em todo território e a maioria deles apresentam ocorrências mais baixas do que a observada neste estudo (54,1%), variando de 0 a 45,5% (Aguiar *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2009; Diaz *et al.*, 2015; Diel *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2018; Heinemann *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2003a; Lara *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2000; Sangioni *et al.*, 2011; Lara. *et al.*, 2003b; Muniz *et al.*, 2020; Alencar-Araripe *et al.*, 2014; Pena *et al.*, 2006; Sartori *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2020). Apenas dois estudos realizados em São Paulo e no Rio Grande do Sul apresentaram taxas de soroprevalência maiores que a deste estudo, 67,3% (34/52) e 84,7% (294/348), respectivamente (Vasconcellos., 1997; Vargas and Weiblen, 1991). Até o momento, apenas um estudo realizado em São Paulo pesquisou a ocorrência de HVE em asininos e a taxa encontrada (47% - 40/85) foi elevada quando comparado a maioria dos estudos publicados, porém um pouco mais baixa do que a prevalência aqui detectada (Lara *et al.*, 2017). Uma hipótese levantada é que a diferença de prevalência entre os distintos grupos de asininos, pode ser decorrente ao tipo de manejo aos quais os animais eram submetidos, os animais de São Paulo estavam alocados em propriedades particulares com um mínimo de manejo sanitário, enquanto os animais abordados neste estudo viviam livres sem receber nenhum tipo de manejo sanitário.

Em um estudo sorológico recentemente publicado no estado do RN, com equídeos estabulados não vacinados, obteve-se uma prevalência de 32% (251/778) (Rocha *et al.*, 2020) que é próximo a taxa aqui encontrada (28,28%). No estudo desenvolvido por Rocha et al. (2020), foi encontrada uma correlação positiva entre a presença do HVE e a “ocupação” dos animais (animais de trabalho) e manejo extensivo, ou seja, animais usados na lida do campo e criados no sistema extensivo possuíam 3,63 e 1,79 mais chances de serem positivos para HVE, respectivamente. Apesar dos asininos do presente estudo não pertencerem a uma propriedade, antes de serem abandonados eles, provavelmente, eram utilizados como animais de serviço e recebiam manejo parecido com o descrito por Rocha et al. (2020). Em outro estudo realizado em equinos de vaquejada, da mesma região, foi encontrada uma prevalência de 19,2% (22/114) (Ferreira *et al.*, 2018); essa menor taxa pode estar relacionada ao fato de que animais envolvidos na prática de esportes possuem um valor zootécnico mais elevado quando comparados a

animais de trabalho, e por isso estão, na maioria das vezes, sob melhores cuidados e manejo sanitário.

A prevalência do EHV encontrada em equinos de vaquejada no CE foi de 41,2% (28/68) (Alencar-Araripe *et al.*, 2014), maior do que a encontrada por Ferreira e colaboradores (2018) em equinos que possuem as mesmas características de manejo. Observamos neste estudo uma correlação parecida entre asininos do CE (77,42% - 264/341) e do RN (28,28% - 112/396), onde a soroprevalência para EHV no CE é 2,7 vezes maior para asininos e 2,3 vezes para equinos de vaquejada quando comparadas com as taxas do RN. No presente estudo os asininos do estado da BA apresentaram uma prevalência de 70,5% (98/139), próxima a encontrada no estado do CE, bem como as já descritas em equinos dos estados de São Paulo (Vasconcellos, 1997) e Rio Grande do Sul (Vargas and Weiblen, 1991). Utilizando a regressão logística para identificar a chance relativa de estar positivo para HVE dado o estado onde foi realizada a coleta, no RN a chance de encontrar um animal positivo para HVE é 0,6 (0,51 – 0,69) vezes menor quando comparado com CE e BA, enquanto na BA e no CE a chance de encontrar um animal positivo para HVE é de 2,4 (1,67 – 3,48) e 3,43 (2,67 – 4,45) vezes maior, quando comparado com CE e RN, e BA e RN, respectivamente. Os resultados da regressão logística para idade e sexo não apresentaram significância estatística.

A presença de EHV em PBMC, foi pesquisada utilizando a nPCR para Pan Herpesvírus de 786 amostras, sendo 301 amostras do RN (devido a problemas no armazenamento durante o transporte, 95 amostras não estavam viáveis para análise molecular), 346 amostras do CE e 139 amostras da BA. Foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram banda na altura de 215 e 315pb (Figura 2). A prevalência total encontrada foi de 67,68% (532/786). Os estados do CE e da BA apresentaram maior prevalência 96,24% (333/346) e 92,8% (129/139), respectivamente; enquanto o RN apresentou uma prevalência de 23,36% (70/301). No entanto, a prevalência do teste molecular ainda foi maior, isso ocorre, pois, os iniciadores da nPCR foram desenhados baseados no gene da DNA polimerase, que é um gene muito conservado em toda família *Herpesviridae* (VanDevanter *et al.*, 1996), isso permite que todos os membros da família sejam identificados por meio dessa técnica, enquanto na sorologia apenas animais que tiveram contato com EHV-1, - EHV-4 e AHV-3 são identificados (Crabb and Studdert, 1990).

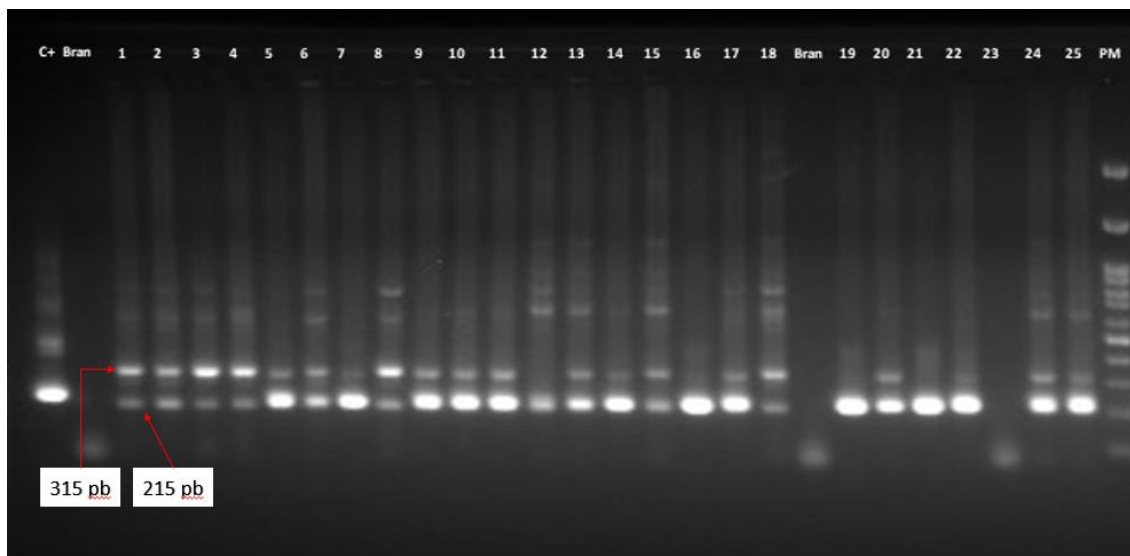


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene DPOL dos Herpesvírus, em altura equivalente a 215 e/ou 315 pb, de DNA extraído de PBMC. Canaleta PM: marcador de tamanho molecular (100pb, Kasvi); canaletas numeradas: amostras positivas (exceto a 23, cujo a amostra é negativa); canaleta C+: controle positivo; canaletas Bran: controle do mix.

Dentre as 532 amostras consideradas positivas na nPCR de Pan Herpesvírus, quatro amostras de diferentes animais foram selecionadas e enviadas para sequenciamento (duas na altura de 315 pb e duas na altura de 215 pb). Duas sequências derivadas das bandas de 215 pb, alinharam com grau de identidade entre 90 – 100% e pontuação máxima (PM) entre 102 – 97, com os isolados de AHV-5 do Canadá e da Áustria, e com 99% de identidade entre elas (Figura 3). Com base nos alinhamentos dessas sequências também constatamos que, os vírus equus zebra gammaherpesvirus (ZHV), *wild ass herpesvirus* (WAHV), EHV-5, EHV-2 e EHV-7 estão intimamente relacionados com nossas estirpes de AHV-5 assim como visto por Kleiboeker *et al.* (2002) e Rusthton *et al.* (2014), porém mesmo com um grau de identidade considerável (99-39%) apresentavam pontuações máximas (< 89) mais baixas quando comparadas aos resultados dos alinhamentos com as sequências de AHV-5 (Figura 4). As duas sequências obtidas a partir das bandas de 315 pb não alinharam com nenhuma sequência de herpesvírus disponível no GenBank, sendo um provável resultado inespecífico.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110
Ref. AHV-5 CGAGGGCTACCAAGGGGGCCACGGGTCA TAGACCCCGTCCCGGGCTTCTACAAACACCCCGTGTGGTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCCCAACATCATCCAGGCCCHCAACC
Sample 1   G.CC...CC..CA.....T..C.GCGAG.....C.G..T.TA..TA.CGCT....C.CT....A..CT..T.C.....GG.A.GT...GGT.
Sample 2   .....C.GCGAG.....C.G..T.TA..TA.CGCT....C.CT....A..CT..T.C.....GA.A.GT...GG--

```

Figura 3 - Alinhamento de ácido nucleico das duas sequências de AHV-5 obtidas por nested PCR com uma estirpe de referência AHV-5 (número de acesso do GenBank FJ798319). Apenas nucleotídeos que diferem dessas sequências de EHV5 são mostrados. Bases idênticas são mostradas por um “.” E as lacunas são mostradas por um “-”. Observe uma única variação de nucleotídeos entre as duas amostras de campo.

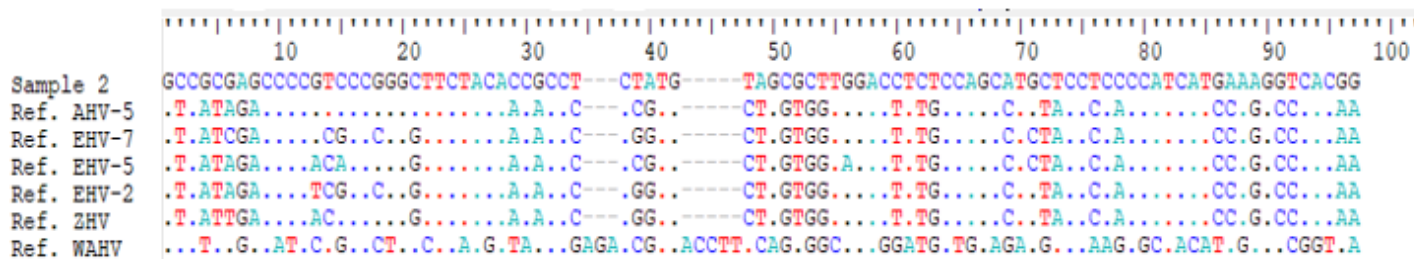


Figura 4 - Alinhamento de ácido nucleico da amostra de 97 pb obtida neste estudo: referência *asinine herpesvirus* (AHV) -5 (número de acesso FJ798319); *equus zebra gammaherpesvirus* (ZHV) (número de acesso AY495965.2); *wild ass herpesvirus* (WAHV) (número de acesso AF141888.1); *equine herpesvirus* (EHV) -7 (número de acesso EU165547); EHV-5 (número de acesso JX125459); e estirpes EHV-2 (número de acesso HQ247790). Apenas nucleotídeos que diferem dessas sequências de EHV5 são mostrados. Bases idênticas são mostradas por um “.” E as lacunas são mostradas por um “-”.

Este é o primeiro estudo a relatar, no Brasil, a detecção de AHV-5 em equídeos. Os resultados desta pesquisa apoiam achados anteriores descritos na França e Áustria por Fortier *et al.* (2009) e Rushton *et al.* (2014), respectivamente, que mostraram que o AHV-5 pode ser encontrado em equinos clinicamente saudáveis. Assim como os achados de Rushton *et al.* (2014), nossos resultados também indicam que o vírus pode ser detectado em material de amostra não respiratória, sugerindo que o AHV-5 segue um padrão de infecção e latência semelhante ao dos EHV-5 e EHV-2. Kleiboeker *et al.* (2004) sequenciaram um fragmento do gene da DNA polimerase de gammaherpesvírus equinos e mostraram que AHV-4, AHV--5, AHV--6 e EHV-2, EHV--5 são geneticamente semelhantes. Contudo esse resultado deve ser analisado com cautela, pois a sequência mais longa de AHV-5 disponível no GenBank possui apenas 881pb. Logo, é possível que AHV-5 seja uma estirpe de EHV-5, e tenha recebido sua nomenclatura com base nas diferenças desta curta sequência genética (Bell *et al.*, 2008; Fortier *et al.*, 2009; Rushton *et al.*, 2014). O isolamento deste patógeno em cultivo celular se faz necessário para melhor elucidar estes questionamentos.

