

DIOGO DIÓGENES MEDEIROS DINIZ

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM EQUÍDEOS NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

RECIFE

2020



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

DIOGO DIÓGENES MEDEIROS DINIZ

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM EQUÍDEOS NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Huber Rizzo
Coorientadora: Prof^a. Dra. Sandra Regina Fonseca de Araújo Valença

RECIFE

2020



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

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM EQUÍDEOS NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

Dissertação de mestrado elaborada por:
DIOGO DIÓGENES MEDEIROS DINIZ
Apresentado em **18/02/2020**.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Huber Rizzo
Examinador – DMV/UFRPE

Prof. Dra. Sandra Regina Fonsêca de Araújo Valença
Examinador – DMV/UFRPE

Dr. Sérgio Alves do Nascimento
Examinador - DMV/UFRPE

À minha família, aos meus amigos e aos meus mentores nesta etapa da vida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Regina Veruschka e Raimundo Diniz, aos meus avós Zé de Zeira, Verinha e Regina (*in memorian*), à minha irmã Bruna e a minha namorada Lohanne. Por estarem sempre presente na minha vida, funcionando como uma base, um alicerce, uma válvula de escape e um carregador de boas energias.

Agradeço a Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE), minha segunda casa, onde prestei minha graduação, minha residência médica e agora concluo o mestrado; pelas portas abertas e aprendizados imensuráveis.

Agradeço também ao meu grande amigo, pai acadêmico, mentor profissional e orientador Huber Rizzo, em que foi o alicerce de todo o desenvolvimento profissional e conclusão do trabalho, desde a escolha do tema, o acesso ao Instituto Biológico que processou as amostras do experimento e o total apoio na escrita. Trabalhei com ele na graduação, na residência, no mestrado e tenho certeza que nunca perderemos contato, respeito, admiração e apreço.

Agradeço ao amigo e professor que contribuiu com o desenvolvimento do trabalho, José Wilton Pinheiro Júnior orientando na metodologia, epidemiologia e estatística. Aos meus amigos doutorandos Taile Katiele Souza de Jesus (Tailinha, meu grande abraço! Você é espetacular!) e Rafael da Silva Júnior que também contribuíram bastante.

Ao Instituto Biológico de São Paulo/SP, em especial a Maria do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara e a Eliana Monteforte Cassaro Villalobos por ter nos recebido com tanto acolhimento e nos dado o suporte necessário para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu amigo mestrando Leandro Lamartine, onde fizemos residência e mestrado juntos. Também teve importante contribuição nas coletas das amostras do experimento. Ao amigo Gilvan, da cidade de Patu (RN), que me prestou um suporte imensurável nas coletas. Ao meu colega Carioca, que me deu um suporte nas coletas e me apresentou a Gilvan. Agradeço também a todos os tutores que me permitiram a realizar as coletas e a responder os questionários, para desenvolvimento desta pesquisa.

Ao pessoal da banca examinadora, que foi escolhido a dedo, por apreço, admiração, carinho e respeito. Que somaram não apenas nesta fase do mestrado, mas desde a graduação...

Frase do mestrando:

“EM DETERMINADO MOMENTO VOCÊ PERCEBE QUE TEM A CHANCE DE CONSTRUIR O MUNDO EM QUE VIVE. ABRACE ESSA IDÉIA O QUANTO ANTES, E CONSTRUA SEU CAMINHO, SUA VIDA... NÓS SOMOS O ÚNICO RESPONSÁVEL PELA ATUAL VIDA QUE LEVAMOS, NÃO SE TORNE REFÉM, NÃO SE ACOMODE, TOME AS RÉDEAS! ... NUNCA É TARDE PARA RECOMEÇAR ... SE MOLDE, EVOLUA, ACREDITE! FAÇA ALGO! ... ONDE QUERO CHEGAR? O QUE DEVO FAZER? COMO FAZER?... A VIDA É UM ETERNO APRENDIZADO... SEJA UM FILTRO, NÃO UMA ESPONJA... RESILIÊNCIA SEMPRE!”

RESUMO

A estomatite vesicular (EV) é uma enfermidade zoonótica viral, que acomete ruminantes, equídeos, porcos, algumas espécies silvestres e cursa com sintomatologia clínica semelhante as provocadas pelo vírus da febre aftosa. O vírus da estomatite vesicular (VEV) apresenta dois sorotipos New Jersey e Indiana sendo este último classificado em três subtipos Indiana 1, 2 e 3. Objetivou-se investigar a presença de anticorpos do VEV e potenciais fatores de risco envolvidos com a infecção pelo vírus em equídeos das mesorregiões Leste e Oeste Potiguar do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Foram analisadas amostras sanguíneas de 809 animais provenientes de noventa propriedades distribuídas em dezesseis municípios do estado durante os meses de julho de 2018 a fevereiro de 2019. As amostras foram obtidas por venopunção da jugular com sistema de colheita a vácuo, em tubos do tipo Vacutainer® sem anticoagulante e posteriormente centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos para obtenção de soro, que foi armazenado em tubos do tipo Eppendorf® a -20°C até o processamento para diagnóstico por soroneutralização. Os fatores de riscos foram avaliados por meio de questionário epidemiológico investigativo. Os dados foram submetidos a análise estatística no programa EpiInfo 3.5.2 com nível de confiança de 95%. A prevalência de anticorpos anti-VEV foi 24,6% (199/809), sendo 3,2% (13/402) soropositivos na mesorregião Leste e 45,7% (186/407) na região Oeste. Considerando os sorotipos observou-se uma prevalência de 3,8% (31/809) para Indiana 2, 24,5% (198/809) para Indiana 3 e 15,1% (30/198) de coinfeção para ambos. Todas as variáveis estatisticamente significantes foram submetidas a uma análise de regressão logística multivariada e concluiu-se que animais criados em áreas rurais da mesorregião Oeste, em sistemas extensivo e semi-intensivo, cujo pasto é alagado, não realiza quarentena, não desinfeta as instalações, e onde os animais enfermos são mantidos no rebanho, foram consideradas fatores de risco para infecção pelo VEV. Esses resultados demonstram que o VEV está distribuído pelo estado do Rio Grande do Norte e medidas de controle devem ser adotadas para evitar a disseminação do mesmo.

Palavras-chave: equinos, fator de risco, soroneutralização, vesículas.

ABSTRACT

Vesicular stomatitis (VS) is a viral zoonotic disease that affects ruminants, equines, porcine, some wild species and has clinical symptoms similar to those caused by the FMD virus. The vesicular stomatitis virus (VSV) has two serotypes New Jersey and Indiana, the latter being classified into three subtypes Indiana 1, Indiana 2 and Indiana 3. The objective of this study was to investigate the presence of VSV and its potential risk factors for the occurrence and dissemination of disease in Equidae from the eastern and Western mesoregions of the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Blood samples were analyzed from 809 animals from 90 properties distributed in sixteen municipalities in the state from July 2018 to February 2019. The samples were obtained by venipuncture of the jugular with vacuum collection system, in tubes of the type Vacutainer® without anticoagulant. Packaged under refrigeration in a thermal box and transported to the Ruminant Laboratory of the Federal Rural University of Pernambuco for centrifugation at 3,000 rpm for 10 minutes and obtaining serum aliquots, which were stored in Eppendorf® tubes at -20°C until diagnostic processing. by seroneutralization. Risk factors were assessed using an investigative epidemiological questionnaire. The data were submitted to statistical analysis in the EpiInfo 3.5.2 program with a 95% confidence level. The occurrence of anti-VSV antibodies was 24.6% (199/809), with 3.2% (13/402) seropositive in the eastern mesoregion and 45.7% (186/407) in the western region. Considering the serotypes, there was a prevalence of 3.8% (31/809) for Indiana 2 and 24.5% (198/809) for Indiana 3. All statistically significant variables were subjected to multivariate logistic regression analysis and it was concluded that animals raised in rural areas of the western mesoregion, in extensive and semi-intensive systems, whose pasture is flooded, does not quarantine, does not disinfect the facilities, are raised in a communal way with small ruminants and pigs, and where the animals sick are kept in the herd, risk factors for infection by VSV-IN subtypes 1 and 2 were considered. These results demonstrate that VSV is distributed across the state of Rio Grande do Norte and control measures must be adopted to prevent its spread.

Keywords: horses, risk factor, seroneutralization, vesicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Artigo:

Figura 1 Mapa do Rio Grande do Norte dividido em suas quatro mesorregiões indicando numericamente os municípios onde foi realizado colheitas de sangue de equinos para realização de diagnóstico sorológico por soroneutralização para Estomatite Vesicular.....09

LISTA DE TABELA E QUADRO

Dissertação:

Quadro 1 - Métodos de provas disponíveis para diagnóstico da estomatite vesicular e sua finalidade.....	21
---	----

Artigo:

Tabela 1 - Análise dos fatores de risco associadas à infecção pelo VEV em equídeos oriundos de criações do Leste e Oeste Potiguar, Rio Grande do Norte, Brasil 2018-2019.....	10
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITRATURA.....	13
2.1 Características Gerais da Estomatite Vesicular.....	13
2.2 Epidemiologia.....	15
2.2.1 Histórico.....	15
2.2.2 Transmissão e fatores de risco.....	16
2.3 Sinais clínicos.....	18
2.4 Diagnóstico.....	19
2.5 Profilaxia e controle.....	24
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
4 ARTIGO CIÊNTIFICO.....	32
5 ANEXOS.....	43
5.1 Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	43
5.2 Anexo 2: Questionário epidemiológico.....	44
5.3 Anexo 3: Normas da revista.....	45

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Rio Grande do Norte é localizado a nordeste da região Nordeste do país, possuindo uma área territorial de 52.809,602 km², com 167 municípios, dividido em quatro mesorregiões (Oeste Potiguar, Central Potiguar, Agreste Potiguar e Leste Potiguar). Apresenta extensa faixa litorânea, banhada pelo Oceano Atlântico a norte e a leste, dividindo-se em um clima tropical no litoral leste e um clima semiárido em quase todo o seu interior, inclusive litoral norte (IBGE, 2019).

A atividade equina no Brasil envolve mais de 30 segmentos distribuídos entre insumos, criação e finalidade, compondo a base do chamado Complexo do Agronegócio do Cavalo, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. A rápida evolução da importância socioeconômica da equideocultura brasileira aumentou o interesse e o investimento em medicina equina e em suas principais doenças (ARARIPE, 2010). No estado do Rio Grande do Norte os equídeos possuem importância pois estão presentes em todos os municípios do estado sendo utilizados principalmente nos esportes equestres como as vaquejadas e cavalgadas (BRITO, 2019).

A Estomatite vesicular (EV) é uma doença infectocontagiosa viral, de caráter zoonótico e com ocorrência em ruminantes, equídeos, suídeos e algumas espécies silvestres. O Vírus da Estomatite Vesicular (VEV) pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *vesiculovirus*, e apresenta dois sorotipos imunologicamente distintos, a cepa New Jersey (VEV-NJ) e Indiana (VEV-IN) a qual ainda é classificada em três subtipos Indiana 1 ou cepa clássica (VEV-IN 1), Indiana 2 ou COCAL ou Argentina (VEV-IN 2) e Indiana 3 ou Alagoas (VEV-IN 3) (ROZO-LOPEZ ET AL., 2018).

A epidemiologia e a patogênese da EV ainda não estão bem esclarecidas devido as diferentes formas de transmissão em potencial do vírus. Sabe-se que inclui vetores biológicos como mosquitos, moscas negras e moscas de areia; vetores mecânicos como alimentos contaminados, fômites, aerossóis e contato direto com animais infectados. A importância de cada uma das vias de transmissão do VEV e o modo pelo qual o vírus se mantém no ambiente durante os surtos em equídeos é desconhecido, porém, pesquisas sorológicas indicam que além dos animais domésticos, muitas espécies selvagens desenvolvem anticorpos neutralizantes ao vírus, no entanto, ainda não se sabe ao certo seu reservatório definitivo e tampouco os ciclos de transmissão entre estes (ZIMMER, SUMMERMATTER E ZIMMER, 2013; HOWERTH ET AL., 2006; ROZO-LOPEZ ET AL., 2018).

O diagnóstico da infecção pode ser feito a partir da identificação do agente viral por isolamento em cultivo celular e identificação do vírus em cultivo celular ou por meio da detecção de antígenos através da soroneutralização (SN), ensaio imunoenzimático (ELISA) e fixação do complemento (FC) ou ainda a partir da detecção de ácidos nucleicos por reação em cadeia de polimerase (PCR). Para diagnóstico via pesquisa de anticorpos as técnicas mais preconizadas são o ELISA e a SN, ainda que a FC possa ser utilizada (OIE, 2018).

Sem uma compreensão dos fatores de riscos envolvidos na epidemiologia da transmissão viral, não se pode desenvolver estratégias eficientes e econômicas de controle da EV em casos de surtos recorrentes (Howerth et al., 2006), uma vez que todas as informações sobre a doença baseiam-se em relatos de casos de veterinários, e pesquisas realizadas durante surtos esporádicos (ROZO-LÓPEZ ET AL., 2018).

Por ser economicamente importante, de consequências relevantes para a saúde pública e escassez de dados atualizados objetivou-se, investigar a presença de anticorpos para VEV e seus potenciais fatores de risco para ocorrência e disseminação da enfermidade em equídeos das mesorregiões leste e oeste do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características Gerais da Estomatite Vesicular

Segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses - ICVT (2018), a família *Rhabdoviridae* (ordem *Mononegavirales*) é composta de vírus que infectam uma grande variedade de espécies, incluindo artrópodes, plantas e vertebrados. Dentre os vírus de vertebrados, existem rbdovírus que infectam mamíferos, aves e peixes, sendo os mais importantes para a saúde animal e humana, o vírus da estomatite vesicular (VEV) e o vírus da raiva (RabV), respectivamente.