Todas as amostras que apresentaram banda na nPCR para Pan Herpesvírus foram submetidas a semi-nested PCR para EHV-4, mas nenhuma das amostras foi positiva para esse vírus. Esse resultado já era esperado, pois as células mononucleares do sangue periférico não

são um local de latência biologicamente relevante para o EHV-4 (Ma et al., 2013). Um total de 457 amostras foram testadas com a técnica de qPCR para investigar a presença de EHV-1 neuropatogênico (G₂₂₅₄) e não neuropatogênico (A₂₂₅₄). Das 457 amostras 10 (2,19%) foram positivas para estirpe G₂₂₅₄, nenhuma amostra foi positiva para estirpe A₂₂₅₄. Estudos demonstraram que a técnica de PCR quantitativo desenvolvida por Allen (2007), apesar de ser muito específica, apresenta sensibilidade baixa para amostras de campo, podendo apresentar falsos negativos (Balasuriya *et al.*, 2015), logo é possível que a positividade para este vírus seja maior.

Uma amostra dentre as 10 positivas, foi selecionada de forma aleatória e enviada para sequenciamento. Como resultado do sequenciamento obtivemos uma sequência de 174pb de comprimento, a análise realizada através do BLASTn revelou que a sequência alinhou com 93,7% de identidade com EHV-1. Ao submeter a mesma sequência ao BLASTx, para análise de aminoácidos, foi encontrado um percentual de identidade de 97,8% com a região de DNA polimerase de EHV-1. A sequência de aminoácidos obtida foi alinhada com as sequências de aminoácidos da ORF30 das estirpes Ab4 (AY665713) e V592 (AY464052), referências para as estirpes neuropatogênica, (G₂₂₅₄ / D₇₅₂) e não neuropatogênica (A₂₂₅₄/N₇₅₂), respectivamente. Assim, classificamos nossa sequência como correspondente a estirpe neuropatogênica de EHV-1 (Figura 5). Além da mutação na posição 752, observamos mais uma mutação não sinônima da posição 756. Dados publicados por Smith *et al.* (2010) comprovam que o EHV-1 com genótipo neuropatogênico existe desde a década de 1950 e a incidência desses isolados aumenta exponencialmente a cada ano, levando a um risco crescente de surtos de doença neurológica por herpesvírus equino em todas as regiões onde esse vírus é identificado.

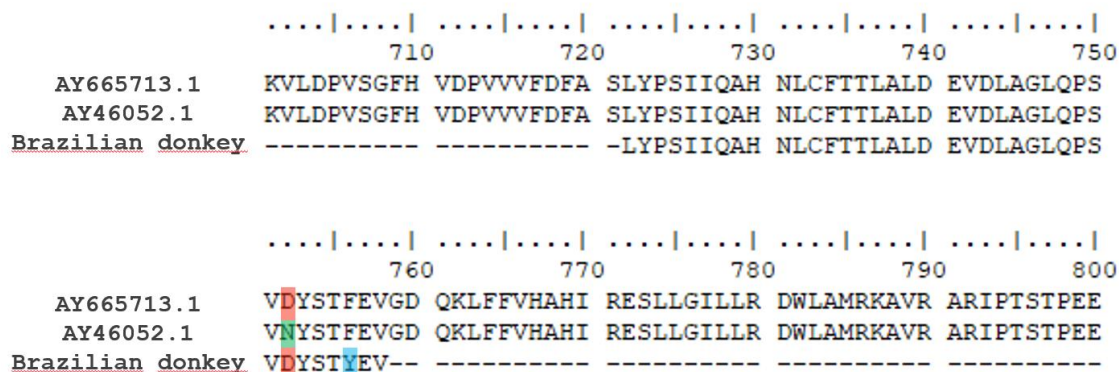


Figura 5 - Alinhamento de sequências parciais de aminoácidos do gene ORF30 de EHV-1 do isolado de campo Brazilian donkey com a estirpe AB4 (número Genbank AY665713.1), estirpe neuropatogênica de referência e referência V592 (número do GenBank AY46052.1).

Os herpesvírus podem sobreviver e persistir nos animais em latência ao longo de sua vida, com a replicação e a eliminação do vírus periodicamente reativadas (De Witte *et al.*, 2012). O estresse causado pela escassez de alimento, água, excesso de calor e outras situações adversas do ambiente, podem criar um potencial aumento da reativação e transmissão viral (Goodrich *et al.*, 2020). Como no caso do EHV-1 G₂₂₅₄ a vacina não é capaz de conter surtos dessa variante, a identificação precoce de casos é a principal maneira de se evitar surtos.

3.5. Conclusões

Esta é a primeira vez que a estirpe neuropatogênica de EHV-1 e o AHV-5 são identificados em asininos clinicamente saudáveis no Brasil. A alta soroprevalência para HVEs é um dado preocupante, visto que esses patógenos podem levar a prejuízos econômicos. Também não podemos ignorar a importância do EHV-1 neuropatogênico como agente causador de doença no Brasil. Apesar de não termos nenhum surto registrado atualmente, a indicação da presença desse vírus em uma região é um sinal de alerta, visto que essa estirpe é refratária a vacina e em condições propícias pode gerar grandes prejuízos a equideocultura nacional. São necessários mais estudos para que possamos entender melhor a patogenia dessas doenças em asininos e o papel dessa espécie na manutenção desses vírus nos plantéis e com isso possamos elaborar medidas de prevenção e controle mais eficientes para prevenir a propagação desses patógenos virais.

3.6. Referências

- Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Lara, M. do C.C. de S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Okuda, L.H., de Stéfano, E., Nassar, A.F. de C., Souza, G.O., Vasconcellos, S.A., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Gennari, S.M. (2008) Seroprevalence of viral and bacterial agents in equids from Monte Negro municipality, State of Rondônia. Brazilian Western Amazon. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **45**(4), 269–276.
- Alencar-Araripe, M., Castelo-Branco de Souza Collares Maia, D., Campello, C., Júnior, A., Silva, M., Dias, A., Medeiros, C., Pinheiro, D. (2014) Evidências sorológicas de EHV-1 / EHV-4 em cavalos de vaquejada no estado do Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. **8**(2), 203-217–217.
- Allen, G.P. (2006) Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **229**(4), 561–561.
- Allen, G.P. (2007) Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **19**(1), 69–72.

4.

Allen, G. P., & Breathnach, C. C. (2006). Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine veterinary journal*, **38**(3), 252-257.

APHIS, USDA. (2007). Equine herpesvirus Myeloencephalopathy: a potentially emerging disease. *Vet. Serv. Info Sheet*.

Arbuckle, J.H., Medveczky, M.M., Luka, J., Hadley, S.H., Luegmayer, A., Ablashi, D., Lund, T.C., Tolar, J., De Meirleir, K., Montoya, J.G., Komaroff, A.L., Ambros, P.F., Medveczky, P.G. (2010) The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(12), 5563–5568.

Back, H., Kendall, A., Grandón, R., Ullman, K., Treiberg-Berndtsson, L., Ståhl, K., Pringle, J. (2012) Equine multinodular pulmonary fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: a case report. *Acta veterinaria Scandinavica*. **54**(1), 57.

Balasuriya, U.B.R., Crossley, B.M., Timoney, P.J. (2015) A review of traditional and contemporary assays for direct and indirect detection of Equid herpesvirus 1 in clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **27**(6), 673–687.

Bell, S.A., Pusterla, N., Balasuriya, U.B.R., Mapes, S.M., Nyberg, N.L., MacLachlan, N.J. (2008) Isolation of a gammaherpesvirus similar to asinine herpesvirus-2 (AHV-2) from a mule and a survey of mules and donkeys for AHV-2 infection by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. **130**(1–2), 176–183.

Biegeleisen, K., and M. G. Rush. 1976. Association of herpes simplex virus type 1 DNA with host chromosomal DNA during productive infection. *Virology* 69:246–257.

Biegeleisen, K., K. Yanagi, and M. G. Rush. 1977. Further studies on the association of herpes simplex virus type 1 DNA with host DNA during productive infection. *Virology* 83:221–225.

Câmara, R.J.F., Bueno, B.L., Resende, C.F., Balasuriya, U.B.R., Sakamoto, S.M., Reis, J.K.P. dos (2020) Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules. *Animals*. **10**(12), 2203.

Carneiro, G.F., Cavalcante Lucena, J.E., de Oliveira Barros, L. (2018) The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. *Journal of Equine Veterinary Science*. **65**, 106–110.

Costa, E.A., Rosa, R., Oliveira, T.S., Assis, A.C., Paixão, T.A., Santos, R.L. (2015) Molecular characterization of neuropathogenic equine herpesvirus 1 Brazilian isolates. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **67**(4), 1183–1187.

Crabb, B.S., Studdert, M.J. (1990) Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: Antibody response of the natural hosts. *Journal of General Virology*. **71**(9), 2033–2041.

Cunha, E.M.S., Ferrari, C.I. de L., Lara, M. do C.C.S.H., da Silva, L.H.Q. (2002) Presença de anticorpos contra o herpesvírus equino 1 (HVE-1) em equinos do noroeste do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*. **69**(1), 1–5.

Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Nassar, A.F.C., Lara, M.C.C.S.H., Peres, N.F., Palazzo, J.P.C., Silva, A., De Stefano, E., Pino, F.A. (2009). *Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do estado de São Paulo*.

Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E. (2009) The order Herpesvirales. *Archives of Virology*. **154**(1), 171–177.

Delecluse, H.J., Hammerschmidt, W. (1993) Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *Journal of Virology*. **67**(1).

Diaz, K.A.F., De Oliveira Hübner, S., Vargas, G.D. ávil., Fischer, G., Lilenbaum, W., De Lima, M. (2015) Ocorrência de anticorpos contra o herpesvírus equino e vírus da arterite equina em rebanhos equinos do estado do rio de janeiro. *Ciencia Animal Brasileira*. **16**(3), 410–418.

Diel, D.G., De Almeida, S.R., Weiblen, R., Frandoloso, R., Anziliero, D., Kreutz, L.C., Groff, F.H.S., Flores, E.F. (2006) Prevalence of antibodies to influenza virus, viral arteritis and herpesvirus in horses of the Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ciencia Rural*. **36**(5), 1467–1473.

FAO, F. and A.O. of the U.N. (2019) FAOSTAT. *Live Animals*. [online]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> [Accessed May 11, 2020].

Ferreira, H.I.P., Calabuig, C., Borges, P.A.C., De Medeiros Oliveira, I.V.P., De Carvalho Freire, D.A., Villalobos, E.M.C., De Souza Hunold Lara, M. do C.C., Pituco, E.M., De Campos Nogueira Romaldini, A.H., Cunha, E.M.S., De Stefano, E., Azevedo de Paula Antunes, J.M. (2018) Seroprevalence of viral agents in vaquejada horses. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*. **40**(1), 54218.

Ficorilli, N., Studdert, M.J., Crabb, B.S. (1995) *The nucleotide sequence of asinine herpesvirus 3 glycoprotein G indicates that the donkey virus is closely related to equine herpesvirus 1 Brief Report*.

Fields, B.N. (2013) *Fields Virology*. Sixth Edit. D. M. Knipe & P. M. Howley, eds. Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer.

Fortier, G., van Erck, E., Fortier, C., Richard, E., Pottier, D., Pronost, S., Miszczak, F., Thiry, E., Lekeux, P. (2009) Herpesviruses in respiratory liquids of horses: Putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Veterinary Microbiology*. **139**(1–2), 34–41.

Fortier, G., van Erck, E., Pronost, S., Lekeux, P., Thiry, E. (2010) Equine gammaherpesviruses: Pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *Veterinary Journal*. **186**(2),

148–156.

Fritsche, A.K., Borchers, K. (2011) Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Veterinary Microbiology*. **147**(1–2), 176–180.

Garvey, M., Lyons, R., Hector, R.D., Walsh, C., Arkins, S., Cullinane, A. (2019) Molecular characterisation of equine herpesvirus 1 isolates from cases of abortion, respiratory and neurological disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens*. **8**(1), 7.

Garvey, M., Suárez, N.M., Kerr, K., Hector, R., Moloney-Quinn, L., Arkins, S., Davison, A.J., Cullinane, A. (2018) Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. *PLoS ONE*. **13**(2).

Goehring, L.S., Winden, S.C., Maanen, C., Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S. (2006) Equine Herpesvirus Type 1-Associated Myeloencephalopathy in The Netherlands: A Four-Year Retrospective Study (1999–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **20**(3), 601–607.

Goodman, L.B., Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palù, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N. (2007) A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathogens*. **3**(11), 1583–1592.

Goodrich, E.L., McLean, A., Guarino, C. (2020) A Pilot Serosurvey for Selected Pathogens in Feral Donkeys (*Equus asinus*). *Animals*. **10**(10), 1796.

Heinemann, M.B., Cortez, A., Souza, M. do C.C. de, Gotti, T., Ferreira, F., Homem, V.S.F., Ferreira Neto, J.S., Soares, R.M., Sakamoto, S.M., Cunha, E.M.S., Richtzenhain, L.J. (2002) Soroprevalência da anemia infecciosa equina, da arterite viral dos equinos e do aborto viral equino no município de Uruará, PA, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **39**(1), 50–53.

Henninger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W., Sofaly, C. (2007) Outbreak of Neurologic Disease Caused by Equine Herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **21**(1), 157–165.

Horie, M., Tomonaga, K. (2011) Non-retroviral fossils in vertebrate genomes. *Viruses*. **3**(10), 1836–1848.

IBGE: Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia (2017) IBGE | Resultados do Censo Agro 2017. [online]. Available from: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75642 [Accessed March 9, 2021].

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2011) Herpesviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses. [online]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae [Accessed May 11, 2020].

Jerele, S., Davis, E., Mapes, S., Pusterla, N., Navas González, F.J., Iglesias Pastrana, C., Abdelfattah, E.M., McLean, A. (2020) Survey of Serum Amyloid A and Bacterial and Viral Frequency Using qPCR Levels in Recently Captured Feral Donkeys from Death Valley National Park (California). *Animals*. **10**(6), 1086.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*. **8**(3), 275–282.

Kapoor, S., Sharma, H., Singh, M., Ranjan, K., Patel, S.V., Kumar, P., Kumari, A., Khirbat, R. (2014) Equine Herpesviruses: a Brief Review Review Article.

Kleiboeker, S.B., Schommer, S.K., Johnson, P.J., Ehlers, B., Turnquist, S.E., Boucher, M., Kreeger, J.M. (2002) Association of two newly recognized herpesviruses with interstitial pneumonia in donkeys (*Equus asinus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **14**(4), 273–280.

Kleiboeker, S.B., Turnquist, S.E., Johnson, P.J., Kreeger, J.M. (2004) Detection and nucleotide sequencing of a DNA-packaging protein gene of equine gammaherpesviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **16**(1), 67–74.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: análise de genética evolutiva molecular em plataformas de computação. *Molecular biology and evolution*, **35** (6), 1547.

Lara, M.C.C.S.H., Barros Filho, I., Viana, F., Gregory, L., Cunha, E.M.S., Castro, A.F., ... & Fernandes, W.R. (2003). Pesquisa de anticorpos contra o vírus da arterite dos eqüinos (VAE) e herpes eqüino tipo 1 (HVE-1), em cavalos criados em Curitiba, PR. *A Hora Veterinária*, **23**(135), 51-53.

Lara, M., Cunha, E.M.S., Ferrari, C.I.L., Gregory, L., Castro, A.F., Silva, L.H.Q., ... & Birgel, E.H. (2003). Ocorrência de anticorpos contra o vírus da arterite dos equinos em cavalos criados na região de Araçatuba, SP. *Veterinária Notícias*, **9**(2), 69-73.

Lara, M.C.C.S., Furman, K.E., Barros Filho, I.R., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Deconto, I., Bonacim, J., Utime, R.A., Biondo, A.W. (2006) detection of antibodies against equine viral arteritis virus (EVAV) and equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in cart horses from Curitiba and surroundings, southern Brazil. *Archives of Veterinary Scienc*, 11–14.

Lara, M. D. C. C. D. S. H., Cunha, E. M. S., Villalobos, E. M. C., Nassar, A. F. D. C., Asano, K. M., Fernandes, W. R., ... & Mori, E. (2008). First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*.

Lara, M.C.C.S.H., Torelli, C.S., Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Cunha, M.S., Bello, A.C.P.P., Cunha, A.P., Reis, J.K.P., Leite, R.C., Mori, E. (2010) Serological survey of equine herpesvirus infection in Minas Gerais state. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **47**(5), 352–356.

Lara, M.C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Oliveira, J.V., Nassar, A.F.C., Silva,

- L.M.P., Okuda, L.H., Romaldini, A.H. de C.N., Cunha, M.S., Marques, E.C., Mori, E. (2017) Occurrence of viral diseases in donkeys (*Equus asinus*) in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **54**(2), 154.
- Ma, G., Azab, W., & Osterrieder, N. (2013). Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)—masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. *Veterinary microbiology*, *167*(1-2), 123-134.
- Moore, D. F., and D. T. Kingsbury. 1980. Integration and transcription of virus DNA in herpes simplex virus transformed cell lines. *J. Gen. Virol.* **48**:123–133
- Moreira, N., Weiss, R.R., Krüger, E.R. (2000) Frequência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus eqüino tipo 1. *Scientia Agraria*. **1**(1), 9.
- Mori, E., Borges, A. S., Delfiol, D. J. Z., Oliveira Filho, J. P. D., Goncalves, R. C., Cagnini, D. Q., ... & Richtzenhain, L. J. (2011). First detection of the equine herpesvirus 1 neuropathogenic variant in Brazil. *Revue Scientifique et Technique-OIE*, **30**(3), 949.
- Mori, E., Mori, C. M. C., & Maiorka, P. C. (2014). Herpesvírus equino tipo 1: revisão de literatura. *Revista CFMV*, **20**(61), 65-72.
- Morissette, G., & Flamand, L. (2010). Herpesviruses and chromosomal integration. *Journal of virology*, *84*(23), 12100-12109.
- Muniz, T.D.P.T.P., Do Carmo Custódio De Souza Hunold Lara, M., Villalobos, E.M.C., Pinheiro, J.W., De Oliveira, E.R.G., Carneiro, G.F. (2020) Sero-epidemiological and reproductive survey for alphaherpesvirus infections in horses in the state of Pernambuco, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. **41**(3), 1079–1086.
- Negussie, H., Gizaw, D., Tessema, T.S., Nauwynck, H.J. (2017) Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy, an Emerging Threat of Working Equids in Ethiopia. *Transboundary and Emerging Diseases*. **64**(2), 389–397.
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N. (2006) Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of Virology*. **80**(8), 4047–4060.
- Padgett, R. A., D. F. Moore, and D. T. Kingsbury. 1978. Herpes simplex virus nucleic acid synthesis following infection of non-permissive XC cells. *J. Gen. Virol.* **40**:605–614.
- Pagamjav, O., Sakata, T., Matsumura, T., Yamaguchi, T., & Fukushi, H. (2005). Natural recombinant between equine herpesviruses 1 and 4 in the ICP4 gene. *Microbiology and immunology*, **49**(2), 167-179.
- Patel, J.R., Heldens, J. (2005) Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) - Epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Veterinary Journal*. **170**(1), 14–23.

Pena, L.J., Pena, D.A., Barrios, P.R., Dale, R., Lamêgo, M.R. de A., Moraes, M.P. (2006) Seroepidemiological survey of infection of equine infectious anemia, equine influenza type 2 and equine herpesvirus type 1 in herds of south Pará State, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **43**(4), 537–542.

Perkins, G.A., Goodman, L.B., Tsujimura, K., Van de Walle, G.R., Kim, S.G., Dubovi, E.J., Osterrieder, N. (2009) Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984-2007). *Veterinary Microbiology*. **139**(3–4), 375–378.

Powell, D. (2008). Equine herpesvirus abortions. *Equine Dis Quart*, 2, 2.

Pronost, S., Léon, A., Legrand, L., Fortier, C., Mischczak, F., Freymuth, F., & Fortier, G. (2010). Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Veterinary microbiology*, **145**(3-4), 329-333.

Pusterla, N., Wilson, W.D., Mapes, S., Finno, C., Isbell, D., Arthur, R.M., Ferraro, G.L. (2009) Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Veterinary Journal*. **179**(2), 230–239.

Robinson, R. A., and D. J. O’Callaghan. 1983. A specific viral DNA sequence is stably integrated in herpesvirus oncogenically transformed cells. *Cell* 32:569–578.

Rocha, L.L.L., Diniz, D.D.M., de Jesus, T.K.S., Júnior, J.W.P., Villalobos, E.M.C., de Souza Hunold Lara, M. do C.C., Rizzo, H. (2020) Occurrence of antibodies against herpesvirus and arteritis virus in equines from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*. **48**(0), 1748.

Rushton, J.O., Kolodziejek, J., Nell, B., Nowotny, N. (2014) Prevalence of asinine herpesvirus type 5 (AsHV-5) infection in clinically normal Lipizzaner horses. *Veterinary Journal*. **200**(1), 200–203.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. **4**(4), 406–425.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1997) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Sangioni, L.A., de Avila Botton, S., Cargnelutti, J.F., Cadore, G.C., Cezar, A.S., Weiblen, R., Lopes, S.T.A., Vogel, F.S.F. (2011) Pesquisa de anticorpos anti-neospora spp. E anti-herpesvírus equino em cavalos de tração no município de santa maria, rs, brasil. *Ciencia Rural*. **41**(2), 321–323.

Sartori, L., Lara, M. do C.C. de S.H., Villalobos, E.M.C., Lisbôa, J.A.N. (2016) Prevalência de anticorpos contra o vírus da arterite equina nas mesorregiões Noroeste, Centro Ocidental e Norte Central do Paraná. *Arquivos do Instituto Biológico*. **83**(0).

- Silva, P.E., Riet-Correa, F., Coelho, A.C.B., Echenique, J.V.Z., Pereira, C.M., de Lima, M., Diel, D.G., Schild, A.L. (2019) Identification of equine herpesvirus type 1 as cause of abortion in mares in Southern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. **71**(4), 1421–1424.
- Slater, J. D., Lunn, D. P., Horohov, D. W., Antczak, D. F., Babiuk, L., Breathnach, C., ... & Wilson, W. D. (2006). Report of the equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Veterinary immunology and immunopathology*, **111**(1-2), 3-13.
- Smith, K.L., Allen, G.P., Branscum, A.J., Frank Cook, R., Vickers, M.L., Timoney, P.J., Balasuriya, U.B.R. (2010) The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Veterinary Microbiology*. **141**(1–2), 5–11.
- Sullivan, D. C., S. S. Atherton, G. B. Caughman, J. Staczek, and D. J. O’Callaghan. 1986. Oncogenic transformation of primary hamster embryo cells by equine herpesvirus type 3. *Virus Res*. 5:201–212.
- Sutton, Garvey, Cullinane, Jourdan, Fortier, Moreau, Foursin, Gryspeerdt, Maisonnier, Marcillaud-Pitel, Legrand, Paillot, Pronost (2019) Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses*. **11**(10), 916.
- Staczek, J., Wharton, J. H., Dauenhauer, S. A., & O’Callaghan, D. J. (1984). Coestablishment of persistent infection and oncogenic transformation of hamster embryo cells by equine cytomegalovirus. *Virology*, **132**(2), 339-351.
- Studdert, M. J., Simpson, T., & Roizman, B. (1981). Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, **214**(4520), 562-564.
- Tewari, S. C., Sharma, P. C., Prasad, S., & Kaura, Y. K. (1989). Equine herpesvirus 1 and neonatal foal mortality in northern India. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **8**, 103.
- VanDevanter, D.R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M. (1996) Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**(7).
- Vargas, A.C., Weiblen, R. (1991) Prevalência de anticorpos contra herpesvírus equino tipo 1 (HVE 1) em equinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. *Hora vet*, 5–8.
- Varrasso, A., Dynon, K., Ficorilli, N., Hartley, C.A., Studdert, M.J., Drummer, H.E. (2001) Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal*. **79**(8), 563–569.
- Vasconcellos, L.A.S., (1997) Correlação entre abortamento equino e os níveis de anticorpos fixadores de complemento contra Herpesvírus Equino tipo-1 em éguas criadas no Estado de

São Paulo. *Ars Veterinaria*. **13**(1), 52–58.

Vengust, M., Wen, X., Bienzle, D. (2008) Herpesvirus-associated neurological disease in a donkey. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* **20**(6), 820–3.

Vissani, M.A., Becerra, M.L., Olguín Perglione, C., Tordoya, M.S., Miño, S., Barrandeguy, M. (2009) Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Veterinary Microbiology*. **139**(3–4), 361–364.

De Witte, F.G., Frank, N., Wilkes, R.P., Novak, J.M. (2012) Association of Asinine Herpesvirus-5 with Pyogranulomatous Pneumonia in a Mare. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **26**(4), 1064–1068.

World Organization For Animal Health (OIE) (2018) Equine rhinopneumonitis (infection with equid herpesvirus-1 and -4). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. pp. 1320–1332.

Yanagi, K., M. G. Rush, and K. Biegeleisen. 1979. Integration of herpes simplex virus type 1 DNA into the DNA of growth-arrested BHK-21 cells. *J. Gen. Virol.* 44:657–667.