O VEV pertence à família *Rhabdoviridae* e gênero *vesiculovirus*, o qual apresenta vírus de RNA com sentido negativo, de fita simples, envoltos. Os vírions rbdovírus têm aproximadamente 45-100 nm de diâmetro e 100-430 nm de comprimento e são compostos por um nucleocápside cilíndrico helicoidal espiralado, cercado por um envelope com grandes picos de glicoproteínas (5-10 nm de comprimento), que contém o genoma. A forma cilíndrica precisa do nucleocápside é o que dá aos vírus sua forma distinta de bala ou cônica. O genoma do VEV consiste em um RNA de fita única de sentido negativo, 11.161 nucleotídeos de comprimento, codificando cinco proteínas principais: a proteína do nucleocápside (N), a fosfoproteína (P) e

a polimerase viral (L) envolvem o RNA genômico e constituem o ribonucleocapsídeo. A proteína da matriz (M) está associada intimamente com a RNP, constituindo-se na base estrutural que confere aos vírions o formato de projétil. Uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira, contendo trímeros da glicoproteína de superfície (G), forma o envelope viral (FLORES et al., 2007; ROZO-LOPEZ et al., 2018).

Os mecanismos de transcrição e replicação do VSV são complexos e não estão totalmente compreendidos. Em condições de laboratório, o VEV mostra grande capacidade de alteração genética e rápida adaptação. No entanto, em condições de campo, permanece relativamente estável, com padrões evolutivos definidos por condições ecológicas semelhantes, em vez de origem geográfica ou seleção imunológica (REIS JR et al., 2009; ROZO-LOPEZ et al., 2018). Estudos de aptidão genética projetados para investigar a pressão evolutiva no genoma do VEV alternando entre ambientes celulares de insetos e mamíferos sugerem que a estabilidade das populações de campo não se deve à necessidade de o vírus restringir a adaptação entre os tipos de células hospedeiras (ROZO-LOPEZ et al., 2018).

Flores (2007) sugere que a evolução do VEV na natureza parece ser relacionada com a sua localização geográfica, pois diferentes grupos genéticos do vírus estão associados com diferentes regiões. Existem evidências de que fatores ecológicos presentes nesses locais influenciam a evolução do vírus. Isso porque, em áreas endêmicas algumas linhagens do VEV parecem ser mantidas por longos períodos de tempo em zonas ecológicas específicas. E apesar da presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes nessas populações de áreas endêmicas, alterações antigênicas relevantes não têm sido relatadas para o VSV.

O VEV é classificado em dois sorotipos, o VEV New Jersey (VEV-NJ) e o VEV Indiana (VEV-IN) os quais são semelhantes em tamanho e morfologia, e imunologicamente diferentes pois, em animais infectados geram anticorpos neutralizantes distintos. O VEV-IN possui ainda três subtipos, classificados em VEV-IN 1 (ou forma clássica), VEV-IN 2 (ou COCAL, ou Argentina) e o VEV-IN 3 (ou Alagoas) (DE STEFANO et al., 2002). Ainda que sejam distintos, nucleoproteína viral e em menor grau a proteína da matriz, são responsáveis pelas reações cruzadas entre os grupos sorológicos (ARBOLEDA et al., 2005).

Zimmer et al. (2013) sugerem que o VEV pode manter-se viável fora do hospedeiro por um tempo considerável, não necessariamente apenas em suspensão, mas também em superfícies secas, o que pode favorecer a disseminação do vírus independentemente do vetor. No entanto, apresenta sensibilidade quando exposto a altas temperaturas, sendo inativado a 55°C ou superior, além de substâncias químicas como detergentes, álcool e aldeídos.

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Histórico

A primeira descrição associada à infecção por VEV em equinos provavelmente ocorreu no sudeste dos Estados Unidos e na América Central no século XIX, quando em 1862 foi relatada a ocorrência de uma enfermidade vesicular e febril em equinos do exército americano durante a guerra civil. No entanto a primeira descrição oficial de surtos ocorreu em 1916 quando um número grande de equídeos e bovinos apresentaram lesões vesiculares. Em pouco tempo mais surtos começaram a ser descritos na região sudoeste do Estados Unidos. Porém o agente etiológico só foi descrito pela primeira vez em Indiana, recebendo então o nome de vírus da estomatite vesicular de Indiana (VEV-IN). Um ano após, um agente etiológico sorologicamente relacionado ao VEV-IN foi isolado de bovinos em New Jersey, sendo denominado, portanto, de vírus da estomatite vesicular de New Jersey (VEV-NJ). Em estudos consecutivos foi observado que esses vírus eram sorologicamente distintos e então foram classificados em sorotipos separados (FLORES, 2007).

O VSV-IN e o VSV-NJ são endêmicos no Norte e Oeste da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), na América Central até o Sul do México, com surtos descritos nessas regiões praticamente a cada ano. A maioria dos surtos (80%) é causada pelo VSV-NJ, mas o VSV-IN circula nessas áreas e, ocasionalmente, os dois sorotipos podem ser encontrados simultaneamente. No Norte do México e Sul dos EUA, a ocorrência da VEV é esporádica, com surtos descritos no sudoeste americano a intervalos de oito a 10 anos, com duração de um a dois anos (ARBOLEDA & TRUJILLO, 2002).

No Brasil o primeiro isolamento do VEV ocorreu em 1964, no Estado de Alagoas, a partir de análises do epitélio oral de equinos enfermos. Esta amostra foi classificada como Indiana 3 Alagoas por apresentar diferenças antigênicas em relação às amostras clássicas Indiana 1 e Indiana 2 (Cocal). Nesse mesmo período foram ainda relatados 40 casos em humanos que apresentavam sintomas semelhantes a um resfriado, como febre e dores de cabeça e garganta (DE STEFANO et al., 2002).

Lopes et al. (1997) relatou dados do Centro Pan-americano de Febre Aftosa, onde foram relatados vários surtos de VEV em equinos e bovinos no Brasil, nos quais, foram isolados o VEV-IN tipo 2 e 3, o primeiro nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, e o tipo 3 nos demais estados. Na região Nordeste foram relatados surtos nos estados da Bahia, Ceará, Sergipe e Piauí. Segundo De Stefano et al. (2002) a maioria dos casos no Brasil é causada pelo VEV-

IN 3, enquanto o VEV-IN 2 ocorre apenas esporadicamente, mais ao Sul do País. O VEV-IN 2 tem sido descrito ocasionalmente na Argentina, onde o último surto foi relatado em 1986.

Cargnelutti et al. (2014) descreveram surtos de EV em cavalos e bovinos nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, no nordeste do Brasil, entre junho e agosto de 2013. Os casos relatados afetaram 15 a 20 cavalos e 6 bovinos distribuídos em 6 pequenas fazendas em quatro municípios, dos quais 2 cavalos foram positivos para o VEV-IN 3.

Arruda et al. (2015) relataram que equinos com sialorréia e lesões abertas na mucosa oral e lábios foram observados e notificados ao Serviço Veterinário Oficial na Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão. Amostras de soro de equinos com sintomas de EV foram coletadas para investigação e testadas através do ELISA e por neutralização viral, as quais diagnosticaram os 6 cavalos acometidos como sororeagentes para o VEV-IN 3.

Lunkes et al. (2016) investigaram a presença de anticorpos neutralizantes contra o VEV-IN 3 em amostras de soro de 3.626 cavalos de seis estados em três regiões brasileiras: Sul (RS, n = 1.011), Centro-Oeste (GO / DF, n = 1.767) e Nordeste (PB, PE, RN e CE, n = 848) coletados entre 2013 e 2014. E detectaram anticorpos neutralizantes contra VEV-IN 3, em 641 amostras sendo 317 amostras do Ceará (87,3%); 109 do Rio Grande do Norte (65,7%) 124 da Paraíba (45,4%); 78 de Goiás/Distrito Federal (4,4%) e nove amostras do Rio Grande do Sul (0,9%). Além do mais, várias amostras do Nordeste e Centro-Oeste abrigavam altos títulos neutralizantes o que indica uma exposição recente ao vírus.

2.2.2 Transmissão e Fatores de Risco

A infecção pelo VEV em equídeos é endêmica nas Américas, sendo o VEV-IN a cepa encontrada e associada a surtos na América do Sul (DE STEFANO et al., 2002). Entretanto, a epidemiologia e a patogênese da EV ainda não estão bem esclarecidas devido as diferentes formas de transmissão em potencial do vírus, sabe-se que inclui vetores biológicos como mosquitos, moscas negras e moscas de areia, alimentos contaminados, fômites, aerossóis e contato direto com animais infectados (ROZO-LOPEZ et al., 2018).

O vírus varia com a distribuição geográfica. Os surtos VEV-NJ e VEV-IN ocorrem nas Américas do Norte, Central e do Sul. Nos EUA, o VEV-NJ já foi endêmico em grande parte do sudeste, mas é possível que agora exista apenas em um número limitado de áreas, como a ilha de Ossabaw, na Geórgia. Acredita-se que o VEV-IN 1 não seja endêmico nos EUA, mas vírus introduzidos recentemente às vezes causam surtos. VEV-IN 3 e VEV-IN 2 foram relatados apenas em partes da América do Sul (CFSPH, 2009).

Na América Central e do Sul, os surtos de EV são variáveis e frequentemente associados às transições entre as estações chuvosa e seca. Nas zonas tropicais e subtropicais, a transmissão do VEV é mais comum no final da estação chuvosa ou no início da estação seca, enquanto que, nas regiões temperadas, os surtos de EV ocorrem sazonalmente durante o verão (HANSON et al., 1968).

Segundo HANSON et al. (1957) a ocorrência sazonal de EV pode ser explicada porque em algumas regiões os surtos atingem o pico durante o verão e o outono, o que corresponde ao pico das populações de vetores, e os casos relatados geralmente param após o início do frio. Há também uma tendência para que surtos ocorram em certas áreas geográficas, particularmente perto de água corrente ou parada, que são habitats principais para moscas negras e Mosquitos *Culicoides*, respectivamente (SCHMIDTMANN et al., 1999).

Durante os surtos, o VEV se espalha rapidamente nos rebanhos de animais através do contato direto ou fômites, isso porque, os animais infectados salivam excessivamente e liberam entre 4 e 6 registros de vírus por mililitro de saliva. Essa saliva carregada de vírus e os exsudatos vesiculares contaminam facilmente as instalações e o meio ambiente, permitindo a transmissão dos animais (HANSON et al., 1957).

Zimmer et al. (2013) analisaram a sobrevivência do VEV em suspensão e superfícies secas, e observaram que o agente pode permanecer infectante fora da célula hospedeira por um tempo considerável o que representa uma fonte de infecção acidental se não forem adequadamente inativados. Isso porque, o VEV mostrou uma estabilidade notável na suspensão a 4 ° C, com os títulos dos vírus permanecendo altos por várias semanas. Em superfícies secas de poliestireno, vidro ou ácido inoxidável, o vírus permaneceu infectante por pelo menos seis dias a temperatura ambiente.

A alta estabilidade do VSV em superfícies e em suspensão pode facilitar a disseminação do vírus nos animais através de alimentação contaminada e bebedouros, mãos e equipamentos de ordenha. Esse conhecimento sobre a sensibilidade do VSV aos desinfetantes ajudará a estabelecer medidas de higiene apropriadas (ZIMMER ET AL., 2013).

Segundo Urie et al. (2018) os vetores biológicos parecem ser a principal fonte de transmissão do VEV ao relatar que cavalos com maior exposição a insetos como os presentes nas pastagens tem maior risco de infecção, essa teoria pode estar relacionada a presença de microabrasões e a atração de insetos por lesões aumentando a probabilidade da infecção e/ou aumentando a suscetibilidade a infecção, a disposição dos equídeos na pastagem também pode expô-los a outra fonte de infecção hipotética, que é a presença de material vegetal contaminado.

Arboleda et al. (2001) ao realizar um seguimento bimestral durante um ano em animais silvestres com o objetivo de determinar a porcentagem de animais infectados com o VEV em Antioquia na Colômbia, encontrou uma porcentagem de 57,14% de animais soropositivos para VEV-IN e 73,01% para o VEV-NJ e determinou que esses resultados associados aos baixos títulos de anticorpos encontrados, principalmente para o protótipo Indiana, sugerem que o ciclo de infecção na fauna silvestre não está relacionada com o ciclo dos animais domésticos. A infecção e a progressão viral em espécies vetoriais são altamente influenciadas pelo sorotipo do vírus, além de fatores ambientais, incluindo temperatura e sazonalidade; contudo, os mecanismos de transmissão viral, incluindo vias não convencionais, ainda não foram totalmente estudados (ROZO-LOPEZ et al., 2018).

2.3 Sinais Clínicos

Em humanos a doença caracteriza-se pela sintomatologia aproximadamente 48 horas após a exposição ao vírus, com sintomas semelhantes aos da gripe (CORREA et al., 1996) como faringite, dores musculares, especialmente nas pernas e globo ocular, náuseas, vômitos e dores de cabeça (QUIROZ et al., 1988).

Com a viremia primária há o aparecimento subsequente de lesões na mucosa oral, pele ao redor da boca e da coroa do casco como na febre aftosa (FA). A frequente ausência de vesículas clássicas na mucosa bucal dos animais acometidos nos surtos a campo leva as necessidades de exame cuidadoso da patogênese das lesões nas mucosas. Mesmos os casos produzidos experimentalmente, somente 30% das lesões desenvolvem-se como vesículas, o restante desidrata por percolação durante o desenvolvimento e acaba erodindo como lesão necrótica seca (RADOSTITS et al., 2002).