CAPÍTULO 4

Soroprevalência dos vírus da encefalite equina leste, oeste e venezuelana em asininos (*Equus asinus*) da região Nordeste do Brasil

4.1. Resumo

Um total de 859 asininos semisselvagens da região Nordeste do Brasil foram sorologicamente testados para a presença do *Eastern equine encephalitis vírus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV) e do *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). Em 29 (3,37%) amostras foram detectados a presença de anticorpos contra o EEEV e duas amostras (0,23%) foram soropositivas para o WEEV. Nenhum dos animais testados foi positivo para VEEV. Este é o primeiro estudo de soroprevalência das encefalomyelites equinas virais em asininos do continente americano. Nossos dados fornecem evidências sorológicas da circulação de EEEV e WEEV em asininos da região Nordeste do Brasil, alertando para uma possível negligência dessas doenças no sistema público de saúde. Sugerimos a expansão das pesquisas epidemiológicas na região nordeste, o uso dos equídeos como animais sentinela, incorporando pesquisas sorológicas na vigilância de rotina para assim ajudar a identificar focos da atividade de arbovírus e estabelecer medidas sanitárias públicas eficientes.

4.2. Introdução

As encefalites virais são as infecções mais comuns do sistema nervoso central (SNC) em equídeos de todo o mundo e, com grande importância na saúde pública, por desenvolver infecções zoonóticas com sintomatologia neurológica também nos seres humanos (Stromberg *et al.*, 2020). Os principais agentes etiológicos dessas enfermidades são do gênero *Alphavirus* pertencentes à família *Togaviridae*, dentre os quais se destacam o *Eastern equine encephalitis vírus* (EEEV), o *Western equine encephalitis vírus* (WEEV) e o *Venezuelan equine encephalitis vírus* (VEEV), que são frequentemente mantidos em um ciclo enzoótico entre mosquitos ornitofílicos e aves (EEEV e WEEV) ou roedores (VEEV), os principais hospedeiros amplificadores. Todavia, equídeos e humanos podem ser acidentalmente infectados, porém não desenvolvem uma viremia suficiente para infectar novos mosquitos e perpetuar o ciclo de transmissão, sendo considerados hospedeirofinais, exceto para VEEV, que nos equídeos desenvolvem altos títulos de viremia e podem atuar como fonte de infecção para subsequente alimentação dos mosquitos vetores (Go *et al.*, 2014; Spickler, 2017).

O EEEV e o WEEV foram relatados em vários países nas Américas, enquanto o VEEV parece estar limitado às Américas do Sul e Central (Spickler, 2017; OIE, 2019). No Brasil as encefalomyelites virais são consideradas de ocorrência esporádica na maioria dos estados. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), entre os anos de 1999 e 2012 apenas 192 casos de EEE e WEE foram registrados no Brasil. Além disso os poucos estudos mostram a ocorrência e/ou prevalência das encefalomyelites equinas no Brasil limitam-se a pesquisa em equinos e, são comumente restritos a regiões do Pantanal e da Amazônia (Iversson *et al.*, 1993a; Fernández *et al.*, 2000; Heinemann *et al.*, 2006; Aguiar *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009; Casseb, 2010; Melo *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2014). Até o momento apenas dois estudos publicados mostraram a ocorrência de EEEV em equídeos da Paraíba, Ceará e Pernambuco, todos os casos ocorreram após o período chuvoso (Pimentel *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011) e, em apenas um deles há registro de um único asinino positivo para EEEV (Silva *et al.*, 2011).

Apesar das encefalomyelites virais equinas serem de ocorrência esporádica no Brasil, a diversidade dos biomas brasileiros, propicia a ocorrência desses patógenos em algumas regiões, com clima, vegetação, hospedeiros e vetores ideais para a presença e disseminação dos vírus. A região Nordeste do Brasil possui quatro biomas, são eles, Caatinga (presente na maior parte da região), Cerrado (parte da Bahia, Piauí e Maranhão), Mata Atlântica (litoral nordestino até o Rio Grande do Norte) e Floresta Amazônica (parte do Maranhão) (Poletto, 2017). Essa rica diversidade permite com que diversas aves migratórias estabeleçam nessa região áreas para descanso, alimentação e reprodução (Figura 6) (Barbosa *et al.*, 2020). O crescimento desordenado dos meios urbanos e o consumo não consciente têm levado a consequências como o desmatamento e o aquecimento global, essas mudanças acarretam em alterações no ciclo de muitos patógenos, principalmente nos que dependem de vetores artrópodes, podendo levar a um aumento ou diminuição de casos em regiões que antes tais possíveis acontecimentos não eram comuns (Shocket *et al.*, 2020).

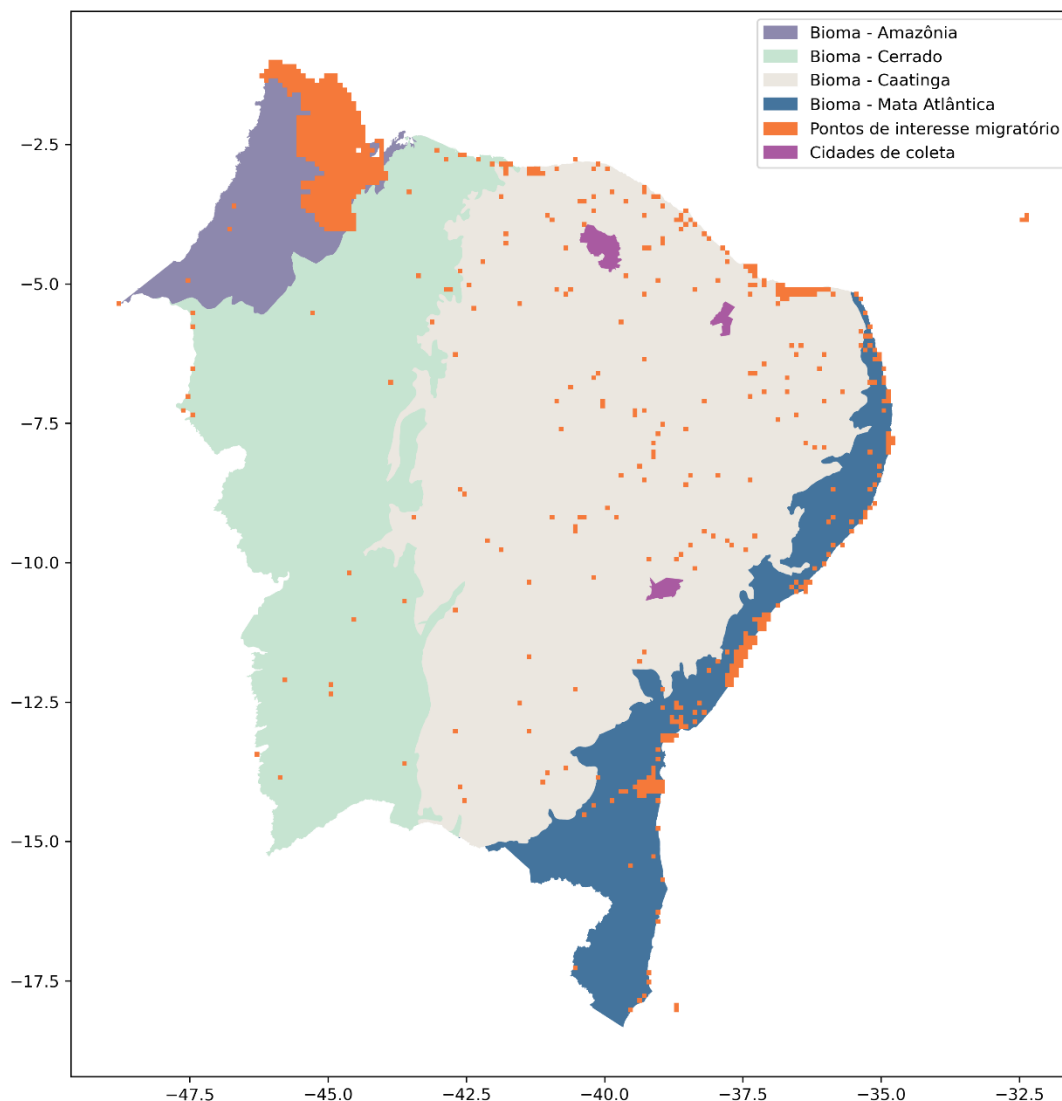


Figura 6 – Principais biomas e áreas importantes para aves migratórias (áreas regulares de rota, pousio, descanso, alimentação e reprodução) na Região Nordeste do Brasil (Fonte dos dados utilizados para construção do mapa: Barbosa et al., 2020; IBGE, 2021).

Considerando a importância das encefalomiélites arbovirais dentro do contexto *One Health* e a possível subnotificação de casos de alfaviroses no Brasil e a escassez de dados em asininos, o objetivo deste estudo foi avaliar pela primeira vez a soroprevalência das encefalomiélites equina oeste, leste e venezuelana em asininos do Nordeste brasileiro, nos estados do Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA).

4.3. Material e métodos

Este estudo foi conduzido em duas fazendas de recolhimento do poder público dos estados do RN e CE, localizadas nos municípios de Apodi (latitude: -5.64953, longitude: -37.7958), no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015, e de Santa-Quitéria (latitude: -4.33238, longitude: -40.15734) (coleta realizada em outubro de 2019), respectivamente, e em uma fazenda tutelada por uma Organização não Governamental (ONG) localizadas no município de Euclides da Cunha no estado da BA (latitude: -10.5061, longitude: -39.0092), a coleta nessa propriedade ocorreu em novembro de 2019. Todos os animais envolvidos neste estudo estavam distribuídos por todos os respectivos estados (CE e RN), vivendo de forma errante ou em uma fazenda de abate clandestino (BA) antes de serem recolhidos pelos órgãos públicos responsáveis ou por ONG. Por serem animais considerados semisselvagens, não possuíam histórico clínico. Todos os animais envolvidos neste estudo, estavam clinicamente saudáveis no momento da coleta das amostras de sangue para pesquisa sorológica deste estudo.

Amostras de sangue foram coletadas por meio de venopunção asséptica da veia jugular, utilizando tubos a vácuo (com e sem anticoagulante) e agulhas individuais, ambos estéreis (Vacuette®, Greiner Bio One, Alemanha) de um total de 859 asininos, sendo 396 animais do RN, 328 animais do CE e 135 animais da BA, com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (número do processo 206/2017) (Anexo 1). Para obtenção do soro os tubos de sangue sem anticoagulante foram centrifugados por dez minutos a 1.900 x g, em seguida foram estocados a -20°C até o momento dos exames laboratoriais.

A presença de anticorpos contra EEEV, WEEV e VEEV foi pesquisada por teste de redução de neutralização em placa (PRNT), conforme descrita por Smart e Trainer (1975) e foi realizada no Instituto Biológico do Laboratório de São Paulo, no Centro de Pesquisa e Sanidade Animal, Laboratório de Raiva e Encefalites, credenciado pelo MAPA, sob a supervisão da Dr^a. Maria do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara. Todas as amostras foram testadas em duplicata e as amostras virais empregadas como antígeno para cada doença, bem como a linhagem celular e ponto de corte estão descritas na tabela 11.

4.4.Resultados

Dos 859 asininos amostrados, a presença de anticorpos para o EEEV foi detectada em 29 (3,37%), sendo 13 (3,28%) animais do RN, 9 (6,67%) da BA e 7 (2,13%) do CE. Do total

de amostras, duas (0,23%) foram positivas para o WEEV, sendo um animal proveniente da BA (0,74%) e outro do estado do CE (0,3%) (Tabela 11). Nenhum dos asininos testados foi soropositivo para o VEEV.

Tabela 111 - Pesquisa de anticorpos contra Encefalomielite Equina Leste, Encefalomielite Equina Oeste e Encefalomielite Equina Venezuela, em asininos dos estados da Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte, segundo Smart et al. (1975)

Doença	Amostra viral empregada como antígeno	Prevalência (%)		
		Bahia	Ceará	Rio Grande do Norte
Encefalite Equina Leste	Tatuí	6,67% (9/135)	2,13% (7/328)	3,28% (13/396)
Encefalite Equina Oeste	TR 25717	0,74% (1/135)	0,3% (1/328)	0/396
Encefalite Equina Venezuelana	SP NA 15600	0/135	0/328	0/396

Alinhagem celular utilizada em todos os testes foi a VERO. O ponto de corte para considerar uma amostra positiva foi ≥ 5 UI.

4.5. Discussão

Até o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de soroprevalência das encefalomielites equinas virais em asininos do continente americano. Nossos dados indicam que 3,37% e 0,23% dos asininos da região Nordeste do Brasil foram expostos a infecções pelo EEEV e WEEV, respectivamente. Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os demais inquéritos desenvolvidos em equinos no Brasil, que indicam uma maior prevalência de EEEV em relação a WEEV e VEEV (Iversson *et al.*, 1993; Heinemann *et al.*, 2006; Aguiar *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009; Pimentel *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2014; Casseb, 2010). Surto com identificação molecular e/ou sorológica do agente viral, EEEV, no estado do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe (Pimentel *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011; MAPA, 2021), que são estados com localização próxima aos pesquisados, suportam o resultado encontrado neste estudo.