Nas lesões podem ocorrer infecções secundárias, levando a infecções dos tecidos do casco (SOBESTIANSKY et al., 1993). As lesões da EV típicas são as lesões de tecido epitelial, que podem ter evolução para úlceras e processos piogênicos, no caso de infecções secundárias (SOBESTIANSKY et al., 1999). De acordo com Mccluskey et al. (2012) os sinais clínicos são febre, ptialismo e lesões na mucosa oral; essa mucosa fica edemaciada, pálida e com líquido em vesículas e a superfície dorsolingual é frequentemente afetada, que também podem ocorrer na gengiva e junções mucocutâneas. A infecção reduz o consumo de alimentos e água, o que acarreta perda de peso e diminuição na produtividade (LETCHWORTH ET AL. 1999, PEREZ ET AL. 2010).

Em bovinos é comum aparecerem lesões secundárias nos tetos ocasionando mastite com perda parcial ou total da função mamaria. As lesões nos tetos estão presentes em 2 a 10% das vacas e muitos animais biungulados apresentam lesões no espaço interdigital e coroa do casco, as quais cicatrizam-se completamente em duas a três semanas (LETCHWORTH et al., 1999). Em equinos as lesões na coroa do casco são graves podendo resultar até em descolamento, dificultando a locomoção, impedindo a participação dos animais acometidos em competições (GREEN, 1993; BRIDGES et al., 1997).

Em suínos inicialmente ocorre sialorréia, febre e formação de vesícula na língua, na mucosa oral e nas patas, principalmente no epitélio da coroa do casco. O aparecimento súbito de claudicação em vários animais de um lote é característico da EV em suínos. A mortalidade é geralmente baixa e os animais se recuperam em uma ou duas semanas (SOBESTIANSKY et al., 1999).

2.4 Diagnóstico

Dentre as várias aplicabilidades da utilização de métodos diagnósticos, destacam-se as finalidades cuja empregabilidade são para: determinar a etiologia e acompanhar o curso de uma infecção; diferenciar enfermidades com sinais clínicos semelhantes; determinar o prognóstico ou conduta clínica; comercialização; programas sanitários e monitoramento da evolução genética (FLORES, 2007).

O diagnóstico de infecção pelo VEV pode ser realizado clinicamente a partir da observação dos sinais clínicos, quando presentes, associados a epidemiologia da enfermidade, no entanto vale ressaltar que, equinos infectados por esse vírus geralmente apresentam sintomatologia subclínica ou inaparente (HOWERTH et al., 2006).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outras enfermidades que cursem com lesões vesiculares, uma vez que, clinicamente são indistinguíveis (ARRUDA et al., 2015). Para bovinos e suínos as principais enfermidades associadas são a febre aftosa (quando ambos apresentam lesões) e estomatite/exantema vesicular de suínos (quando as lesões são apenas em suínos) (OIE, 2013). Embora possa suspeitar de EV quando há a presença de equinos acometidos tendo em vista que esses não são susceptíveis ao vírus da febre aftosa (URIE, et al., 2018).

Outras enfermidades que também podem ser consideradas no diagnóstico diferencial são: rinotraqueíte infecciosa bovina, febre catarral maligna, diarreia viral bovina, língua azul,

estomatite papular, ectima contagioso (RIET-CORREA et al., 1996). Porém a confirmação definitiva deve ser realizada através de análises laboratoriais (BERNINGER et al., 2018).

A escolha da técnica laboratorial varia de acordo com o material que será analisado. Para pesquisa de anticorpos (Ac) devem ser empregados métodos sorológicos como soroneutralização (SN) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (SEPÚLVEDA et al., 2007), embora a fixação do complemento (FC) e a imunodifusão em gel ágar (IDGA) também possam ser utilizados (OIE, 2018). Para pesquisa do agente viral, antígeno ou ácidos nucleicos, podem ser realizados o isolamento e identificação do vírus, SN, ELISA, FC e reação em cadeia de polimerase (PCR) (SEPÚLVEDA et al., 2007).

A escolha do teste também pode variar segundo o objetivo da pesquisa (Quadro 1). O isolamento viral só deve ser feito em situações onde os animais apresentam sintomatologia clínica compatível com VEV. As análises sorológicas para pesquisas de Ac indicam apenas uma exposição prévia sem determinar se corresponde a uma infecção presente ou passada, no entanto, pode-se estimar o tempo da exposição, uma vez que, Ac detectados pela FC indicam exposição em um tempo inferior a um ano, enquanto que, pelo teste de SN e C-ELISA podem ser detectados por anos após a exposição a infecção. A diferença de sensibilidade dos testes tem efeito na detecção durante a fase aguda, pois, a produção de Ac pode variar entre 4 a 8 dias após infecção, portanto, recomenda-se a combinação de testes e análises pareadas das amostras quando houver presença de sinais clínicos agudos de EV (OIE, 2018).

Quadro 1: Métodos de provas disponíveis para diagnóstico da estomatite vesicular e sua finalidade

MÉTODOS	OBJETIVO					
	População livre de infecção	Animal livre de infecção – prévio deslocamento	Contribuir com políticas públicas de erradicação	Confirmação de casos clínicos	Prevalência de infecção - vigilância	Status imunológico de animais individuais ou rebanhos pós vacinação*
Identificação do Agente						
Isolamento do vírus	-	+	-	+++	-	-
IS-ELISA	-	+	-	+++	-	-
FC	-	+	-	++	-	-
RT-PCR	-	+	-	++	-	-
Deteção de resposta imune						
LP-ELISA	++	+++	+++	+++	++	++
C-ELISA	+++	+++	++	-	+++	++
SN	++	+++	+++	+++	++	+++
FC	-	+	+	+++	+	-
CATEGORIAS: +++ = método recomendado; ++ = método adequado; + = pode ser usado em algumas situações (custo, confiabilidade e outros fatores devem ser levados em consideração); - = não é apropriado para este fim.						
OBSERVAÇÃO: embora nem todos os testes listados como categoria +++ ou ++ tenham sido submetidos a validação formal, sua natureza e o fato de foram amplamente utilizados sem resultados duvidosos, os tornam aceitáveis.						
*Indica apenas a presença de anticorpos e não proteção contra a infecção						

Legenda: IS-ELISA: Ensaio imunoenzimático sanduíche indireto; LP-ELISA: Ensaio imunoenzimático bloqueador de fase líquida; C-ELISA: Ensaio imunoenzimático de competitivo

Fonte: Adaptado do Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres 2019. OIE, 2018.

O ensaio imunoenzimático ELISA é um método diagnóstico cujo a técnica baseia-se na identificação de anticorpos, a partir da adição de um anticorpo conjugado com enzima, a qual irá reagir com um substrato adicionado e fazer com que o cromógeno mude de cor, essa coloração é o resultado da interação entre antígeno e anticorpo revelando assim a positividade da amostra (FLORES, 2007). O ELISA independente da variação, apresenta diagnóstico rápido, boa sensibilidade e especificidade, além de ser seu automatizável, disponibilizado em kits e não necessitar de patógenos infecciosos, podendo detectar classes específicas como IgM, e IgG

(FLORES, 2007; LEE et al., 2009). Em contrapartida, os kits comerciais são de alto custo, requer equipamentos específicos e as vezes a qualidade do antígeno é crítica.

O cELISA utiliza um antígeno N recombinante para detecção. Provou ser altamente sensível como ferramenta de triagem e detectará anticorpos precoces e duradouros. O cELISA fornece uma detecção mais precisa no nível do rebanho, mas pode não ter a capacidade de capturar níveis flutuantes de anticorpos em animais individuais e não pode distinguir entre IgM e IgG (BERNINGER et al., 2018).

O teste de SN é reconhecido como um método padrão para a detecção de anticorpos anti-VEV pelo Office Internationale des Epizooties. No entanto, é trabalhoso, requer instalações de cultura de células e leva 2 a 3 dias para ser concluído. Estes aspectos o tornam inadequado para fins de vigilância sorológica em massa. Diferentemente do ELISA que é um teste rápido e robusto, podendo ser utilizado em substituição a SN para avaliação sorológica eficiente de anticorpos anti-VEV (LEE et al., 2009).

O princípio da soroneutralização é detectar anticorpos que possuem a capacidade de neutralizar a infectividade viral, analisando um soro-suspeito (ocasionalmente pode usar outros fluidos corporais que possuam anticorpos) frente a um vírus-padrão previamente conhecido e quantificado, em placas de microtitulação, que sob microscopia ótica observa-se a presença ou não de citopatotoxicidade. A presença do tapete íntegro indica neutralização viral (amostra positiva). A produção de efeito citopático indica ausência de anticorpos neutralizantes (amostra negativa) (ARBOLEDA et al., 2001). Essa técnica é muito utilizada por ser similar a neutralização in vivo, de boa sensibilidade, custo reduzido, e de caráter quantitativo e qualitativo, entretanto, apresenta a desvantagem de ser laboriosa, utilizar vírus vivo, e detectar somente anticorpos neutralizantes (ROEHE et al., 1994; KUNRATH et al., 2004).

Allende & Germano (1993) ao investigar a presença de anticorpos do VEV-IN 3 com a finalidade de comparar técnicas diagnósticas SN e LP-ELISA em fase líquida observaram que a análise estatística dos dados indicava uma correlação muito estreita entre as duas técnicas ($K = 0,92$), no entanto, a prova de ELISA ofereceu melhor especificidade, valor preditivo e eficácia que a técnica de SN, além de apresentar a vantagem de usar um antígeno não infeccioso.

Koeckritz-Blickwede et al. (2014) compararam a técnica SN com um c-ELISA para a detecção de anticorpos contra o VEV-NJ e VEV-IN, usando 214 soros de equinos na Costa Rica. O c-ELISA detectou 109 (50,93%) soros positivos; enquanto o SN determinou um total de 138 (64,48%) para VEV-NJ. Um total de 26 (12,15%) soros testados positivos em c-ELISA; 36 (16,83%) soros foi determinado como positivo no SN para VEV-IN. E concluíram que, a técnica imunoenzimática mostrou sensibilidade moderada, em comparação com a técnica de

SN. Devido à sua execução rápida e fácil, o c-ELISA é uma importante técnica de triagem; no entanto, devido à menor sensibilidade do c-ELISA, a SN é considerada como a técnica de escolha para detectar infecções pelo VEV.

A fixação do complemento é uma técnica que permite detectar a presença de um Ac ou um antígeno específico em função da produção ou não de uma fixação do complemento o qual desencadeia uma cascata de ativações. Esse efeito dos componentes ativados do complemento (lise de eritrócitos) pode ser observado e então ser um indicativo da presença de anticorpos na amostra teste (PAULIN et al., 2002; BROOKSBY, 1949). Na ausência de Ac contra o agente, não há a ativação do complemento pela ausência de complexos antígenos-anticorpos. Apesar da boa sensibilidade e especificidade do teste, ultimamente está entrado em desuso por ser uma técnica demorada, laboriosa, não automatizável e necessitar de animais doadores de eritrócitos (FLORES, 2007).

O teste de FC é um método específico usado para confirmar interações anticorpo-antígeno recentes (presença de IgM); no entanto, o teste de FC carece de sensibilidade, pode ser trabalhoso, não pode ser usado em soros anti-complementares ou hemolisados e requer vírus vivos. O ensaio de FC pode confirmar animais recém-infectados devido à sua capacidade de detectar complexos antígeno-anticorpo, sendo considerado indicativo de IgM (BERNINGER et al., 2018).

Berninger et al. (2018) interessados em substituir o ensaio de FC por um ensaio mais sensível e específico para IgM, desenvolveram um IgM-IgG IS-ELISA de sanduíche duplo que utiliza um antígeno inteiro inativado que inclui os antígenos G e N. O novo ensaio IgM-IgG exibiu concordância justa (pontuação kappa ajustada de 48) com os ensaios convencionais e deve avaliar sua capacidade de substituir os 2 ensaios separados por um único sistema de ensaio ou sua capacidade de substituir o FC como um método mais sensível para definir animais recém-expostos.

Ao comparar o ELISA sandwich com o teste de FC para detectar sorotipos do vírus da febre aftosa e VEV-NJ e VEV-IN, observou-se que o ELISA demonstrou ser um procedimento mais satisfatório para identificação do vírus em amostras de epitélios de animais infectados pela EV, ao apresentar maior sensibilidade, proporcionando consistentemente mais animais positivos (GOMES et al., 1989).

A PCR é um método diagnóstico molecular para pesquisas de ácidos nucléicos virais na célula infectada como, um provírus (DNA) ou exsudatos que contêm partículas de vírus livres (RNA) (RAMÍREZ et al., 2013). As principais vantagens dessa técnica são a alta sensibilidade,

especificidade, e possibilidade de detectar ácidos nucleicos em amostras nas quais o vírus não permanece viável (GREGORY et al., 2009).

Sua metodologia baseia-se na amplificação de um segmento específico de DNA dentro de um genoma (gene ou parte dele, regiões supervariáveis, junk DNA, dentre outros) sem o uso de um organismo vivo. Em outras palavras, a PCR promove uma “xerox” molecular com uso da exploração da função normal da enzima Taq-polimerase (ANDRIOLI et al. 2001).

A combinação de teste foi utilizada por Arboleda et al. (2001) para realizar um acompanhamento bimestral durante um ano em animais silvestres com o objetivo de determinar por soroneutralização a porcentagem de animais infectados com o VEV em Antioquia na Colômbia, e detectar fragmentos do genoma viral por RT-PCR e PCR anidado. 57,14% dos animais foram soropositivos para VEV-IN e 73,01% para o VEV-NJ. No entanto, todas as amostras foram negativas nas provas moleculares.

Independentemente do método diagnóstico utilizado, vale ressaltar que seu desempenho depende de vários fatores como o formato do ensaio, a quantidade amostras analisadas, reagentes e antígenos, bem como as sequências avaliadas em casos de análises filogenéticas (HERRMANN-HOESING, 2010).

2.5 Profilaxia e controle

Não existe vacina ou tratamento específico para as infecções causadas pelo VEV, o que faz da profilaxia e medidas higiênico-sanitárias de manejo, ações eficazes no controle da EV e que ajudam a minimizar infecções secundárias (FREITAS, et al., 2008). Em casos de animais debilitados pode ser administrado um tratamento suporte sintomático como a oferta de alimentos de fácil apreensão e mastigação, favorecendo a recuperação das lesões na cavidade oral, ou ainda anti-inflamatórios não-esteroides podem contribuir para o bem-estar animal e a rapidez da recuperação (RADOSTITS et al., 2002).

O diagnóstico precoce é uma das principais medidas a serem adotadas numa propriedade para controlar infecções causadas pelo VEV. Mas não deve ser baseado em sinais clínicos, uma vez que animais infectados podem ser assintomáticos ou podem apresentar sintomatologia inespecífica. Dessa forma a detecção do anticorpo ou do vírus são indicados para diagnóstico precoce (BERNINGER et al., 2018).

A primeira medida a ser tomada em um programa de controle é a realização de testes diagnósticos, que apresentará um panorama da ocorrência da enfermidade e servirá de referência para a adoção de programas de controle e profilaxia (MAPA/ES, 2013). Em seguida,

as condições de biossegurança devem ser intensificadas quando houver identificações de foco numa área geográfica o que inclui, o isolamento e a restrição de trânsito animal sororeagentes, controle de vetores, limpeza e desinfecção de utensílios e/ou possíveis fômites, limpeza e desinfecção das instalações (FREITAS, et al., 2008), uma vez que, substâncias químicas podem inativar o vírus em superfícies secas e/ou molhadas (ZIMMER ET AL.,2012).

Vacinas de vírus inativadas com hidróxido de alumínio ou óleo como adjuvantes foram testados nos Estados Unidos da América e na Colômbia, respectivamente durante um surto de EV em bovinos. Ambas vacinas geraram altos níveis de anticorpos específicos nos soros dos animais vacinados. No entanto, ainda não está claro se os anticorpos séricos impediriam a doença. Uma vacina contra vírus atenuada foi usada no campo com eficácia desconhecida (RADOSTITS et al., 2002, OIE, 2018). No Brasil nenhuma vacina comercial contra a EV está disponível.

Para determinar a resposta imune humoral em porcos induzidos por uma vacina comercial de bovinos contra EV, 30 porcas comerciais foram imunizadas e mais 20 foram deixadas como controle. Todos foram medidos para títulos de anticorpos usando o teste de soroneutralização para os sorotipos VEV-IN e VEV-NJ. Os animais vacinados e não vacinados exibiram baixos títulos de anticorpos contra ambos os sorotipos antes da vacinação. No entanto, no dia 82 após a vacinação, houve um aumento notável nos títulos de anticorpos em animais vacinados para o sorotipo IN e NJ, com médias de 3,17 e 3,56, respectivamente. Para o dia 404, foi observada uma diminuição no título de anticorpos, que aumentou para o dia 599, devido ao efeito de revacinação. Os animais de controle mantiveram baixos títulos de anticorpos ao longo da experiência. Demonstrando que existe uma resposta imune humoral com diferenças estatisticamente significantes entre porcas vacinadas e não vacinadas, sem reações adversas atribuíveis à biológica, em animais inoculados (ARBOLEDA et al., 2005).

Embora tenha sido observado avanços significativos na imunização frente ao VEV, a proteção de fato não foi obtida. Portanto na ausência de vacinas eficazes, os programas de controle continuam sendo as únicas formas de evitar a infecção (OIE, 2018; MAPA/ES, 2013).

3.

3. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDE, R. & GERMANO, P.M.L. Comparison of virus neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v.12, n.3, p.849-855, 1993.

ANDRIOLI, A. Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 68 f. **Tese** (Doutorado) Programa de pós graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ARBOLEDA, J.J.; RESTREPO, G.A.; WOLFF, M.I.; URIBE, J.H.; BEDOYA, W.A.; QUIROZ, V.H.; PÉREZ, S.; MORALES, L.F.; PIEDRAHITA, I.D.; ZULUAGA, F.N.; OSSA, J. Ecoepidemiología de la Estomatitis Vesicular en un municipio cafetero de Antioquia. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v.14, n.1, p.20-27, 2001.

ARBOLEDA, J.J.; TRUJILLO, C.M. La estomatitis vesicular: algunos aspectos históricos, clínicos, eco-epidemiológicos virológicos, de prevención y control. **Revista Colombiana Ciencias y Pecuaria**, v.15, p.356-367, 2002.

ARBOLEDA, J.J.; VALBUENA, R.M.; NARANJO, N.; VELÁSQUEZ, J.I.; RODAS, J.D.; LONDOÑO, A.F.; GARCÍA, G.A. Respuesta inmune humoral de una vacuna comercial contra la estomatitis vesicular en cerdos. **Revista Colombiana de Ciencias Veterinarias**, v.18, n.2, p.115-121. 2005.

ARRUDA, R.C.N.; SEGUNDO, J.M.F.; SOARES, B.A.; MARTINS, N.R.S.; BARÇANTE, T.A.; BARÇANTE, J.M.P. Investigação epidemiológica de Estomatite vesicular por achados clínicos em bovinos e equinos no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.5, p.391-395, 2015.

BERNINGER, M.L.; O'HEARN, E.; LOMKIN, R.; NEWENS, K.; HAVAS, K.A. A post-infection serologic assessment of cattle herd immune status after a vesicular stomatitis outbreak and the agreement of antibody assays. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.30, n.4, p.510-516. 2018.

BRIDGES, V.E.; MCCLUSKEY, B.J.; SALMAN, M.D.; SCOTT HURD, H.; DICK, J. Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.211, n.5. p.556-560, 1997.

BROOKSBY, J. Differential diagnosis of vesicular stomatitis and foot-and-mouth disease. Examination of virus samples from Mexico with special reference to complement fixation. **Epidemiology and Infection**, v.47, n.4, p.384-389, 1949.

CFSPH. The Center for Food Security and Public Health. stomatitis vesicular. Acessado em 03 de fevereiro de 2020, disponível em:

http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/!replaced/!estomatitis_vesicular.pdf , 2009.

DE STEFANO, E.; ARAÚJO, W.P.; PASSOS, E.C.; PITUCO, E.M. Revisão bibliográfica: Estomatite vesicular. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.69, n.3, p.127-133, 2002.

FLORES, E.F. Diagnóstico Laboratorial de Infecções Víricas. In: FLORES, E.F. (Organizador). **Virologia Veterinária**. Santa Maria – RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, p.295-326. 2007.

FREITAS, E.B.; PACHECO, A.M.; MARIANO, R.S.G.; ZAPPA, V. Estomatite vesicular: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.11. 2008.

GOMES, M.P.D.; SONDAHL, M.S.; MARTINS, M.A.; CASAS OLASCOAGA, R.; ALONSO, A. Aplicación de la técnica inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de los virus de la fiebre aftosa y estomatitis vesicular en comparación con la prueba de fijación del complemento. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v.55, p.15-19, 1989.

GREEN, S.L. Vesicular stomatitis in the horse. Vet. Clin. North Am. **Equine Pract.**, v.9, p.349-353, 1993.

GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; HASEGAWA, M.Y.; CASTRO, R.S; RODRIGUES, J.N.M.; ARAÚJO, J.; KELLER, L.W.; DURIGON, E.L. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em amostras de leite de cabras pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e Nested-PCR. **ARS Veterinaria**, v.25, n.3, P.142-146, 2009.

HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Epizootiology de estomatite vesicular. **Sou. J. Nações de Saúde Pública Health**. v.47, p.205-209, 1957.

HANSON, R.P.; ESTUPINAN, J.; CASTANEDA, J. Estomatite vesicular nas Américas. **Fora. Int. Epizoot**. v.70, p.37-47, 1968.

HERRMANN-HOESING, L.M. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.6, p.843-855, 2010.

HOWERTH, E.W.; MEAD, D.G.; MUELLER, P.O.; DUNCAN, L.; MURPHY, M.D.; STALLKNECHT, D.E. Experimental Vesicular Stomatitis Virus Infection in Horses: Effect of Route of Inoculation and Virus Serotype. **Veterinary Pathology**, v.43, p.943-955, 2006.

ICVT - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy Acessado em 02 de fevereiro de 2020, disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, 2015.

KOECKRITZ-BLICKWEDE, M.V.; WIEDNER, G.D.; HERRERO, M.V. Comparación de la técnica seroneutralización con la inmunoenzimática competitiva en la detección de anticuerpos contra el virus de la estomatitis vesicular (serotipos New Jersey e Indiana) en equinos de Costa Rica, **Ciencias Veterinarias**, v.32, n.1, 2014.

KUNRATH, C.F.; VOGEL, F.S.F., OLDONI, I., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., DEZENGRINI, R., TORRES, F.D., & PAN, K.A. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1877-1883, 2004.

LEE, H.S.; HEO, E.J.; JEOUNG, H.Y.; KO, H.R.; KWEON, C.H.; YOUN, H.J.; KO, Y.J. Enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein and monoclonal antibody for detecting antibodies to vesicular stomatitis virus serotype New Jersey. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.5, p.667-671, 2009.

LETCHWORTH, G.J.; RODRIGUEZ, L.L.; BARRERA, J.D.C. Vesicular Stomatitis. **Vet. J.**, v.157, p.239-260, 1999.

MAPA/ES – Ministerio de Agricultura, Alimentación y medio ambiente de la España. Manual práctico de operaciones en la lucha contra la estomatitis vesicular (EV). Acessado em 28 de janeiro de 2020, disponível em: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene_ganadera/manualestomatitisvesicular_tcm30-111187.pdf , 2013.

MCCLUSKEY, B. J.; PELZEL-MCCLUSKEY, A. M.; CREEKMORE, L.; SCHILTZ, J. Vesicular stomatitis outbreak in the southwestern United States, 2012. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 25, p. 608, 2013.

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal. Vesicular Stomatitis. Acessado em 28 de janeiro de 2020. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/VESICULAR_STOMATITIS.pdf , 2013.

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Acessado em 28 de janeiro de 2020. Disponível em: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/> , 2018.

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde. 2007. Manual de Procedimentos para a Atenção às Ocorrências de Febre Aftosa e outras Enfermidades Vesiculares. Acessado em 28 de janeiro de 2020. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50426> , 2007.

PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSON, I.S.P.; TEIXEIRA, S.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos de Instituto Biológico**, v.69, n.4, p.41-47. 2002.

PEREZ, A.M., PAUSZEK, S.J., JIMENEZ, D., KELLEY, W.N., WHEDBEE, Z., RODRIGUEZ, L.L. Spatial and phylogenetic analysis of vesicular stomatitis virus overwintering in the United States. **Prev. Vet. Med.** v.93, p.258-264, 2010.

QUIROZ, E.; MORENO, N.; PERALTA, P.H.; TESH, R.B. A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.39, n.3, p. 312-314, 1988.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. Pseudo-raiva (Doença de Aujeszky). In: **Clínica Veterinária**. 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 960-962, 2002.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. **Clínica Veterinária - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAMÍREZ, H.; REINA, R.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D.; MARTÍNEZ, H.A. Review Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. **Viruses**, v.5, n.4, p.1175-1207, 2013.

REIS JR, J.L.; MEAD, D.; RODRIGUEZ, L.L.; BROWN, C.C. Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.2, n.1, p.49-58, 2009.

RIET-CORREA, F. et al. Viral diseases to be differentiated from foot-and-mouth disease. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.323-332, 1996.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.323-332, 1996.

ROEHE, P.M.; ROSA, J.C.A.; OLIVEIRA, L.G. Peste suína clássica: uma atualização em métodos de diagnóstico laboratorial. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p.423-429, 1994.

SCHMIDTMANN, E.T.; TABACHNICK, W.J.; HUNT, G.J.; THOMPSON, L.H.; HURD, H.S. Epizootico de estomatite vesicular (sorotipo de Nova Jersey) no oeste dos Estados Unidos: uma perspectiva entomológica. **J. Med. Entomol**, v.36, p.1-7, 1999.

SEPÚLVEDA, L.M.; MALIRAT, V.; BERGMANN, I.E.; MANTILLA, A.; NASCIMENTO, E.R. Rapid diagnosis of vesicular stomatitis virus in Ecuador by the use of polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.500-506, 2007.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; OLIVEIRA, S.J.; CARVALHO, L.F. **Patologia Clínica Suína**. 1ª ed. Lajeado: os autores. 350 p., 1993.

ZIMMER, B., SUMMERMATTER, K., E ZIMMER, G. Stability and inactivation of vesicular stomatitis virus, a prototype rhabdovirus. **Veterinary Microbiology**, v.162, n.1, p.78-84, 2013.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo formatado nas normas da Revista Semina Ciências Agrárias.

(ANEXO 2)

**Fatores associados à infecção pelo vírus da estomatite vesicular em equídeos no estado
do Rio Grande do Norte, Brasil**

*Factors associated with infection by the vesicular stomatitis virus in equines in the state of
Rio Grande do Norte, Brazil*

Taile Katiele Souza de Jesus¹, Diogo Diógenes Medeiros Diniz¹, Leandro Lamartine Lopes
Rocha¹, José Wilton Pinheiro Júnior¹, Eliana de Stefano², Adriana Hellmeister de Campos
Nogueira Romaldini², Huber Rizzo^{1*}

RESUMO

Objetivou-se investigar a presença do Vírus da Estomatite Vesicular (VEV) e seus potenciais fatores de risco para ocorrência e disseminação da enfermidade em equídeos das mesorregiões Leste e Oeste Potiguar do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Foram analisadas, pela técnica de virusneutralização, 809 amostras sanguíneas de equídeos provenientes de noventa propriedades de dezesseis municípios do estado durante os meses de julho de 2018 a fevereiro de 2019. Os fatores de riscos associados ao VEV foram avaliados por meio de questionário epidemiológico investigativo e os dados submetidos a análise estatística no programa EpiInfo 3.5.2 com nível de confiança de 95%. A soroprevalência de anticorpos anti-VEV foi 24,6% (199/809), sendo 3,2% (13/402) soropositivos na mesorregião Leste e 45,7% (186/407) na Oeste. Considerando os sorotipos observou-se uma prevalência de 3,8% (31/809) para Indiana 2, 24,5% (198/809) para Indiana 3 e 15,1% (30/198) de coinfeção para ambos. Todas as variáveis estatisticamente significantes foram submetidas a análise de regressão logística multivariada e concluiu-se que animais criados em áreas rurais da mesorregião Oeste, em sistemas extensivo e semi-intensivo, cujo pasto é alagado, não realizam quarentena, não desinfetam as instalações e onde os animais enfermos são mantidos no rebanho, foram

consideradas fatores de risco para infecção pelo VEV. Esses resultados demonstram que equídeos distribuídos pelo estado do Rio Grande do Norte foram expostos ao VEV e as medidas de manejo sanitário foram determinantes para a transmissão do vírus.