A prevalência de anticorpos para o EEEV encontrada neste estudo foi inferior aos índices da doença encontrados no Pará, Mato Grosso, Roraima, São Paulo e Minas Gerais (Heinemann *et al.*, 2006; Casseb, 2010; Iversson *et al.*, 1993; Melo *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2014). A menor prevalência da doença na Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte pode estar associada aos baixos índices pluviométricos das regiões, que desfavorecem a presença do inseto vetor. Pimentel *et al.* (2009), Silva *et al.* (2011) e Campos *et al.* (2013) sugeriram uma forte ligação entre os índices pluviométricos com o surgimento de casos de encefalomielite equina, visto que as atividades dos mosquitos vetores dependem de condições climáticas, como calor e umidade (Barros, 2007). Situação parecida também é encontrada na América do Norte, onde o aumento de casos de EEEV e WEEV está relacionado com o aumento das chuvas (Go *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2017).

Este é o primeiro estudo que relata a presença de anticorpos para o WEEV em equídeos do Nordeste brasileiro e a baixa prevalência (0,23%) encontrada concorda com os achados de Iversson *et al.* (1993), Aguiar *et al.* (2008), Cunha *et al.* (2009), Melo *et al.* (2012) e Lara *et al.* (2014) que relataram frequências entre 0 e 1,2% nos estados de Mato Grosso, Roraima, São Paulo e Minas Gerais. Apenas no Pará foi descrita uma prevalência maior (6,77%) (Casseb, 2010).

As encefalomielites virais equinas, EEEV, WEEV e VEEV, na América do Sul, são normalmente descritas em regiões de florestas tropicais e pântanos (Go *et al.*, 2014), sendo considerado esporádica a ocorrência desses vírus em biomas de cerrado e caatinga. Apesar do bioma Caatinga predominar na região Nordeste, existem microrregiões de Mata Atlântica e Floresta Amazônica (Poletto, 2017) que podem ser consideradas pontos potenciais para presença desses patógenos, além disso, as mudanças climáticas, mudanças de vegetação (destruição das florestas tropicais), aumento das viagens, urbanização não planejada, diferenças sócio econômicas e a diversa fauna de mosquitos que existem no Brasil, produz condições favoráveis a proliferação de vetores e o aumento da incidência de vários arbovírus em biomas que antes não eram considerados “alvos” (Lowe *et al.*, 2020). Essas variações se mostraram importantes em diversos estudos realizados para outras doenças arbovirais como dengue, zika, chicungunha, febre amarela, febre do Nilo ocidental e encefalite de Saint Louis (Reeves *et al.*, 1994; Kilpatrick *et al.*, 2006; Reisen, 2013; Xiao *et al.*, 2014; Lowe *et al.*, 2020; Shocket *et al.*, 2020; Ryan *et al.*, 2021).

Os mosquitos são ectotérmicos, logo a temperatura do ambiente pode ser um fator limitante, visto que a transmissão não pode ocorrer em temperaturas que impossibilitem a sobrevivência, desenvolvimento, reprodução e metabolismo desses vetores e dos patógenos (Mordecai *et al.*, 2019). A temperatura é um dos fatores mais bem estudados que influenciam o período de incubação extrínseca (PIE) e a taxa de disseminação dos vírus transmitidos por mosquitos. Em estudos de laboratório, realizados em *Culex tarsalis*, 30-70% dos mosquitos foram capazes de transmitir o WEEV a galinhas após 6 dias de incubação a 30-32°C, mas essa proporção diminuiu para 12-20% após 12 dias. Entre 20-25°C, e após 6 dias apenas 4-25% dos mosquitos foram capazes de transmitir o vírus, porém após 12 dias a proporção subiu para 35-60% (Kramer *et al.*, 1983; Reisen *et al.*, 1993). Outros estudos demonstraram que o *Aedes triseriatus*, para EEEV, e o *Culex tarsalis*, para o WEEV, apresentaram uma melhor eficiência para propagação dos respectivos vírus nas temperaturas de 22,7° C (8,8 – 33° C) e 23° C (6,3 – 35,2° C), respectivamente (Mordecai *et al.* 2019).

Os estados incluídos neste estudo têm grande parte de seus territórios dentro da região Semiárida do Brasil, que tem a Caatinga como bioma principal, região essa caracterizada por um clima quente e seco, com temperatura mínima média de 26,3° C (24,1 – 28,1° C) e máxima média de 31,9° C (29,6 – 34° C) (de Moura *et al.*, 2007). Além da média de temperatura propícia para propagação viral a região é endêmica para diversas espécies do gênero *Culex* e *Aedes* (Vasconcelos *et al.*, 1991; Consoli and Oliveira, 1994), todavia todos os estudos de PIE, para encefalomiélites virais equinas, foram realizados em países de clima temperado e em espécies de mosquitos que não são comuns no Brasil, o conhecimento limitado sobre o nível de variação genética nas respostas térmicas para vetores e os vírus das encefalomiélites equinas, torna incerto o potencial de evolução adaptativa para climas mais quentes (Mordecai *et al.* 2019). Assim, existe um possível potencial para disseminação desses patógenos na região estudada, porém, as trajetórias futuras desses patógenos dependerão não apenas da adequação das temperaturas médias, mas também da variação de temperatura, adaptação térmica de vetores e vírus, urbanização não planejada e interação entre ambiente rural e urbano, atividades de controle de vetores, surgimento e disseminação de novos vetores e estirpes virais (Shocket *et al.*, 2020).

Não foram encontrados anticorpos contra o VEEV nas amostras analisadas. Diferente dos outros vírus causadores de encefalomiélites equinas que possuem aves como principais

reservatórios amplificadores, o VEEV tem os roedores como principais reservatórios amplificadores (Go *et al.*, 2014; Spickler, 2017), essa diferença poderia ser a principal responsável pela maior propagação de EEEV e WEEV em comparação ao VEEV em território nacional, uma vez que o Brasil é o segundo país com a maior população e diversidade de aves do mundo, contendo cinco rotas principais de migração de aves neárticas e setentrionais e duas delas cruzando o nordeste brasileiro (Oliveira *et al.*, 2016).

4.6. Conclusão

Este é o primeiro estudo que evidencia a circulação de WEEV e EEEV em asininos do Nordeste brasileiro, especificamente nos estados da Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte. A circulação desses agentes alerta para a necessidade de elaboração de estratégias de controle na região, reforçando a importância da implementação de uma vigilância ativa para a Saúde Única. Sugerimos a expansão das pesquisas epidemiológicas na região nordeste, o uso dos equídeos como animais sentinela, incorporando pesquisas sorológicas na vigilância de rotina para assim ajudar a identificar focos da atividade de arbovírus e no estabelecimento de medidas sanitárias públicas eficientes.

4.7. Referências

- Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Lara, M. do C.C. de S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Okuda, L.H., de Stéfano, E., Nassar, A.F. de C., Souza, G.O., Vasconcellos, S.A., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Gennari, S.M. (2008) Seroprevalence of viral and bacterial agents in equids from Monte Negro municipality, State of Rondônia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **45**(4), 269–276.
- Barbosa, A.E.A., Gomes, C.G., Lugarini, C., Paludo, D., Mendes, D., De Souza, M.A., De Souza Filho, M., Dos Santos, M.C., Alves, N., Serafini, P.P., Amaral, P.P. (2020) *Relatório de rotas e áreas de concentração de aves migratórias no Brasil*. 3^a. Cabedelo, PB: Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade (ICMBio).
- Barros, C.S.L. (2007) Encefalomielite virais dos equinos. In Riet-Correa F., S. A.L., L. R.A.A., & B. J.R., eds. *Doenças dos Ruminantes e Equídeos*. pp. 103–106.
- Campos, K.F., De Oliveira, C.H.S., Reis, A.B., Yamasaki, E.M., de Farias Brito, M., Andrade, S.J.T., Duarte, M.D., Barbosa, J.D. (2013) Surto de encefalomielite equina Leste na Ilha de Marajó, Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **33**(4), 443–448.
- Casseb, A. R. (2010) *Soroprevalência de anticorpos e padronização do teste elisa sanduíche indireto para 19 tipos de arbovírus em herbívoros domésticos*.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L. de (1994) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora FIOCRUZ.

Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Nassar, A.F.C., Lara, M.C.C.S.H., Peres, N.F., Palazzo, J.P.C., Silva, A., De Stefano, E., Pino, F.A. (2009) *Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do estado de São Paulo*.

Fernández, Z., Richartz, R., Travassosa Da Rosa, A., Soccol, V.T. (2000) Identification of the encephalitis equine virus, Brazil. *Revista de Saude Publica*. **34**(3), 232–235.

Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., Lee, C. (2014) Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. **3**(1), 58–77.

Heinemann, M.B., do Souza, M.C.C., Cortez, A., Ferreira, F., Homem, V.S.F., Ferreira-Neto, J.S., Soares, R.M., Cunha, E.M.S., Richtzenhain, L.J. (2006) Arthroscopic study of the dog's knee joint with clinical cranial cruciate ligament injury. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **43**(SUPPL), 137–139.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2021) Mapas do Brasil - Diversidade ambiental. Disponível em <<https://atlascolar.ibge.gov.br/mapas-atlas/mapas-do-brasil/diversidade-ambiental>>. Data de acesso: 10 de agosto de 2021.

Iversson, L.B., Silva, R.A., da Rosa, A.P., Barros, V.L. (1993a) Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **35**(4), 355–359.

Iversson, L.B., Silva, R.A., da Rosa, A.P., Barros, V.L. (1993b) Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **35**(4), 355–359.

Kilpatrick, A.M., Kramer, L.D., Jones, M.J., Marra, P.P., Daszak, P. (2006) West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *PLoS Biology*. **4**(4), 606–610.

Kramer, L.D., Hardy, J.L., Presser, S.B. (1983) Effect of temperature of extrinsic incubation on the vector competence of *Culex tarsalis* for western equine encephalomyelitis virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **32**(5), 1130–1139.

Lara, M. do C.C. de S.H., Beghin, G., Cunha, E.M.S., Villalobos, E.M.C., Nassar, A.F. de C., Bello, A.C.P. de P., Cunha, A.P., dos Reis, J.K.P., Leite, R.C., Mori, E. (2014) Inquérito sorológico da infecção pelos vírus da encefalomyelite equina no estado de Minas Gerais, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **51**(1), 37–41.

Lowe, R., Lee, S., Martins Lana, R., Torres Codeço, C., Castro, M.C., Pascual, M. (2020) Emerging arboviruses in the urbanized Amazon rainforest. *The BMJ*. **371**.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (2021) MAPA Indicadores. [online]. Available from: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm> [Accessed March 30, 2021].

Magna Soelma Beserra de Moura, Josiclêda Domiciano Galvncio, Luiza Teixeira de Lima Brito, Luciana Sandra Bastos de Souza, Ivan Ighour Silva Sá, Thieres George Freire da Silva (2007) Clima e água de chuva no Semi-Árido. In EMBRAPA SEMIÁRIDO, pp. 37–59.

- Melo, R.M., Cavalcanti, R.C., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S., Lara, M.C.C.S.H., Aguiar, D.M. (2012) Ocorrência de equídeos soropositivos para os vírus das encefalomyelites e anemia infecciosa no Estado de Mato Grosso. *Arquivos do Instituto Biológico*. **79**(2), 169–175.
- Mordecai, E.A., Caldwell, J.M., Grossman, M.K., Lippi, C.A., Johnson, L.R., Neira, M., Rohr, J.R., Ryan, S.J., Savage, V., Shocket, M.S., Sippy, R., Stewart Ibarra, A.M., Thomas, M.B., Villena, O. (2019) Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecology Letters*. **22**(10), 1690–1708.
- Navarro, J.C., Carrera, J.P., Liria, J., Auguste, A.J., Weaver, S.C. (2017) Alphaviruses in Latin America and the introduction of chikungunya virus. In *Human Virology in Latin America: From Biology to Control*. Springer International Publishing, pp. 169–192.
- OIE: World Organization For Animal Health (2019) Equine Encephalomyelitis. In *Terrestrial Manual 2019*.
- Oliveira, A.C. de, Barbosa, A.E.A., Sousa, A.E.B.A. de, Lugarini, C., Lima, D.M., Nascimento, J.L.X. do, Souza, M.A. de, Somenzari, M., Souza, N.A. de, Serafini, P.P., Amaral, P.P. do, Rossato, R.M., Medeiros, R. de C.S. de (2016) *Relatório Anual De Rotas E Áreas De Concentração De Aves Migratórias No Brasil*. Cabedelo, PB.
- Pimentel, L.A., de Oliveira, D.M., Galiza, G.J.N., do Rego, R.O., Dantas, A.F.M., Riet-Correa, F. (2009) Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **29**(7), 589–597.
- Poletto, I. (2017) Biomas do Brasil: da exploração à convivência. *Sustinere-Revista de Saude e Educacao*, **5**(1), 180-181.