Palavras-chave: cavalos, doenças vesiculares, manejo sanitário, virusneutralização, sorotipo Indiana

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the presence Virus Stomatitis Vesicular (VSV) and its potential risk factors for the occurrence and dissemination of disease in Equidae from the Eastern and Western mesoregions of the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Blood samples were analyzed from 809 animals from 90 properties distributed in sixteen municipalities in the state from July 2018 to February 2019, were diagnostic by seroneutralization in microtiter plates. Risk factors were assessed using an investigative epidemiological questionnaire. The data were submitted to statistical analysis in the EpiInfo 3.5.2 program with a 95% confidence level. The occurrence of anti-VSV antibodies was 24.6% (199/809), with 3.2% (13/402) seropositive in the Eastern mesoregion and 45.7% (186/407) in the Western region. Considering the serotypes, there was a prevalence of 3.8% (31/809) for Indiana 2 and 24.5% (198/809) for Indiana 3. All statistically significant variables were subjected to multivariate logistic regression analysis and it was concluded that animals raised in rural areas of the western mesoregion, in extensive and semi-intensive systems, whose pasture is flooded, does not quarantine, does not disinfect the facilities, are raised in a communal way with small ruminants and pigs, and where the animals sick are kept in the herd, risk factors for infection by VSV-IN subtypes 1 and 2 were considered. These results demonstrate that VSV is distributed across the state of Rio Grande do Norte and control measures must be adopted to prevent its spread.

Keywords: horses, vesicular diseases, Indian, sanitary management, serum neutralization

INTRODUÇÃO

A Estomatite Vesicular (EV) é uma doença infectocontagiosa viral, de caráter zoonótico, com ocorrência em ruminantes, equídeos, porcinos e algumas espécies silvestres. O Vírus da Estomatite Vesicular (VEV) pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *vesiculovirus*, e apresenta dois sorotipos imunologicamente distintos, a cepa New Jersey (VEV-NJ) e Indiana (VEV-IN) a qual ainda é classificada em três subtipos Indiana 1 ou cepa clássica (VEV-IN 1), Indiana 2 ou COCAL ou Argentina (VEV-IN 2) e Indiana 3 ou Alagoas (VEV-IN 3) (Rozo-Lopez et al., 2018).

A EV é autolimitante, de curta duração, com baixa taxa de morbidade e mortalidade, no entanto, relevante por se tratar de uma zoonose e interferir no bem-estar animal devido a formação de vesículas com consequentes erosões e ulcerações em narinas, cavidade bucal e banda coronária dos cascos, dificultando a ingestão de alimento e a locomoção, além de servir de porta de entrada para infecções secundárias como mastite, principalmente em éguas durante a amamentação (Rozo-Lopez et al., 2018; Urie et al., 2018). A presença da enfermidade resulta em perdas econômicas devido as restrições comerciais internacionais e de movimentos locais em feiras, exposições e competições (Urie et al., 2018).

A infecção pelo VEV em equídeos é endêmica nas Américas, sendo o VEV-IN a cepa encontrada e associada a surtos na América do Sul, com o primeiro isolamento no Brasil em 1964 no Estado de Alagoas em epitélio oral de equino, onde o vírus por apresentar diferenças antigênicas do subtipo Indiana 1 e 2, foi então, classificado como Indiana 3 ou Alagoas. Nesse período foi ainda relatado casos de humanos com sintomatologia clínica da enfermidade (De Stefano et al., 2002). Outros achados na região Nordeste foram registrados nos Estados do

Ceará, Paraíba, Maranhão e Pernambuco (De Stefano et al., 2002; Arruda et al., 2015; Lunkes et al., 2016).

A epidemiologia e a patogênese da EV ainda não estão bem esclarecidas devido as diferentes vias de transmissão em potencial do vírus, sabe-se que inclui vetores biológicos como mosquitos, moscas negras e moscas de areia, vetores mecânicos como alimentos contaminada, fômites, aerossóis e contato direto com animais infectados (Rozo-Lopez et al., 2018).

Por ser economicamente importante e com consequências relevantes para a saúde pública, objetivou-se, investigar a ocorrência de anticorpos e fatores associados na infecção pelo VEV em equídeos das mesorregiões Leste e Oeste do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil (latitude $-5^{\circ}45'0''$ S, longitude $-36^{\circ}30'0''$ O), que possui 167 municípios distribuídos em 8.510.820.623 km², divididos em quatro mesorregiões; Oeste, Central, Agreste e Leste Potiguar. Possui extensa faixa litorânea e condições climáticas adversas com clima tropical na zona litoral leste e semiárido nas demais áreas do estado (IBGE, 2019).

Para o estudo foram selecionados apenas municípios, das mesorregiões Leste e Oeste Potiguar, que possuíam população mínima de quinhentos equinos registrados no Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte (IDIARN). Considerando um efetivo de 65.345 equídeos para o estado (IBGE, 2017), prevalência esperada de 50%, nível de confiança de 95% e erro estatístico de 5% (Thrusfield, 2007), foi determinada a partir do programa estatístico EpiInfo 3.5.2, uma amostragem mínima de 382 animais a serem analisadas em cada mesorregião. As amostras foram coletadas de equídeos, acima de seis meses de idade,

pertencentes a propriedades que foram selecionadas de acordo com a disponibilidade dos criadores em permitir a extração de material biológico para análise.

As coletas foram realizadas em noventa propriedades de dezesseis municípios (Figura 1) localizados nas mesorregiões Oeste e Leste Potiguar, onde obteve-se amostras sanguíneas de 809 animais (786 equinos, dezessete muares e seis asininos) por venopunção da jugular com sistema de colheita a vácuo, em tubos do tipo Vacutainer® sem anticoagulante, identificadas e acondicionadas sob refrigeração em caixa térmica para transporte a Universidade Federal Rural de Pernambuco onde, foram centrifugadas a 3.000 rpm durante dez minutos para obtenção de soro. Essas alíquotas, foram identificadas e acondicionadas em tubos de 2 ml do tipo Eppendorf® a -20°C até o processamento do teste sorológico.

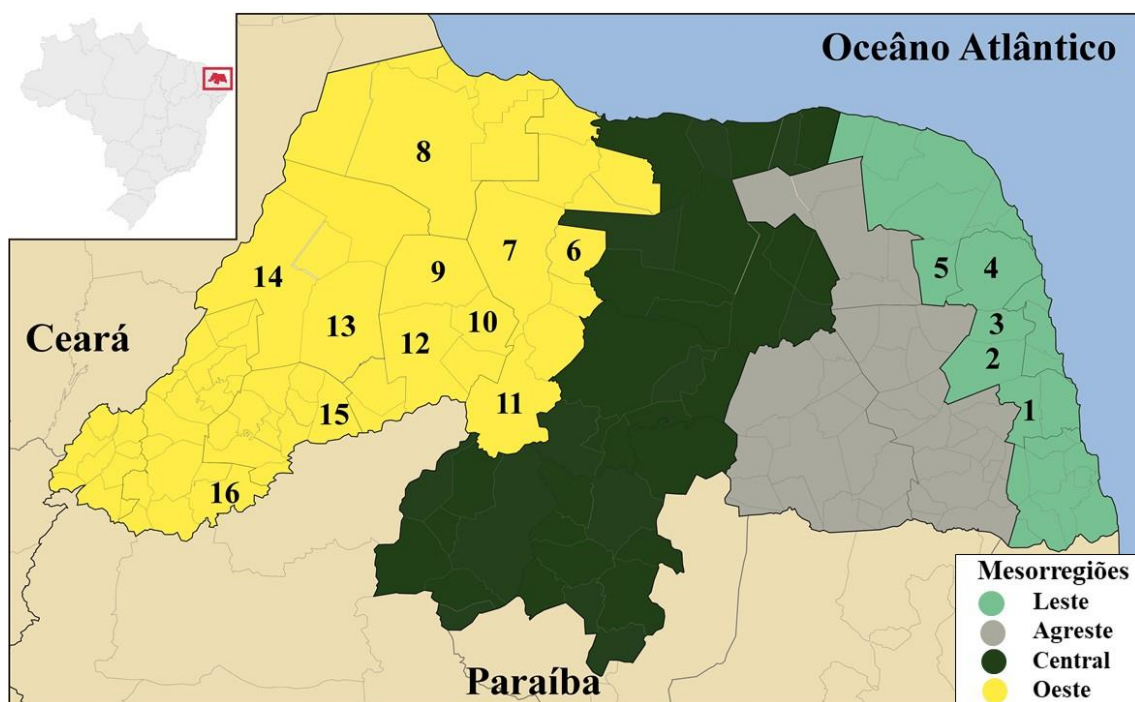


Figura 1 – Mapa do Rio Grande do Norte dividido em suas quatro mesorregiões indicando numericamente os municípios onde foi realizado coletas de sangue de equinos para realização de diagnóstico por virusneutralização para Estomatite Vesicular. Mesorregião Leste: 1- São José de Mipibú, 2- Macaíba, 3- São Gonçalo do Amarante, 4- Ceará-Mirim, 5- Taipú. Mesorregião Oeste: 6- Ipanguacu, 7- Assu, 8- Mossoró, 9- Upanema, 10- Paraú, 11- Jucurutu, 12- Campo Grande, 13- Caraúbas, 14- Apodi, 15- Patu e 16- Alexandria.

O diagnóstico sorológico do VEV foi realizado no Laboratório de Víruses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, pela técnica de virusneutralização em placas de fundo plano, de 96 cavidades, utilizando 1000 TCID₅₀ do VEV-IN e células VERO (OIE, 2018). Foram feitas diluições seriadas das amostras de soro e controles positivo e negativo iniciando-se em 1/4 (diluição final 1/8 após a mistura soro/vírus). Em seguida adicionou-se o mesmo volume da suspensão viral do IND 2 e IND 3 contendo 1000 TCID₅₀/25uL, e incubou-se a 37°C por sessenta minutos para permitir a neutralização. Posteriormente, foi adicionada a suspensão de células VERO na concentração de 3x10⁵ céls/mL em todas as placas e incubou-se por 48-72 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Foram considerados positivas as amostras com título igual ou superior a 1/32 (log 1,5).

Para análise de fatores de risco, foi aplicado questionário epidemiológico investigativo contendo perguntas relacionadas ao animal, ambiente e as formas de manejo sanitário, reprodutivo e nutricional, com intuito de caracterizar a propriedade, a vida pregressa e as condições de manutenção desses animais.

As frequências absolutas e relativas foram obtidas a partir de análise descritiva dos dados, enquanto que, a avaliação dos fatores de risco associados à infecção pelo VEV através da análise univariada das variáveis pelo teste de Qui-quadrado de Pearson cujos dados extraídos, foram submetidos a uma análise de regressão logística considerando como variável dependente para a infecção por VEV o resultado reagente ou não reagente obtido no teste de virusneutralização. Dessa forma, as variáveis independentes ou explanatórias consideradas no modelo, foram aquelas que apresentaram significância estatística <0,05 (Hosmer e Lemeshow, 1987). utilizando o programa Epi Info 3.5.2 para todas as análises.

A pesquisa foi desenvolvida mediante aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob o número de protocolo 100/2018.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência de equídeos soropositivos à infecção por VEV-IN foi de 24,6% (199/809), onde 3,2% (13/402) eram procedentes da mesorregião Leste e 45,7% (186/407) da Oeste, com 64,4% (58/90) de propriedades apresentando ao menos um animal sororeagente. Considerando seus subtipos observou-se valor nulo para VEV-IN 1, 3,8% (31/809) para VEV-IN 2 e 24,5% (198/809) para VEV-IN 3.

Estudos recentes apontam variações nas taxas de soropositividade à infecção pelo VEV na região Nordeste do Brasil. Arruda et al. (2015), apesar da pequena amostragem, obtiveram 100% (6/6) de animais soropositivos para VEV-IN 3 no estado do Maranhão, enquanto que, Lunkes et al. (2016) relataram taxas de 87,3% (317/363), 65,7% (109/166), 45,4% (124/273) e 8,7% (4/46) de VEV-IN 3 nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco respectivamente, além de Allende e Germano (1993) que detectaram a presença de 91,5% (300/328) de anticorpos neutralizantes em amostras de animais oriundos da região Nordeste. Lunkes et al. (2016) relataram ainda a prevalência de 0,9% (9/1.011) e 4,4% (78/1.767) para VEV-IN 3 nos estados do Rio Grande do Sul e Goiás/Distrito Federal.

Os protótipos do VEV-IN que foram ocasionalmente isolados no Brasil apresentam ocorrências distintas sendo o VEV-IN 3 o subtipo mais associado a surtos na região Nordeste, enquanto que o tipo 2 relatado em outras regiões do país e Argentina (Cargnelutti et al., 2014). Essa maior prevalência de casos no Nordeste pode ser explicada pelo fato da EV apresentar-se como uma enfermidade de padrão sazonal com maiores incidências nos meses de verão e estações chuvosas, que associadas as vias de transmissão da enfermidade e as características climáticas da região, possibilita a manutenção de vetores e consequente propagação do vírus (Rozo-Lopez et al., 2018).

A transmissão entre locais e em grandes áreas geográficas é especulativa, porém, acredita-se que envolva o movimento de insetos por meio dos animais ou correntes de vento. No Brasil não há relatos de infecção pelo VEV-NJ provavelmente devido ao clima, uma vez que, esse tipo é comumente encontrado em áreas de clima temperado sendo, portanto, reportado surtos em zonas da América Central, norte do México e Sul dos Estados Unidos (Urie et al., 2018).

Na análise univariada dos dados observamos que todas as variáveis de interesse e consideradas como fatores de risco foram estatisticamente significativas com base no valor de $p < 0,05$, a exceção do fator sexo (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise dos fatores de risco associadas à infecção pelo VEV em equídeos oriundos de criações do Leste e Oeste Potiguar, Rio Grande do Norte, Brasil 2018-2019

Variável	N	Positivo	Valor p
Mesorregião			
Leste	402	13 (3,23%)	
Oeste	407	186 (45,7%)	0,000
Sexo			
Macho	518	128 (24,7%)	
Fêmea	291	71 (24,4%)	0,496
Espécie			
Equino	786	190 (24,2%)	
Asinino	6	-	0,006
Muar	17	9 (52,9%)	
Exploração			
Esporte	465	151 (32,5%)	0,000
Lazer	108	29 (26,9%)	
Reprodução	7	-	
Trabalho	97	11 (11,3%)	
Reprodução/Esporte	132	8 (6,1%)	

Sistema de criação			
Intensivo	259	30 (11,6%)	
Extensivo	81	25 (30,9%)	0,000
Semi-Intensivo	469	144 (30,7%)	
Área			
Peri-urbana	73	8 (10,9%)	
Rural	561	158 (28,2%)	0,000
Urbana	175	33 (19,9%)	
Pasto alagado			
Sim	165	70 (42,4%)	0,000
Não	644	129 (20,0%)	
Tipo de cocho			
Individual	617	116 (18,8%)	
Coletivo	192	83 (43,2%)	0,000
Realiza quarentena			
Sim	62	7 (11,3%)	
Não	747	192 (25,7%)	0,005
Animais doentes mantidos no rebanho			
Sim	736	190 (25,8%)	
Não	73	9 (12,3%)	0,005
Desinfeta as instalações			
Sim	135	14 (10,4%)	
Não	674	185 (27,5%)	0,000

Todas as variáveis estatisticamente significantes foram submetidas a uma análise de regressão logística multivariada e concluiu-se que animais criados em áreas rurais (OR= 3,18; IC= 1,49–6,79) da mesorregião Oeste (OR= 25,14; IC= 14,01–45,25), em sistemas extensivo (OR = 3,40; IC= 1,85–6,24) ou semi-intensivo (OR= 3,38; IC= 2,20–5,18), cujo pasto é alagado (OR= 1,93; IC= 1,29 – 2,89), não realiza quarentena (OR= 2,71; IC= 1,21 – 6,06), não desinfeta

as instalações (OR= 3,26; IC= 1,83 – 5,82), e mantém animais enfermos no rebanho (OR= 2,47; IC= 1,20–5,06), foram consideradas fatores de risco para infecção pelo VEV.

Segundo Rozo-Lopez et al. (2018) epidemiologicamente a transmissão do VEV em zonas tropicais e subtropicais é mais comum no final da estação chuvosa ou início da estação de seca, porém, observou-se recentemente uma leve mudança em alguns surtos de VEV-NJ e VEV-IN 1 nos Estados Unidos da América onde, a propagação costuma estar mais longe do fluxo de água para regiões mais secas, sugerindo uma possível mudança nas espécies primárias de vetores, o que pode explicar o fato de a mesorregião Oeste que apresenta clima semiárido, apresentar maior ocorrência que a mesorregião Leste Potiguar de clima tropical litorâneo.

Embora os meios pelos quais o VEV é transmitido ainda não sejam totalmente compreendidos, esse comportamento aumenta a hipótese da disseminação por vetores como corrente de vento, pássaros e insetos (Bennet et al., 2008), uma vez que, o VEV já foi isolado em Culicoides como *Phlebotomus* e *Aedes* (Lunkes et al., 2016) e experimentalmente em moscas (Urie et al., 2018). Dessa forma, propriedades de zonas rurais, cujas instalações possuem pastos alagados e clima semiárido/seco, favorecem o desenvolvimento e propagação dos vetores a campo.

Levando em consideração que os equídeos são particularmente suscetíveis à infecção pelo VEV quando comparado com bovinos e suínos (Arruda et al., 2015), esse clima propício a manutenção do vetor no ambiente associado ao sistema extensivo e semi-intensivo a que os equídeos foram submetidos, facilita a infecção, propagação e manutenção do vírus no rebanho.

Segundo Urie et al. (2018) os vetores biológicos parecem ser a principal fonte de transmissão do VEV ao relatar que cavalos com maior exposição a insetos como os presentes nas pastagens possuem maior risco de infecção, essa teoria pode estar relacionada a presença de microabrasões e a atração de insetos por lesões aumentando a probabilidade e/ou a

suscetibilidade a infecção. A disposição dos equídeos em pastagens também pode expô-los a outra fonte de infecção hipotética, que é a presença de material vegetal contaminado.

O manejo sanitário também apresenta forte influência na ocorrência da EV uma vez que o contato direto de animais susceptíveis com animais infectados ou fômites como bebedouros, comedouros e baias contaminados, parecem desempenhar um papel muito importante na transmissão da doença (Zimmer, et al., 2013). Urie et al. (2018) avaliando fatores de risco para VEV observaram que cavalos sadios expostos ao mesmo ambiente que cavalos infectados apresentavam maiores chances de serem expostos ao vírus quando comparados com cavalos sadios que não mantinham contato direto com cavalos infectados (OR= 17,6, IC=1,8–71,2), corroborando com os achados nesse estudo ao observar que animais enfermos mantidos no rebanho e/ou que não eram submetidos a quarentena predispõe outros animais.

Nesse estudo observou-se também que a não realização de limpeza das instalações também foi um fator de risco a infecção pelo VEV. Zimmer et al. (2013) sugerem que a alta estabilidade do VEV em superfícies e em suspensão pode facilitar a sua disseminação nos animais por meio de fômites e que quanto maior o tempo de manutenção do vírus fora da célula, maior o risco de exposição ao mesmo, além de, favorecer a disseminação independente do vetor.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que equídeos distribuídos pelo estado do Rio Grande Norte foram expostos ao VEV, sendo a precariedade do manejo sanitário, o fator chave determinante para ocorrência da infecção.

REFERÊNCIAS

ALLENDE, R.; GERMANO, P.M.L. Comparison of virus neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. *Revue Scientifique et Technique*, v. 12, n. 3, p. 849-855, 1993.

ARRUDA, R.C.N.; SEGUNDO, J.M.F.; SOARES, B.A.; MARTINS, N.R.S.; BARÇANTE, T.A.; BARÇANTE, J.M.P. Investigação epidemiológica de estomatite vesicular por achados clínicos em bovinos e equinos no Estado do Maranhão. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 391-395, 2015.

BENNETT, K. E.; HOPPER, J.E.; STUART, M.A.; WEST, M.; DROLET, B.S. Blood-feeding behavior of vesicular stomatitis virus infected *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 45, n.5, p. 921-926, 2008.

CARGNELUTTI, F. J.; OLINDA, R.G.; MAIA, L.A.; AGUIAR, G.M.N.; NETO, E.G.M.; SIMÕES, S.V.D.; LIMA, T.G.; DANTAS, A.F.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIET-CORREA, F. Outbreaks of Vesicular Stomatitis Alagoas vírus in horses and cattle in northeastern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 26, n. 6, p. 788-794, 2014.

DE STEFANO, E.; ARAÚJO, W.P.; PASSOS, E.C.; PITUCO, E.M. Estomatite Vesicular: Revisão Bibliográfica. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 3, p. 127-133, 2002.

HOSMER D.W.; LEMESHOW S. 1987. Applied logistic regression. 2ed. New York: Wiley-Interscience Publication.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama 2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ranking – Rebanho efetivo do Estado do Rio Grande do Norte. 2017.

LUNKES, V. L.; TONIN, A.A.; MACHADO, G.; CORBELLINI, L.G.; DIEHL, G.N.; SANTOS, L.C.; BEZERRA, C.S.; AZEVEDO, S.S.; PEQUENO, N.B.; SILVA, A.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Antibodies against vesicular stomatitis virus in horses from southern, midwestern and northeastern Brazilian States. *Ciência Rural*, v. 46, n. 8, p. 1424-1429, 2016.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018.

ROZO-LOPEZ, P.; DROLET, B.S.; LONDOÑO-RENTERIA, B. Vesicular stomatitis virus transmission: A comparison of incriminated vectors. *Insetos*, v. 9, n. 4, p. 190, 2018.

URIE, N. J.; LOMBARD, J.E.; MARSHALL, K.L.; DIGIANANTONIO, R.; PELZEL-MCCLUSKEY, A.M.; MCCLUSKEY, B.J.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; KOPRAL, C.A.; SWENSON, S.L.; SCHILTZ, J.J. Risk factors associated with clinical signs of vesicular stomatitis and seroconversion without clinical disease in Colorado horses during the 2014 outbreak. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 156, p. 28-37, 2018.

THRUSFIELD, M.V. Veterinary epidemiology. 3ª ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2007. 610p

ZIMMER, B.; SUMMERMATTER, K.; ZIMMER, G. Stability and inactivation of vesicular stomatitis virus, a prototype rhabdovirus. *Veterinary Microbiology*, v.162, n. 1, p. 78-84, 2013.

5. ANEXOS

5.1 Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Convidamos o (a) Sr (a) _____ para participar do projeto de pesquisa "Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da estomatite vesicular em equídeos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.". Sob a responsabilidade do professor Dr. Huber Rizzo a qual pretende aplicar um questionário sobre a forma de criação do rebanho e coletará sangue para diagnosticar a presença de anticorpos para os agentes infecciosos citados acima. Sua participação com seu(s) animal(is) ou propriedade é voluntária e se dará por meio de permitir.

Se aceitar participar, os resultados decorrentes do estudo com seu(s) animal (is) estará contribuindo para a formação de médicos veterinários. Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase do projeto, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá despesas e também não receberá remuneração. Os dados coletados durante a visita serão analisados e repassados a (o) Sr (a), e se de interesse científicos publicados, mas sua identidade e de seu(s) animal (is) não será (ão) divulgada(s), sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o professor no endereço: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, CEP: 52171-900, pelo telefone (81) 3320-6431.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre projeto de pesquisa "Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo vírus da estomatite vesicular em equídeos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil"., que o professor quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Este documento foi emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

Impressão do dedo polegar

(caso não saiba assinar)

Assinatura do Pesquisador Responsável

Pasto alagado?

Sim b) Não

Tipo de cocho?

Individual b) Coletivo

5.3 Anexo 3: Normas da revista

Diretrizes para autores

Atenção: Devido a uma grande quantidade de artigos recebidos para avaliação, informações sobre a Revista Semina: Ciências Agrárias (todas as áreas: Agronomia; Zootecnia; Medicina Veterinária e Tecnologia de Alimentos) disponíveis INDISPONÍVEL para receber novos artigos no período de: 01 de DEZEMBRO de 2019 a 28 de FEVEREIRO de 2020.

Observe que, a partir de 27/03/2019, o Journal adotou as normas da American Psychological Association (APA). Recomendamos que os autores consultem as diretrizes e o último volume publicado (v. 41, n. 1, 2020). Submissões que não estiverem em conformidade com esta Norma Internacional serão devolvidas aos autores para a devida adaptação.

Após 28/02/2020, a taxa de envio de novos artigos será de US \$ 110,00. Se o item for rejeitado, essa taxa não será devolvida.

Obs : SUBMISSÕES TAXAS WILL NOT SER DEVOLVIDAS E OS MANUSCRITOS NÃO ACEITE PARA PUBLICAÇÃO.

Os artigos submetidos após 28/02/2020, aceitos e aprovados para publicação, estarão sujeitos a uma Taxa de Publicação, ajustada de acordo com o número de páginas do manuscrito.

Se a 10 páginas : **R \$ 400,00** 11 a 15 páginas: **R \$ 500,00** 16 a 20 páginas: **R \$ 600,00** 21 a 25 páginas: **R \$ 700,00**

Se o artigo for aceito para publicação, o valor de R \$ 110,00 pago pela **taxa de inscrição não será deduzido da taxa de publicação** .

A **prova de depósito** deve ser digitalizada e anexada como um arquivo suplementar no sistema eletrônico.

Padrões editoriais para publicação em *Semina: Ciências Agrárias*, Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Os artigos podem ser enviados em português ou inglês, mas serão publicados apenas em inglês . Os artigos submetidos em português, se aceitos para publicação, deverão ser **traduzidos para o inglês**.

Todos os artigos, depois de aceitos para publicação, devem ser acompanhados de um certificado de tradução ou correção (como arquivo suplementar) de um dos seguintes serviços de tradução:

[American Journal Experts](#)

[Editage](#)

[Elsevier](#)

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

<https://www.traduzoo.com/>

O autor principal deve anexar o **documento que fornece evidências** dessa tradução ou correção no sistema eletrônico na página de envio em "**Documentos. Sup** .

COMENTÁRIOS:

1) Os manuscritos originais submetidos para revisão são avaliados inicialmente pelo Comitê Editorial da *Semina: Ciências Agrárias* . Nesta avaliação, serão avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como o escopo do

artigo, adequação aos padrões da revista, qualidade da redação e fundamentação teórica. Além disso, também é considerada atualização da revisão de literatura, consistência e precisão da metodologia, contribuição dos resultados, discussão dos dados observados no estudo, representação de tabelas e figuras e originalidade e consistência das conclusões.