- Reeves, W.C., Hardy, J.L., Reisen, W.K., Milby, M.N. (1994) Potential effect of global warming on mosquito-borne arboviruses. *Journal of Medical Entomology*. **31**(3), 323–332.
- Reisen, W.K. (2013) Ecology of West Nile virus in North America. *Viruses*. **5**(9), 2079–2105.
- Reisen, W.K., Meyer, R.P., Presser, S.B., Hardy, J.L. (1993) Effect of temperature on the transmission of western equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*. **30**(1), 151–160.
- Ryan, S.J., Carlson, C.J., Tesla, B., Bonds, M.H., Ngonghala, C.N., Mordecai, E.A., Johnson, L.R., Murdock, C.C. (2021) Warming temperatures could expose more than 1.3 billion new people to Zika virus risk by 2050. *Global Change Biology*. **27**(1), 84–93.
- Shocket, M.S., Verwillow, A.B., Numazu, M.G., Slamani, H., Cohen, J.M., El Moustaid, F., Rohr, J., Johnson, L.R., Mordecai, E.A. (2020) Transmission of west nile and five other temperate mosquito-borne viruses peaks at temperatures between 23°C and 26°C. *eLife*. **9**, 1–67.
- Silva, M.L.C.R., Galiza, G.J.N., Dantas, A.F.M., Oliveira, R.N., Iamamoto, K., Achkar, S.M., Riet-Correa, F. (2011) Outbreaks of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **23**(3), 570–575.
- Smart, D.L., Trainer, D.O. (1975) Serologic evidence of Venezuelan equine encephalitis in some wild and domestic populations of southern Texas. *Journal of wildlife diseases*. **11**(2), 195–200.

Spickler, A.R. (2017) Eastern, Western and Venezuelan Equine Encephalomyelitis. [online]. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php> [Accessed September 7, 2020].

Stromberg, Z.R., Fischer, W., Bradfute, S.B., Kubicek-Sutherland, J.Z., Hraber, P. (2020) Vaccine advances against venezuelan, eastern, and western equine encephalitis viruses. *Vaccines*. **8**(2), 273.

Vasconcelos, P.F., Da Rosa, J.F., Da Rosa, A.P., Dégallier, N., Pinheiro, F.P., Sá Filho, G.C. (1991) Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **33**(6), 465–476.

Xiao, F.Z., Zhang, Y., Deng, Y.Q., He, S., Xie, H.G., Zhou, X.N., Yan, Y.S. (2014) The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. *Archives of Virology*. **159**(11), 3053–3057.

CAPÍTULO 5

Evidência sorológica da circulação de flavivírus em asininos da região Nordeste do Brasil

5.1. Resumo

Algumas espécies de flavivírus, como o *Dengue virus* (DENV) e o *Zika virus* (ZIKV), são endêmicos em todo Brasil. Estudos recentes têm demonstrado que o *West Nile virus* (WNV) também está presente no país, já tendo sido identificado em cinco diferentes estados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento sorológico para WNV em 499 asininos semisselvagens da região Nordeste do Brasil. Entre os asininos testados, 386 foram coletados no estado do Rio Grande do Norte e 113 no estado do Ceará. Os soros foram testados usando um ELISA-Ab comercial contra WNV, que detectou 230 (46,09%) soropositivos, dos quais 14 foram analisados posteriormente utilizando um mosaico de Imunofluorescência Indireta (IFA) para pesquisa de outros flavivírus (DENV 1-4 e ZIKV) endêmicos no Nordeste brasileiro. Os testes utilizados nesta pesquisa apresentaram alta reatividade cruzada, o que é comumente observado no diagnóstico sorológico de flavivírus. Apesar de não ser possível indicar a espécie com exatidão, os resultados mostram que há circulação de flavivírus, provavelmente o WNV, na população asinina avaliada. Além disso, nossos resultados ressaltam a necessidade de mais estudos para pesquisa desses patógenos no Brasil e sugerem que os profissionais da saúde pública devem estar cientes da presença desses potenciais patógenos zoonóticos na região.

5.2. Introdução

O *West Nile virus* (WNV), membro do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*, é um arbovírus neurotrópico transmitido, principalmente, pela picada de mosquitos ornitófilos do gênero *Culex*, e pertence ao sorocomplexo do *Japanese encephalitis virus* (Petersen *et al.*, 2013; Nash *et al.*, 2001). Na natureza, o vírus é mantido por um ciclo de transmissão mosquito-pássaro-mosquito, onde os mosquitos atuam como vetores do vírus e os pássaros como amplificadores (Petersen *et al.*, 2013). Seres humanos e equídeos também podem ser acometidos, porém são considerados hospedeiros acidentais e não são capazes de produzir viremia suficiente para infectar novos mosquitos, apesar disso, a doença provocada por esta infecção pode ser fatal para ambas as espécies (Angenvoort *et al.*, 2013).

Atualmente o WNV é o principal arbovírus causador de encefalite no mundo (Chancey *et al.*, 2015). Em seres humanos, até 20% dos infectados podem desenvolver a febre do Nilo Ocidental, que pode variar desde uma febre leve até doença neurológica grave (Silva *et al.*, 2019). Em equídeos, a maioria dos casos relatados ocorre em cavalos, e aproximadamente 8% deles, quando infectados, desenvolvem doença grave com letalidade de 22 a 44%, no entanto, a maioria dos animais permanecem assintomática, com soroconversão em 7 a 8 dias após a infecção (Angenvoort *et al.*, 2013).

A primeira vez que o WNV foi detectado no continente americano foi no verão de 1999, quando causou uma epidemia de encefalite e meningite em Nova York e, rapidamente, se alastrou pela América do Norte (Mostashari *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2002). A primeira evidência de WNV na América do Sul foi registrada em equinos soropositivos da Colômbia em 2004 (Mattar *et al.*, 2005), e os primeiros genomas foram detectados posteriormente em cavalos na Argentina (em 2006) (Morales *et al.*, 2006) e flamingos na Colômbia (em 2012) (Osorio *et al.*, 2012). No Brasil evidências sorológicas da atividade do WNV têm sido relatadas desde 2008 (Ometto *et al.*, 2013; Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2011), além disso, casos confirmados de encefalite humana por WNV já foram reportados no estado do Piauí (Vieira *et al.*, 2015). Em 2018, foi confirmada pela primeira vez a associação da infecção pelo WNV com doença neurológica em equídeos no estado do Espírito Santo (Silva *et al.*, 2019). No mesmo ano, o primeiro isolamento de WNV foi obtido a partir de um cavalo com doença neurológica, também do Espírito Santo (Martins *et al.*, 2019), a partir desse isolado o primeiro genoma de WNV foi sequenciado no Brasil (Siconelli *et al.*, 2021). Mais recentemente, evidências genéticas da circulação do WNV foram descritas em quatro estados brasileiros (Ceará, Piauí, São Paulo e Minas Gerais) (OIE, 2021; Azevedo Costa *et al.*, 2021).

O WNV é conhecido por ser muito patogênico para aves nas Américas e por ser transmitido por diferentes espécies de mosquitos vetores, tendo sido detectado em 65 espécies diferentes de mosquitos e 326 espécies de pássaros nos Estados Unidos (Petersen *et al.*, 2013). No Brasil existem mais de 3000 espécies de mosquitos descritos, incluindo *Culex nigripalpus* e *C. quinquefasciatus* que são endêmicos em todo país e são apontados como principais vetores do WNV (Consoli and Oliveira, 1994). Além da existência abundante do vetor em território brasileiro, várias aves migratórias neárticas migram todos os anos para o Brasil, traçando rotas desde o Ártico até o sul da América do Sul (Valente *et al.*, 2011). A presença endêmica do

WNV na América do Norte (WHO, 2021), acentua a importância de uma vigilância ativa e rigorosa nas principais rotas de aves migratórias, o que envolve o Brasil.



Figura 7 - Mapa das principais Rotas de Migração de aves nas Américas (ICMBio, 2016).

A região Nordeste do Brasil é uma importante rota de aves migratórias neárticas (Figura 7) (Valente *et al.*, 2011), possuindo ligação com outras rotas onde existe a presença comprovada do WNV, como EUA, Caribe e alguns estados brasileiros (Bolfá *et al.*, 2017; WHO, 2021; Azevedo Costa *et al.*, 2021). O nordeste brasileiro possui uma das maiores populações de asininos (*Equus asinus*) do mundo (IBGE, 2017). Estes animais, atualmente, são constantemente abandonados e vivem como errantes ou são recolhidos pelo poder público ou por organizações não governamentais (ONGs). Existem poucas informações sobre a suscetibilidade de asininos e muares à infecção pelo WNV. Há um relato clínico de asinino no sul da França (Murgue *et al.*, 2001) e, recentemente, foi detectado o WNV através de RT-PCR em dois asininos com distúrbios neurológicos no estado do Espírito Santo, Brasil (Silva *et al.*, 2019). Também já foram detectados anticorpos contra o WNV em asininos e muares clinicamente saudáveis no México, Espanha, Caribe e outros países do mediterrâneo e Europa (García-Bocanegra *et al.*, 2012; Bolfá *et al.*, 2017; Alonso-Padilla *et al.*, 2009). Após observações clínicas, pesquisadores espanhóis elaboraram um estudo transversal onde levantaram a hipótese de se usar os asininos como sentinelas para o WNV, pois a suposta resistência que esses animais possuem ao desenvolvimento de sinais clínicos possibilita a maior

permanência deles no plantel, o que possibilita um estudo mais amplo da infecção na região estudada (García-Bocanegra *et al.*, 2012).

Pouco se sabe sobre a prevalência e dinâmica de transmissão do WNV no Brasil, visto isso, o objetivo da presente pesquisa foi documentar a presença de anticorpos contra o WNV em asininos semisselvagens do Nordeste brasileiro, e contribuir para um monitoramento epidemiológico dessa infecção na região.

5.3. Materiais e Métodos

5.3.1. Declaração de ética

A avaliação de risco foi submetida e aprovada pelos comitês de ética no uso de animais CEUA – UFMG, nº processo 206/2017 (Anexo 1), e CEUA – UFERSA nº processo 23091.010510/2017-75 (Anexo 2).

5.3.2. Amostras

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da veia jugular, utilizando tubos a vácuo e agulhas individuais, ambos estéreis (Vacuette®, Greiner Bio One, Alemanha) de um total de 499 asininos, oriundos de duas propriedades rurais situadas nos municípios de Apodi (n=386), no Rio Grande do Norte (RN) e Santa Quitéria (n=113), no Ceará (CE). As amostras de sangue de asininos do estado do RN foram coletadas no período de setembro de 2014 a janeiro de 2015, e pertencem ao banco de soro do Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras do CE foram coletadas em outubro de 2019. Todos os animais envolvidos neste estudo são asininos semisselvagens, sem histórico clínico, com idades variáveis e de ambos os sexos, recolhidos das estradas e interiores de todo o Rio Grande do Norte e Ceará pelo poder público. Avaliações clínicas no momento da coleta das amostras demonstraram que todos os animais não apresentavam nenhum sinal evidente de doença, incluindo qualquer sinal que pudesse ser considerado compatível com a Febre do Nilo Ocidental.

5.3.3. Anti-West Nile Virus ELISA Horse (IgG)

A pesquisa da presença de anticorpos contra WNV foi feita em todas as amostras utilizando o ELISA-Ab contra glicoproteína E do WNV (Anti-West Nile Virus ELISA Horse

IgG, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, SH, Alemanha). O teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante e todas as leituras das densidades ópticas (DOs) das amostras foram feitas em espectrofotômetro (Biotek ELX 800), no comprimento de onda de 650nm (DO650nm), classificando como positivas as amostras com $DO \geq 1,2$ e negativas com DO entre 0 – 0,7.

5.3.4. Imunofluorescência indireta (IFA): Mosaico arbovírus

Lâminas de IFA (Arbovirus Mosaic - EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, SH, Alemanha) revestidas com antígenos do WNV, *Zika virus* (ZIKV), *Dengue virus* 1, 2 3 e 4 (DENV 1 - 4) (Figura 8) foram usadas para detecção e diferenciação de anticorpos séricos IgG contra os respectivos vírus. Foram selecionados 14 soros de asininos que apresentaram DO alta no teste de ELISA e as amostras foram diluídas 1:100 e 1:1000 e aplicadas nas lâminas, seguindo o protocolo e as recomendações do fabricante.