Se o número de manuscritos submetidos exceder a capacidade de avaliação e publicação de *Semina: Ciências Agrárias*, será feita uma comparação entre as submissões, e os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição ao conhecimento científico serão direcionados a consultores ad hoc. Os manuscritos que não são aprovados por esses critérios são arquivados, enquanto os demais são submetidos a avaliação por pelo menos dois consultores científicos especialistas na área de assunto do manuscrito, sem identificação dos autores. A taxa de inscrição não será devolvida aos autores que tenham seus manuscritos arquivados.

2) Quando apropriado, se o projeto de pesquisa que originou o artigo foi realizado de acordo com os padrões técnicos de biossegurança e ética, sob aprovação de um comitê de ética envolvendo seres humanos e / ou comitê de ética envolvendo animais, o nome da comissão, a instituição e o número do processo devem ser declarado.

OS MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITOS QUANDO:

a) O arquivo do artigo principal em anexo contém os nomes dos autores e suas respectivas afiliações.

b) O **registro completo** de todos os autores não foi adicionado aos metadados durante o envio; por **exemplo** Nome completo; Instituição / Afiliação; País; Resumo da Biografia / Título / Função.

c) O texto explicativo da relevância do trabalho (importância e distinção dos trabalhos publicados anteriormente), com um comprimento máximo de 10 linhas,

não está incluído no campo COMENTÁRIOS AO EDITOR.

d) A submissão não é acompanhada de um documento comprovativo do pagamento da taxa de submissão como um arquivo suplementar nos "**Documentos. Sup**".

e) O artigo principal não é acompanhado por arquivos suplementares, incluindo gráficos, figuras, fotos e outros documentos, EM SUA VERSÃO ORIGINAL (formatos JPEG, TIFF ou EXCEL).

f) As seguintes informações não estão incluídas no manuscrito original: título, resumo, palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

RESTRICÕES POR ÁREA ASSINADA:

PARA O CAMPO DE AGRONOMIA, OS MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITOS EM CASO DE SEGUINTE:

a) Os experimentos realizados com uma cultura *in vitro* limitam-se à melhoria de protocolos já padronizados ou não fornecem novas informações sobre a área temática;

b) Os experimentos de campo não incluem dados correspondentes a pelo menos dois anos ou localizações diversas no mesmo ano;

c) Os experimentos se referem apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos e abióticos de estresse fisiológico;

d) Os experimentos envolvem apenas bioensaios (triagem) sobre a eficácia de métodos para controlar insetos, ácaros ou doenças em plantas, a menos que contenham uma contribuição importante sobre os mecanismos de ação sob a perspectiva de uma fronteira de conhecimento; ou

e) O objetivo é limitado ao registro da ocorrência de uma espécie de praga ou patógeno ou associação com hospedeiros em novos locais dentro de regiões geográficas onde a espécie já é conhecida. A documentação de espécies

ou associações já conhecidas somente será considerada se descritas em novas áreas ecológicas. Os registros de distribuição devem ser baseados em ecossistemas e não em limites políticos.

PARA O DOMÍNIO VETERINÁRIO , OS MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITOS NO CASO DO SEGUINTE:

a) A publicação de relatos de casos é restrita; somente artigos com grande relevância e originalidade que contribuam de maneira real para o avanço do conhecimento em campo serão selecionados para processamento.

Categorias de trabalho

a) Artigos científicos: máximo de 20 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas

b) Comunicações científicas: máximo de 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas, duas figuras ou uma combinação de uma tabela e uma figura

c) Artigos de revisão: máximo de 25 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas

Apresentação do Trabalho

Artigos originais, comunicações, relatos de casos e revisões devem ser escritos em português ou inglês, usando o Microsoft Word para Windows, em papel A4, com linhas numeradas por página, espaçamento 1,5 entre linhas, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, Margens de 2 cm em todos os lados, com as páginas numeradas no canto superior direito e seguindo as diretrizes para o número máximo de páginas de acordo com a categoria da obra.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas devem ser numeradas com algarismos arábicos, incluídas no final do trabalho imediatamente após as referências bibliográficas e citadas no texto. Além disso, as figuras devem ser de boa qualidade e anexadas em seu formato original (JPEG, TIFF, etc.) no Docs Sup na página de envio. Figuras e

tabelas não serão aceitas se não atenderem às seguintes especificações: largura de 8 cm ou 16 cm e altura máxima de 22 cm. Se a figura tiver dimensões maiores, ela será reduzida durante o processo editorial para as dimensões mencionadas acima.

Nota : Figuras (por exemplo, **Figura 1. Título**) e tabelas (**Tabela 1. Título**) devem ter uma largura de 8 cm ou 16 cm e uma altura máxima de 22 cm. Aqueles com maiores dimensões serão reduzidos durante o processo editorial para as dimensões acima mencionadas. Para tabelas e figuras que não sejam o trabalho original do autor, é obrigatória a citação à fonte consultada. Coloque esta citação abaixo da tabela ou figura e indique usando uma fonte menor (Times New Roman 10).

Ex: " **Fonte**": IBGE (2017)
ou **Fonte** : IBGE (2017).

Preparação do manuscrito

Artigo científico:

Os artigos científicos devem relatar resultados de pesquisas originais nas áreas relacionadas, com as seções organizadas da seguinte maneira: Título em inglês; Título em português; Três a cinco destaques; Resumo em inglês com palavras-chave (máximo de seis palavras, em ordem alfabética); Resumo em português com palavras-chave (máximo de seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Materiais e métodos; Resultados e discussão; Conclusões; Reconhecimentos ; Fornecedores, se aplicável; e referências bibliográficas. Os títulos devem estar em negrito sem numeração. Se for necessário incluir um subtítulo em uma seção, ele deverá ser colocado em itálico e, se houver outros subtópicos a serem incluídos em um subtítulo, eles deverão ser numerados com algarismos arábicos. (Exemplo: **Materiais e Métodos** , *As áreas de estudo , 1. área rural , 2. Urban uma rea .*)

O trabalho enviado não pode ter sido publicado em outro lugar com o mesmo

conteúdo, exceto na forma de Resumo em Eventos Científicos, Notas Introdutórias ou Formato Reduzido.

O trabalho deve ser apresentado na seguinte ordem:

1. Título do trabalho, acompanhado da tradução para o português, se for o caso.

2. Três ou cinco destaques, consiste em pontos orientados a resultados que fornecem aos leitores uma visão geral das principais descobertas do seu artigo. Cada destaque deve ter 85 caracteres ou menos.

3. Resumo e Palavras-chave: Um resumo informativo com no mínimo 200 palavras e no máximo 400 palavras deve ser incluído, no mesmo idioma utilizado no texto do artigo, acompanhado de uma tradução em inglês (*Resumo e Palavras-chave*) se o texto não foi escrito em inglês.

4. Introdução: A introdução deve ser concisa e conter apenas a revisão estritamente necessária para introduzir o tópico e apoiar a metodologia e discussão.

5. Materiais e Métodos: Esta seção pode ser apresentada de maneira contínua, descritiva ou com subtítulos para permitir ao leitor entender e poder repetir a metodologia citada com ou sem o apoio de citações bibliográficas.

6. Resultados e Discussão : *Esta seção* deve ser apresentada com clareza, com o auxílio de tabelas, gráficos e figuras, para que não suscite perguntas ao leitor sobre a autenticidade dos resultados e pontos de vista discutidos.

7. Conclusões: *Estes* devem ser claras e apresentadas de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

8. Agradecimentos : Pessoas, instituições e empresas que contribuíram para o trabalho devem ser mencionadas no final do texto, antes da seção Referências Bibliográficas.

Nota:

Notas: Cada nota referente ao corpo do texto deve ser indicada com um símbolo sobrescrito imediatamente após a frase a que se refere e deve ser incluída como uma nota de rodapé no final da página.

Figuras: Devem ser inseridas no final do artigo, uma em cada página, após as referências. As figuras consideradas essenciais serão aceitas e deverão ser citadas no texto por ordem numérica, em algarismos arábicos. Se alguma ilustração enviada já tiver sido publicada, a fonte e a permissão para publicação devem ser declaradas.

Tabelas: devem ser inseridas no final do artigo, uma em cada página, após as referências. As tabelas devem ser acompanhadas por um cabeçalho que permita a compreensão dos dados coletados sem a necessidade de usar o corpo do texto como referência.

Quantidades, unidades e símbolos:

a) Os manuscritos devem estar de acordo com os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais para cada área de estudo.

b) Use o Sistema Internacional de Unidades em todo o texto.

c) Use o formato de potência negativa para observar e apresentar unidades relacionadas: por exemplo, kg ha^{-1} . Não use o símbolo de barra para relacionar unidades: por exemplo, kg / ha .

d) Use um espaço simples entre as unidades: g L^{-1} , não gL^{-1} ou gL^{-1} .

e) Use a representação horária de 24 horas com quatro dígitos para as horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações no autor no texto

As Regras da APA usam o sistema de data do autor para citações indiretas, ou seja, o sobrenome, a vírgula e o ano de publicação do autor. O número da página é inserido apenas quando houver uma citação direta. Nesse caso, o sobrenome

do autor citado, vírgula, ano, vírgula seguido de "p". E o número da página

Quando nas citações, os autores estão fora dos parênteses, use sempre "e" (português); "And" (inglês) e "y" (espanhol); separar o penúltimo do último autor citado. O "&" é sempre inserido entre o penúltimo e último autor quando citado entre parênteses e referências.

Citação:

Obra de dois autores: nomeie os dois autores na frase de sinalização ou parênteses cada vez que citar o trabalho. Use a palavra "e" entre os nomes dos autores no texto e use o e comercial entre parênteses.

Ex:

Os resultados de Wegener e Petty (1994) confirmaram que ...
(Wegener & Petty, 1994)

Trabalho de três a cinco autores : liste todos os autores na frase sinalizadora ou **Figura**

Estilos básicos de citação no texto

entre parênteses na primeira vez que você citar a fonte. Use a palavra "e" entre os nomes dos autores no texto e use o e comercial entre parênteses.

Ex:

Almeida, Parisi e Pereira (1999, p. 379)
ou Almeida, Parisi e Pereira (1999, pp. 372-373)
ou (Almeida, Parisi e Pereira, 1999, p. 73)

Kernis, Cornell, Sun, Berry e Harlow (1993)
(Kernis, Cornell, Sun, Berry e Harlow, 1993)

Nas citações subseqüentes, use apenas o sobrenome do primeiro autor, seguido de "et al". na frase de sinalização ou entre parênteses.

(Kernis et al., 1993)

Exemplo : **modelo de citação com um, seis ou mais autores**

1

Tipo de citação	Frase de sinal		Referência Parêntese	
	1 st Uso de Fonte	Uso subsequente da Fonte	1 st Uso de Fonte	Uso subsequente da Fonte
1-2 autores	Minosso e Toso (2019)	Minosso e Toso (2019)	(Minosso & Toso, 2019)	(Minosso & Toso, 2019)
3-5 autores	Lopes, Meier e Rodrigues (2019)	Lopes et al. (2019)	(Lopes, Meier e Rodrigues, 2019)	(Lopes et al., 2019)
6 ou mais autores	Werner et al. (2017)	Werner et al. (2017)	(Werner et al., 2017)	(Werner et al., 2017)
Organização com abreviação identificável	Instituto Brasileiro de Ciência e Tecnologia (IBICT) (2018)	IBICT (2018)	(Instituto Brasileiro de Ciência e Tecnologia [IBICT], 2018)	(IBICT, 2018)
Organização sem abreviação	Simplesmente Gatos (2019)	Simplesmente Gatos (2019)	(Simplesmente gatos, 2019)	(Simplesmente gatos, 2019)

Duas ou mais obras do mesmo autor no mesmo ano - use letras minúsculas (a, b, c) com o ano para ordenar as entradas na lista de referência. Use as letras minúsculas com o ano na citação no texto.

Ex: (Porter, 1999a, 1999b, 1999c)

Autores com o mesmo sobrenome: Para evitar confusão, use as primeiras iniciais com os sobrenomes.

(E. Johnson, 2001; L. Johnson, 1998)

Dois ou mais trabalhos do mesmo autor com datas de publicação diferentes. (Ordem cronológica)

Ex: Segundo Porter (1986, 1991, 1999, 2000),

Exemplo de referência:

Todos os autores participantes de um estudo referenciado devem ser mencionados, independentemente do número de participantes .

Artigo:

Berndt, TJ (2002). Qualidade da amizade e desenvolvimento social. *Instruções atuais em Ciência Psicológica*, 11, 7-10.

Mais de um autor - Liste seus sobrenomes e iniciais. Use o e comercial em vez de "&".

Adair, JG e Vohra, N. (2003). A explosão de conhecimento, referências e citações: a resposta única da psicologia a uma crise. *American Psychologist*, 58 (1), 15-23. doi: 10.1037 / 0003-066X.58.1.15

Pereira, GP, Sequinato, L., Caten, A., & Mota, M. (2019). Refletância espectral VIS-NIR para discretização de solos com alto teor de areia. *Semina: Ciências Agrárias*, 40 (1), 99-112. doi: 10.5433 / 1679-0359.2019v40n1p99

Wegener, DT e Petty, RE (1994). Gestão do humor em estados afetivos : a hipótese da contingência hedônica. *Journal of Personality and Social Psychology*, 66, 1034-1048. doi: 10.1037 / 0022-3514.66.6.1034

Artigo Eletrônico:

Santos, CP & Fernandes, DH von der (2007). A recuperação de serviços e seu efeito na confiança e na lealdade do cliente. *RACetronica*, 1 (3), 35-51. Recuperado em http://anpad.org.br/periodicos/content/frame_base.php?revista=3

Livro

Kashdan, T. e Biswas-Diener, R. (2014). *A vantagem do seu lado sombrio*. Nova York, NY: Hudson Street Press.