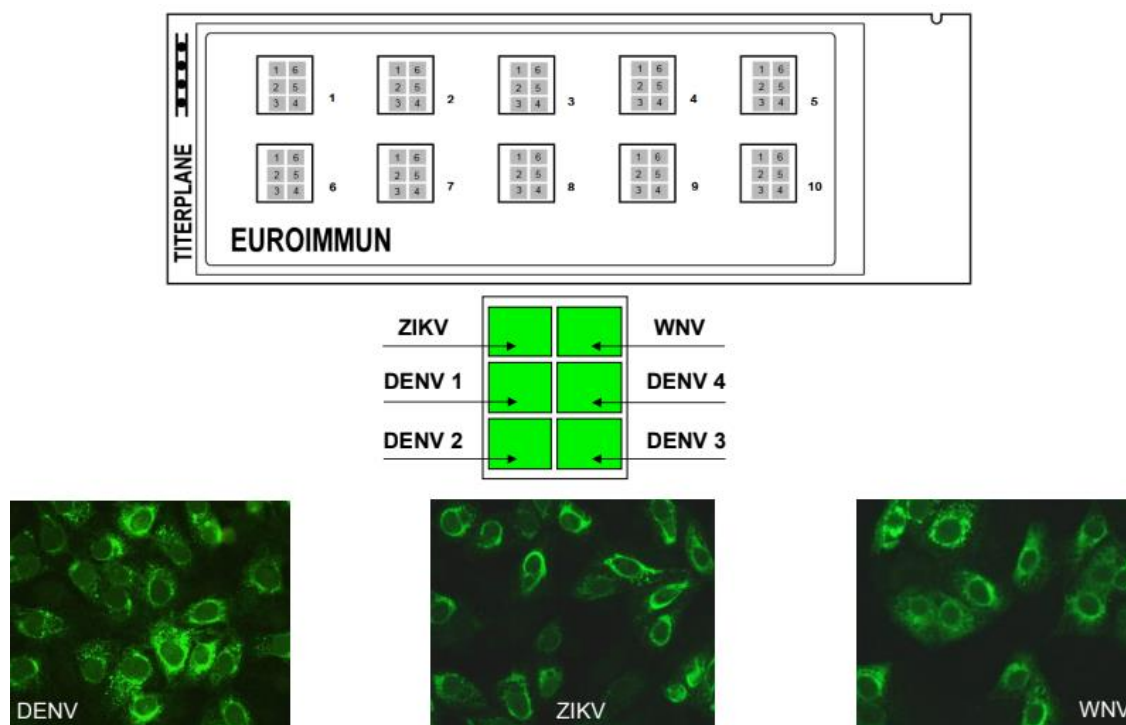


Figura 8 - Posição dos substratos na lâmina e referência de leitura positiva para os vírus pesquisados.

5.4.Resultados

Foram coletadas 499 amostras de sangue de asininos que viviam livres, próximos às rodovias federais e estaduais dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, os animais não

apresentavam sinais clínicos evidentes de doença. Todas as amostras foram testadas em ELISA para pesquisas de anticorpos anti-WNV, os resultados estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados do Anti-West Nile Virus ELISA Horse (IgG) (Euroimmun)

Local	Positivos	Negativos	Indeterminados	Total
Ceará	64 (56,64%)*	41 (36,28%)*	8 (7,08%)*	113
Rio Grande do Norte	166 (43,01%)*	179 (46,37%)*	41 (10,62%)*	386
Total	230 (46,09%)	220 (44,09%)	49 (9,82%)	499 (100%)

* Porcentagem por estado

As 14 amostras de soro submetidas ao teste de IF não apresentaram leitura na diluição 1:1000, o que impossibilitou uma melhor interpretação dos resultados (Tabela 13). A maioria das amostras apresentou reatividade cruzada, apenas 4 apresentaram reatividade única: as amostras 7 e 10 tiveram uma marcação fraca para WNV e as amostras 8033 e 8050 tiveram marcação fraca para DENV 2 e 3, respectivamente.

Tabela 133 - Resultado da IFA: Mosaico arbovírus, na diluição 1:100, indicando a intensidade da reatividade contra cada vírus.

Identificação das amostras	Substratos pesquisados					
	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	WNV	ZIKV
4	Fraco	Forte	Forte	Moderado	Fraco	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fraco	Negativo
9	Negativo	Forte	Negativo	Negativo	Moderado	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Fraco	Negativo
12	Negativo	Fraco	Fraco	Fraco	Forte	Negativo
124	Negativo	Negativo	Negativo	Fraco	Forte	Negativo
8008	Moderado	Forte	Moderado	Forte	Forte	Moderado
8009	Negativo	Forte	Moderado	Fraco	Fraco	Fraco
8012	Fraco	Negativo	Negativo	Fraco	Fraco	Negativo
8033	Negativo	Fraco	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8034	Negativo	Moderado	Negativo	Fraco	Moderado	Moderado
8046	Fraco	Forte	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
8048	Fraco	Forte	Forte	Forte	Forte	Moderado
8050	Negativo	Negativo	Fraco	Negativo	Negativo	Negativo

5.5. Discussão

Este é o primeiro e maior levantamento sorológico que evidencia a circulação do WNV, realizado em asininos da região Nordeste do Brasil. Animais soropositivos foram detectados nos dois estados pesquisados, Ceará e Rio Grande do Norte, com uma prevalência geral de 46,09%. Contudo este resultado deve ser analisado com parcimônia, pois a reatividade cruzada entre flavivírus com antígenos virais heterólogos representa um grande desafio ao nível de diagnóstico, comprovado pelo teste de IFA, onde a maioria das amostras tiveram reação cruzada. O gênero *Flavivirus* possui mais de 70 espécies de vírus (Gould and Solomon, 2008), que são subdivididos em complexos antigênicos, de acordo com critérios sorológicos, que estão fortemente relacionados com a identidade de sequência de aminoácidos da proteína E dos flavivírus (Calisher *et al.*, 1989). Embora a proteína E possua uma organização estrutural conservada entre os flavivírus, até 60% dos aminoácidos podem diferir entre diferentes sorocomplexos, enquanto em um mesmo sorocomplexo a similaridade de aminoácidos é de até 85% (Heinz and Stiasny, 2017; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Essa alta similaridade entre vírus do mesmo complexo leva a maiores níveis de reações cruzadas, o que dificulta a identificação da espécie em testes sorológicos, porém não invalida o diagnóstico, que demonstra a presença de anticorpos contra algum arbovírus.

Em geral, a reação de neutralização cruzada com soros policlonais é perdida quando a divergência de sequências de aminoácidos de E é maior que 50% (Heinz and Stiasny, 2017), o que não ocorre em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs) com antígenos contendo E. Esses ensaios são geralmente menos específicos e revelam reatividade cruzada antigênica entre todos os flavivírus (Stiasny *et al.*, 2006). Isso acontece, pois, a proteína E se torna mais acessível por meio de efeitos de desnaturação associados à adsorção da proteína em fase sólida (Butler, 2004). Logo, em países como o Brasil, onde há grande circulação de flavivírus (Cunha *et al.*, 2020), testes de ELISAs como o aplicado neste estudo, devem ser utilizados para triagem de animais e não para fornecer diagnóstico conclusivo.

Quando analisamos os resultados obtidos pelo teste de IFA, observamos que ele se mostrou pouco específico. Apenas 4 amostras apresentaram reatividade única, porém fraca, duas para WNV, uma para DENV 2 e outra para DENV 3. Assim como no ELISA a preparação dos antígenos e o método de fixação e inativação contribuem para as diferenças na sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos séricos (Koraka *et al.*, 2002). A origem das amostras também pode desempenhar um papel nas reações cruzadas observadas. Flavivírus como o DENV e o ZIKV são endêmicos em todo Brasil (Donalisio *et al.*, n.d.), portanto, pode

ser possível que os asininos aqui pesquisados tenham sido expostos ao WNV como também ao DENV e/ou ZIKV. Essas amostras podem apresentar reatividade a ambos os antígenos, não apenas devido a reações cruzadas, mas também devido à presença de anticorpos específicos para ambos os vírus. Apesar de não serem comumente relatados em equídeos e outros mamíferos não primatas, esses animais podem apresentar soroconversão após serem infectados pelo DENV e pelo ZIKV (Olson *et al.*, 1983; Beck *et al.*, 2019). Em um estudo realizado nas ilhas francesas do Pacífico, pesquisadores encontraram anticorpos contra os vírus da dengue e da zika em equinos, a taxa de soropositividade dos animais apresentou forte correlação com as principais estirpes virais circulantes na região (Beck *et al.*, 2019), comprovando que os equinos podem ser infectados por flavivírus comumente descritos em cavalos e, que a vigilância ativa de flavivírus nesses animais pode auxiliar na elaboração de medidas públicas de controle e prevenção das arboviroses.

Os resultados deste estudo estão de acordo com estudos anteriores nos quais foi demonstrado que reações cruzadas são mais comumente observadas na detecção de anticorpos IgG (McNair Scott *et al.*, 1972; Koraka *et al.*, 2002; Niedrig *et al.*, 2007) e isso pode ocorrer devido a maturação imunológica da resposta do anticorpo IgG, promovendo a formação de anticorpos que reconhecem os epítomos responsáveis pela reatividade cruzada dentro da família dos flavivírus (Niedrig *et al.*, 2007). Assim, os resultados aqui apresentados evidenciam que há circulação de arbovírus nas populações de asininos do CE e RN, com fortes indícios de que seja o WNV, mas possivelmente DENV ou até mesmo o ZIKV, o que deve ser confirmado em estudos posteriores com outros testes laboratoriais.

5.6. Conclusão

Ensaio de ELISA e IFA para pesquisa de IgG contra o WNV foram sensíveis, mas com baixa especificidade. Estes testes devem ser utilizados como testes de triagem, auxiliando na vigilância das arboviroses, seguidas de um diagnóstico confirmatório por outra prova laboratorial. Sugerimos que, além do WNV, o DENV e ZIKV também circulam na população de asininos do nordeste brasileiro. As consequências da infecção com DENV em asininos e seu papel nos ciclos epidemiológicos dessa doença merecem investigações adicionais. Outros estudos são necessários para se determinar com precisão a prevalência de WNV no nordeste brasileiro e assim colaborar com estratégias de saúde pública.

5.7. Referências

- Alonso-Padilla, J., Loza-Rubio, E., Escribano-Romero, E., Córdoba, L., Cuevas, S., Mejía, F., Calderón, R., Milián, F., Travassos da Rosa, A., Weaver, S.C., Estrada-Franco, J.G., Saiz, J.C. (2009) The continuous spread of West Nile virus (WNV): Seroprevalence in asymptomatic horses. *Epidemiology & Infection*. **137**(8), 1163–1168.
- Angenvoort, J., Brault, A.C., Bowen, R.A., Groschup, M.H. (2013) West Nile viral infection of equids. *Veterinary Microbiology*. **167**, 168–180.
- Azevedo Costa, E., Giovanetti, M., Silva Catenacci, L., Aburjaile, F., Melo Campos Iani, F., Adriano da, M., Silva Vieira, C., Isabel Maldonado Coelho Guedes, M., Senra, B., da Silva Ramos, Á., Solimar Gonçalves Silva, A., de Oliveira, T., Oliveira de Moura, F., Pecego Martins Romano, A., César, L., Feitosa, S., Joffre Martins Bayeux, J., Bertoni Cavalcanti, R., Lisboa Lobato, O., da Costa Silva, S., Lourenço, J., Carlos Junior Alcantara, L. (2021) Article Summary Line: Molecular detection of West Nile virus in horses in 1 Northeast and Southeast Brazil Running Title: Genomic monitoring of West Nile virus in Brazil. *bioRxiv*, 2021.01.06.425363.
- Beck, C., Leparc-Goffart, I., Desoutter, D., Debergé, E., Bichet, H., Lowenski, S., Dumarest, M., Gonzalez, G., Migné, C., Vanhomwegen, J., Zientara, S., Durand, B., Lecollinet, S. (2019) Serological evidence of infection with dengue and zika viruses in horses on French pacific Islands. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **13**(2), e0007162.
- Bolfa, P., Jeon, I., Loftis, A., Leslie, T., Marchi, S., Sithole, F., Beck, C., Lecollinet, S., Zientara, S., Hans, A., Issel, C.J. (2017) Detection of West Nile Virus and other common equine viruses in three locations from the Leeward Islands, West Indies. *Acta Tropica*. **174**, 24–28.
- Butler, J.E. (2004) Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods in molecular medicine*. **94**, 333–372.
- Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G., Brandt, W.E. (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology*. **70**(1), 37–43.
- Campbell, G.L., Marfin, A.A., Lanciotti, R.S., Gubler, D.J. (2002) West Nile virus. *Lancet Infectious Diseases*. **2**(9), 519–529.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., Rios, M. (2015) The global ecology and epidemiology of west nile virus. *BioMed Research International*. **2015**.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L. de (1994) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora FIOCRUZ.
- Cunha, M.S., Luchs, A., dos Santos, F.C.P., Caleiro, G.S., Nogueira, M.L., Maiorka, P.C. (2020) Applying a pan-flavivirus RT-qPCR assay in Brazilian public health surveillance. *Archives of Virology*. **165**(8), 1863–1868.
- Donalisio, M.R., Ricardo, A., Freitas, R., Bruno, A.P., Ii, Z. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Jaén-Téllez, J.A., Napp, S., Fernández-Morente, M., Arenas, A. (2012) Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection. *The Veterinary Journal*. **194**(2), 262–264.

- Gould, E., Solomon, T. (2008) Pathogenic flaviviruses. *The Lancet*. **371**(9611), 500–509.
- Heinz, F.X., Stiasny, K. (2017) The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **81**(1).
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017) IBGE | Resultados do Censo Agro 2017. [online]. Available from: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75642 [Accessed March 9, 2021].
- Koraka, P., Zeller, H., Niedrig, M., Osterhaus, A.D.M.E., Groen, J. (2002) Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes and Infection*. **4**(12), 1209–1215.
- Martins, L.C., Da Silva, E.V.P., Casseb, L.M.N., Da Silva, S.P., Cruz, A.C.R., De Sousa Pantoja, J.A., De Almeida Medeiros, D.B., Filho, A.J.M., Da Cruz, E.D.R.M., De Araújo, M.T.F., Cardoso, J.F., Da Cunha, M.A.C.R., Almada, G.L., Romano, A.P.M., Santos, M.G.D.P., Rodrigues, G.A.P., Chiang, J.O., Quesada, J.A.S., Carvalho, V.L., Da Costa Vasconcelos, P.F. (2019) First isolation of west nile virus in brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **114**(1), 180332.
- Mattar, S., Edwards, E., Laguado, J., González, M., Alvarez, J., Komar, and N. (2005) West Nile Virus Antibodies in Colombian Horses. *Emerging Infectious Diseases*. **11**(9), 1497–1498.
- McNair Scott, R., McCown, J.M., Russell, P.K. (1972) Human Immunoglobulin Specificity After Group B Arbovirus Infections. *Infection and Immunity*. **6**(3).
- Morales, M.A., Barrandeguy, M., Fabbri, C., Garcia, J.B., Vissani, A., Trono, K., Gutierrez, G., Pigretti, S., Menchaca, H., Garrido, N., Taylor, N., Fernandez, F., Levis, S., Enría, D. (2006) West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. **12**(10), 1559–1561.
- Mostashari, F., Bunning, M.L., Kitsutani, P.T., Singer, D.A., Nash, D., Cooper, M.J., Katz, N., Liljebjelke, K.A., Biggerstaff, B.J., Fine, A.D., Layton, M.C., Mullin, S.M., Johnson, A.J., Martin, D.A., Hayes, E.B., Campbell, G.L. (2001) Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: Results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet*. **358**(9278), 261–264.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. (2005) A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. **3**(1), 13–22.
- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J., Zeller, H. (2001) West Nile Outbreak in Horses in Southern France , 2000: The Return after 35 Years. *Emerging Infectious Diseases*. **7**(4), 692–696.
- Nash, D., Mostashari, F., Fine, A., Miller, J., O’Leary, D., Murray, K., Huang, A., Rosenberg, A., Greenberg, A., Sherman, M., Wong, S., Campbell, G.L., Roehrig, J.T., Gubler, D.J., Shieh, W.-J., Zaki, S., Smith, P., Layton, M. (2001) The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *New England Journal of Medicine*. **344**(24), 1807–1814.

Niedrig, M., Sonnenberg, K., Steinhagen, K., Paweska, J.T. (2007) Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *Journal of Virological Methods*. **139**(1), 103–105.

OIE: World Organization for Animal Health (2021) OIE-WAHIS. [online]. Available from: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard> [Accessed March 25, 2021].

Olson, J.G., Ksiazek, T.G., Gubler, D.J., Lubis, S.I., Simanjuntak, G., Lee, V.H., Nalim, S., Juslis, K., See, R. (1983) A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **77**(2), 131–137.

Ometto, T., Durigon, E.L., de Araujo, J., Aprelon, R., Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Melo, R.M., Levi, J.E., de Azevedo Júnior, S.M., Petry, M.V., Neto, I.S., Serafini, P., Villalobos, E., Cunha, E.M.S., Lara, M. do C.C.S.H., Nava, A.F.D., Nardi, M.S., Hurtado, R., Rodrigues, R., Sherer, A.L., de Fátima Martins Sherer, J., Geraldi, M.P., de Seixas, M.M.M., Peterka, C., de Souza Bandeira, D., Pradel, J., Vachieri, N., Labruna, M.B., de Camargo, L.M.A., Lanciotti, R., Lefrançois, T. (2013) West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **107**(11), 723–730.

Osorio, J.E., Ciuderis, K.A., Lopera, J.G., Piedrahita, L.D., Murphy, D., LeVasseur, J., Carrillo, L., Ocampo, M.C., Hofmeister, E. (2012) Characterization of West Nile viruses isolated from captive American flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellin, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **87**(3), 565–572.

Pauvolid-Corrêa, A., Morales, M.A., Levis, S., Figueiredo, L.T.M., Couto-Lima, D., Campos, Z., Nogueira, M.F., da Silva, E.E., Nogueira, R.M.R., Schatzmayr, H.G. (2011) Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **106**(4), 467–474.

Petersen, L.R., Brault, A.C., Nasci, R.S. (2013) West Nile virus: Review of the literature. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. **310**(3), 308–315.

Siconelli, M.J.L., Jorge, D.M. de M., de Castro-Jorge, L.A., Fonseca-Júnior, A.A., Nascimento, M.L., Floriano, V.G., de Souza, F.R., Queiroz-Júnior, E.M. de, Camargos, M.F., Costa, E.D.L., Carvalho, A.A.B., da Fonseca, B.A.L. (2021) Evidence for current circulation of an ancient West Nile virus strain (Ny99) in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **54**, 2021.

Silva, A.S.G., Matos, A.C.D., da Cunha, M.A.C.R., Rehfeld, I.S., Galinari, G.C.F., Marcelino, S.A.C., Saraiva, L.H.G., Martins, N.R. da S., Maranhão, R. de P.A., Lobato, Z.I.P., Pierezan, F., Guedes, M.I.M.C., Costa, E.A. (2019) West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transboundary and Emerging Diseases*. **66**, 445–453.

Stiasny, K., Kiermayr, S., Holzmann, H., Heinz, F.X. (2006) Cryptic Properties of a Cluster of Dominant Flavivirus Cross-Reactive Antigenic Sites. *Journal of Virology*. **80**(19), 9557–9568.

Valente, R. de M., Silva, J.M.C. da, Straube, F.C., Nascimento, J.L.X. do (2011) *Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil*. Belém: Conservação Internacional.

Vieira, M.A.C.S., Romano, A.P.M., Borba, A.S., Silva, E.V.P., Chiang, J.O., Eulálio, K.D., Azevedo, R.S.S., Rodrigues, S.G., Almeida-Neto, W.S., Vasconcelos, P.F.C. (2015) Case

report: West Nile virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **93**(2), 377–379.


WHO – World Health Organization (2021) West Nile virus. [online]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus> [Accessed May 2, 2021].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os asininos têm sido negligenciados e ameaçados de abandono, abate indiscriminado e falta de gestão sanitária adequada. Eles são frequentemente tratados como "pequenos cavalos". No entanto, asininos e cavalos têm diferenças genéticas, fisiológicas e comportamentais significativas. O conhecimento específico sobre doenças infecciosas virais que afetam essa espécie é importante para prevenir e mitigar surtos de doenças. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que agentes como EIAV, vírus da arterite viral equina, HVEs (EHV-1 neuropatogênico e AHV-5) e, possivelmente, WNV e DENV, assim como outros flavivírus, circulam entre asininos da região Nordeste do Brasil, sugerindo que os jumentos podem ser reservatórios/sentinelas potenciais dessas doenças, evidenciando assim a importância do estabelecimento de uma rotina diagnóstica e estudos epidemiológicos nessa espécie.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no uso de animais (UFMG).

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 206/2017	
Título do projeto: Pesquisa de anemia infecciosa equina, mormo, arterite viral equina e herpesvirus equino em asininos do nordeste brasileiro	
Finalidade: Pesquisa	
Pesquisador responsável: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis	
Unidade: Escola de Veterinária	
Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva	
 Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023 Prezados pesquisadores, a CEUA informa que foram aprovados 382 animais. Ao adicionar a margem de erro de 5% aos 363 animais, tem-se um n=381,15 . Assim, por recomendação da CEUA, o valor deve ser arredondado para cima, logo, n=382.	
Belo Horizonte, 26/02/2018.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	

ANEXO 2 – Certificado da Comissão de Ética no uso de animais (UFERSA).



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DECLARAÇÃO

Declarante: **Sidnei Miyoshi Sakamoto**, brasileiro, casado, portador do RG 18.303.520-3 (SSP-SP), CPF 112037808/77, professor Titular Livre da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SIAPE 24497204)

Declara, para os devidos fins, que serão disponibilizadas amostras de soro e tecidos para a execução do projeto intitulado “Presença e caracterização da anemia infecciosa equina, arterite viral equina, herpesvirus equino e mormo em asininos do nordeste brasileiro”, coordenado pelo Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis. As amostras pertencem ao banco de amostras do projeto “Caracterização da infecção do Virus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) em Asininos do Município de Mossoró/RN”, aprovado na CEUA-UFERSA sob o número 23091.004349/2014-58, provenientes de diversas regiões do Estado do Rio Grande do Norte.

Adicionalmente, serão cedidas amostras provenientes do projeto Boas Práticas e Capacitação em Bem-estar de asininos do Nordeste em convênio formalizado entre o MAPA e a UFERSA que tem como parceiros a USP, Donkey Sanctuary e a Universidade Positivo, processo nº 21000.030968/2016-14, com o objetivo de identificar alternativas de manejo humanitário da espécie e capacitação de multiplicadores e manejadores, bem como órgãos públicos envolvidos nas políticas públicas voltadas para os asininos na região Nordeste além do diagnóstica da situação sanitária desses animais. O valor total do projeto é: R\$ 399.826,68 com finalização prevista para 2020 e prevê a coleta de amostras em propriedades do Ceará, Rio Grande do Norte e demais estados do Nordeste (ainda em fase de planejamento).

Por ser verdade, firmo.

Mossoró-RN, 14 de Agosto de 2017



Review

Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules

Rebeca Jéssica Falcão Câmara ¹, Bruna Lopes Bueno ¹, Cláudia Fideles Resende ¹,
Udeni B. R. Balasuriya ², Sidnei Miyoshi Sakamoto ³ 
and Jenner Karlisson Pimenta dos Reis ^{1,*} 

¹ Laboratório de Retrovírus, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; rebeca.jfc@gmail.com (R.J.F.C.); brulbueno18@gmail.com (B.L.B.); c.fideles91@gmail.com (C.F.R.)

² Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory and Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, River Rd, Room 1043, Baton Rouge, LA 70803, USA; balasuriya1@lsu.edu

³ Laboratório Multidisciplinar do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências da Saúde (DCS), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rio Grande do Norte 59625-900, Brazil; sakamoto@ufersa.edu.br

* Correspondence: jenner@ufmg.br; Tel.: +55-31-3409-2100

Received: 19 October 2020; Accepted: 19 November 2020; Published: 25 November 2020



Simple Summary: Donkeys have been neglected and threatened by abandonment, indiscriminate slaughter, and a lack of proper sanitary management. They are often treated as “small horses.” However, donkeys and horses have significant genetic, physiological, and behavioral differences. Specific knowledge about viral infectious diseases that affect donkeys and mules is important to mitigate disease outbreaks. Thus, the purpose of this review is to provide a brief update on viral diseases of donkeys and mules and ways to prevent their spread.

Abstract: Donkeys (*Equus asinus*) and mules represent approximately 50% of the entire domestic equine herd in the world and play an essential role in the lives of thousands of people, primarily in developing countries. Despite their importance, donkeys are currently a neglected and threatened species due to abandonment, indiscriminate slaughter, and a lack of proper sanitary management. Specific knowledge about infectious viral diseases that affect this group of *Equidae* is still limited. In many cases, donkeys and mules are treated like horses, with the physiological differences between these species usually not taken into account. Most infectious diseases that affect the *Equidae* family are exclusive to the family, and they have a tremendous economic impact on the equine industry. However, some viruses may cross the species barrier and affect humans, representing an imminent risk to public health. Nevertheless, even with such importance, most studies are conducted on horses (*Equus caballus*), and there is little comparative information on infection in donkeys and mules. Therefore, the objective of this article is to provide a brief update on viruses that affect donkeys and mules, thereby compromising their performance and well-being. These diseases may put them at risk of extinction in some parts of the world due to neglect and the precarious conditions they live in and may ultimately endanger other species' health and humans.

Keywords: donkeys; *Equus asinus*; mules; viral diseases; health; infectious diseases

1. Introduction

Horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) are mammals belonging to genus, *Equus*, which emerged approximately 4.5 million years ago [1]. Although there is an inheritance shared between them, the horses and the donkeys are notably different in their physical and behavioral