Capítulo de livro

Serviss, GP (1911). Uma viagem de terror. Em *A Columbus of space* (pp. 17-32). Nova York, NY: Appleton.

Capítulo do livro eletrônico

Shuhua, L. (2007). A noite do meio do outono. Em JSM Lau e H. Goldblatt (Eds.), *The Columbia Anthology of Modern Chinese Literature* (pp. 95-102). Nova York, NY: Columbia University Press. Recuperado de <https://www.worldcat.org/title/columbia-anthology-of-modern-chinese-literature / oclc / 608153696>

Anais / Anais

Costa, ER e Boruchovitch, E. (2001). Entendendo as relações entre estratégias de aprendizagem e a ansiedade. *Anais da XXXI Reunião Anual de Psicologia* (p.203). Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Psicologia.

Tese e / ou dissertação impressa

Leon, ME (1998). *Uma análise de redes de cooperação entre pequenas e empresas de mídia do setor de telecomunicações*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Tese ou dissertação eletrônica

Hirata, CA (2016). *Microbiologia agrícola, Microorganismos do solo, Fungos micorrízicos, Microorganismos fixadores de nitrogênio, Ecologia microbiana*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. Recuperado de <http://www.bibliotecadigital.uel.br>

Organização como Autor

Associação Americana de Psiquiatria. (1988). *DSM-III-R, Manual de diagnóstico e estatística de transtorno mental* (3a ed. Rev.). Washington, DC: Autor.

Lei

Lei n. 11.638, de 28 de setembro de 2007. Altera e revoga dispositivos da Lei n. 6.404, de 15 de dezembro de 1976, e da Lei n. 6.385, de 7 de dezembro de 1976, e se estende para as grandes sociedades de porte médio, associadas à elaboração e divulgação de finanças financeiras. Recuperado em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11638.htm

A precisão e adequação das referências de trabalhos consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e declarações, são de inteira responsabilidade dos autores.

Nota : Consulte as edições publicadas recentemente da **Semina: Ciências Agrárias** para obter mais detalhes sobre como formatar referências no artigo.

As demais categorias de trabalhos (Comunicação e Revisão Científica) devem seguir os padrões acima mencionados, mas com as seguintes

orientações adicionais para cada categoria:

Comunicação científica

As comunicações científicas devem ser apresentadas de forma concisa, mas com uma descrição completa do termo pesquisa ou pesquisa em andamento (nota introdutória), com documentação e metodologias bibliográficas completas, semelhante a um artigo científico regular. As comunicações científicas devem conter as seguintes seções: Título (em português e inglês); Resumo com palavras-chave em português; Resumo com palavras-chave em inglês; e Corpo do texto. O corpo do texto não deve ser dividido em seções, mas deve seguir esta sequência: introdução, metodologia, resultados e discussão (tabelas e figuras podem ser incluídas), conclusão e referências bibliográficas.

Artigos de revisão bibliográfica

Os artigos de revisão devem envolver tópicos relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por edição é limitado, e os autores só podem escrever artigos de revisão de interesse para a revista, após um convite dos membros do conselho editorial da revista. Se um artigo de revisão for enviado por um autor, é necessária a inclusão de resultados relevantes do autor ou do grupo envolvido no estudo, juntamente com referências bibliográficas que demonstrem experiência e conhecimento sobre o tópico.

Um artigo de revisão deve conter as seguintes seções: Título (português e inglês); Resumo com palavras-chave em português; Resumo com palavras-chave em inglês; Desenvolvimento do tópico proposto (o texto pode ser dividido em seções, mas isso não é necessário); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se aplicável); e referências bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos artigos depende da opinião favorável dos consultores ad hoc

e da aprovação do Conselho Editorial da *Semina: Ciências Agrárias* UEL.

2. As reimpressões não serão entregues aos autores, pois as edições estarão disponíveis on-line no site da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

3. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do manuscrito para a revista. A reprodução dos artigos só é permitida quando a fonte é citada. É proibido o uso comercial da informação.

4. Questões imprevistas ou problemas nas presentes normas serão tratadas pelo Conselho Editorial da área em que o artigo foi submetido para publicação.

5. *O número de autores:* Não há limite para o número de autores, mas as pessoas incluídas como co-autores devem ter participado efetivamente do estudo. Pessoas com participação limitada no estudo ou na preparação do artigo devem ser citadas na seção Agradecimentos, assim como as instituições que concederam bolsas de estudo e outros recursos financeiros.

6. Inclua o ORCID de todos os autores aprovados para publicação. O identificador ORCID pode ser obtido no registro ORCID. Você deve aceitar os padrões para a apresentação do ID ORCID e incluir o URL completo (por exemplo, <http://orcid.org/0000-0002-1825-0097>).

Condições de envio

Como parte de nosso processo de envio, os autores devem verificar se o envio está em conformidade com todos os itens listados abaixo. Submissões que não estiverem em conformidade com as normas serão rejeitadas e os autores informados sobre a decisão.

1. Os autores devem declarar que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em nenhum outro local; qualquer exceção deve ser

justificada nos "Comentários ao editor".

2. Os autores também devem declarar que o material está formatado corretamente e que os Documentos Complementares estão anexados, CONSCIENTE de que o **formato incorreto resultará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DO Mérito**.
3. **Os dados de autoria de todos os autores devem ser inseridos no campo Metadados durante o processo de envio**.

Use o botão " **incluir autor** ".

1. **Na etapa a seguir, preencha os metadados em inglês.**

Para incluir os dados, depois de salvar os dados de envio em português, clique em " **editar metadados** " na parte superior da página. Mude o idioma para inglês e insira o título em inglês, o resumo e as palavras-chave. Salve e continue na próxima etapa.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e do Word usando a opção "Propriedades" para garantir os critérios de anonimato da revista, caso o artigo seja submetido à revisão por pares, de acordo com as instruções disponíveis em Assegurando uma revisão por pares.
2. Os arquivos para envio devem estar no formato Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB).

O texto deve ser digitado em papel A4, com linhas numeradas, espaçamento de 1,5 e fonte Times New Roman tamanho 11.

1. Confirme se todos os padrões éticos foram seguidos se a pesquisa foi realizada com seres vivos. Inclua documentos de prova de aprovação por um comitê de ética institucional envolvendo seres humanos e / ou um comitê

- de ética envolvendo animais, se esses documentos forem solicitados.
2. **Inclua o pagamento da taxa de envio e anexe o comprovante de pagamento como um documento suplementar em " Documentos. Sup .**
 3. **Declaração de direitos autorais**
 4. A **Declaração de direitos autorais** de artigos publicados nesta revista é de direito do autor. Como os artigos publicados nesta revista são de acesso aberto, os artigos podem ser usados livremente, com suas atribuições, para fins educacionais e não comerciais.
 5. A revista tem o direito de fazer alterações em nível normativo, ortográfico e gramatical nos artigos originais, para manter o uso padrão adequado do idioma e a credibilidade da revista. No entanto, o estilo de escrita dos autores será respeitado.
 6. Alterações, correções ou sugestões em nível conceitual, quando necessário, serão direcionadas aos autores.
 7. As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de responsabilidade exclusiva.
 8. **Política de Privacidade**
 9. Os nomes e afiliações relatados nesta revista são usados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para nenhum outro fim ou para terceiros.

Condições de envio

Como parte de nosso processo de envio, os autores são obrigados a garantir que o envio esteja em conformidade com todos os itens listados abaixo. As submissões que não estiverem em conformidade com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Os autores afirmam que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em outra revista; qualquer exceção deve

ser justificada nos "Comentários ao editor".

2. Os autores afirmam que o material está formatado corretamente e que os Arquivos Complementares foram carregados, CONSCIENTE de que o **formato incorreto resultará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DO Mérito .**
3. **Na próxima etapa, preencha os metadados em inglês.**

Para incluir metadados, depois de salvar os dados do envio em português, clique em "**editar metadados**" na parte superior da página. Mude o idioma para inglês e insira o título em inglês, o resumo e as palavras-chave. Salve e vá para a próxima etapa.

1. **Os dados de autoria de todos os autores devem ser preenchidos durante o processo de envio.**

Use o botão "**incluir autor.**"

1. Verifique se a **identificação de autoria** do trabalho foi removida do arquivo e do Word usando a opção Propriedades para garantir os critérios de anonimato da revista se o artigo for submetido à revisão por pares, de acordo com as instruções disponíveis em Assegurando uma revisão por pares .
2. Os arquivos para envio estão nos formatos Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB).

O texto é escrito com espaçamento de 1,5 linha e na fonte Times New Roman tamanho 11. Use itálico em vez de sublinhado (exceto para endereços URL).

O texto segue os padrões de estilo e os requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para autores](#), sob o título "Sobre a revista".

1. Confirme se todos os padrões éticos foram seguidos se a pesquisa foi realizada com seres

vivos. Forneça documentação sobre a aprovação de um comitê de ética institucional e prova de consentimento informado, se esses documentos forem solicitados. A conformidade com os preceitos éticos aplicáveis deve ser citada no corpo do texto.

2. Um texto indicando a relevância do trabalho (importância e distinção em relação a outros trabalhos já publicados), com um comprimento máximo de 10 linhas, deve ser incluído no campo **COMENTÁRIOS AO EDITOR**.

Declaração de direitos autorais

A **Declaração de direitos autorais** de artigos publicados nesta revista é de direito do autor. Como os artigos publicados nesta revista são de acesso aberto, os artigos podem ser usados livremente, com suas atribuições, para fins educacionais e não comerciais.

A revista tem o direito de fazer alterações em nível normativo, ortográfico e gramatical nos artigos originais, para manter o uso padrão adequado do idioma e a credibilidade da revista. No entanto, o estilo de escrita dos autores será respeitado.

Alterações, correções ou sugestões no nível conceitual, quando necessário, serão direcionadas aos autores. Nestes casos, após serem cobrados, os artigos serão submetidos a uma nova avaliação.

As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de responsabilidade exclusiva.

Política de Privacidade

Os nomes e afiliações relatados nesta revista são usados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para nenhum outro fim ou para terceiros.

Eles devem estar destacados e em negrito? Ou deveria ler apenas "Os títulos devem estar em negrito"?

Parece que esta frase e a seguinte (depois de "1") talvez devam ser trocadas para maior clareza, da seguinte maneira:

Usando as etapas a seguir, preencha os metadados em inglês.

1. Use o botão "incluir autor".

Por favor, reveja os títulos e a ordenação / numeração dos passos nesta seção para garantir que os passos estão numerados claramente na ordem em que os autores devem seguir.

Como uma indicação indica "caso o artigo seja submetido a uma revisão por pares", parece desnecessário incluir (por exemplo: artigos) aqui. Por favor, considere excluir isso.

Deve haver um item numerado separado com uma explicação dos taxa de submissão? Em caso afirmativo, forneça as informações apropriadas. Se não, considere excluir isso.

Lista de verificação de preparação para envio

Como parte do processo de envio, os autores devem verificar a conformidade do envio com todos os itens a seguir e os envios podem ser devolvidos aos autores que não seguirem essas diretrizes.

1. A contribuição é original e inédita e não está sendo considerada para publicação em outro periódico; caso contrário, deve ser justificado em "Comentários ao Editor".
2. Informações que o texto está formatado corretamente e que o Material Complementar será carregado, TENDO EM CONTA que formatação incorreta implicará em um SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO
3. Os arquivos de submissão estão no formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB).

O espaçamento entre linhas deve ser definido como 1,5; a fonte é Time New Roman, tamanho 11; usa itálico em vez de sublinhado (exceto para endereços de URL);

O texto segue o estilo e os requisitos de referência aplicáveis em "Orientações dos autores", na seção "Sobre o periódico".

4. **Na etapa subsequente, os metadados devem ser selecionados em português.**

- o **Para** incluir, depois de salvar os dados de submissão em inglês, clique em "editar metadados" no topo da página - mude o idioma para o português e insira: título em português, resumo e palavras-chave. Salve e continue com a próxima etapa.

5. As informações de autoria para todos os autores devem ser mantidas no momento da submissão.

Use a opção " **incluir autor.** "

6. A identidade do autor foi removida do arquivo e a opção "Propriedades" no Word, assim como os requisitos de confidencialidade da revista são atendidos, caso seja enviada para revisão por pares (por exemplo, manuscritos), de acordo com as instruções listadas em "Garantindo a Cegueira". Revisão por pares. "

7. Declaro que todos os regulamentos éticos foram seguidos, no caso de pesquisas com organismos vivos, e você pode encontrar documentos que demonstrem relatórios do Comitê de Ética e do Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido, caso sejam solicitados. O cumprimento dos princípios éticos deve ser citado no texto.

8. Nos Comentários do Editor, os autores precisam adicionar três possíveis revisores médicos. Nome, instituição e email precisam ser adicionados.

9. **Taxa de submissão de artigos**

Aviso de direitos autorais

O Copyright dos manuscritos publicados pertence ao periódico. Como são publicados em um periódico de acesso aberto, estão disponíveis gratuitamente, para uso privado ou para fins educacionais e não comerciais.

A revista tem o direito de fazer, nenhum documento original, altera as normas lingüísticas, ortografia e gramática, com o objetivo de garantir as normas padrão do idioma e a credibilidade da revista. No entanto, respeite o estilo de escrita dos autores.

Quando necessário, alterações conceituais, correções ou sugestões serão encaminhadas para autores. Nesses casos, o manuscrito deve ser submetido a uma nova avaliação após a revisão.

A responsabilidade pelas opiniões expressas nos manuscritos é autorizada pelos autores.

Declaração de privacidade

Os nomes e endereços de e-mail inseridos neste site da revista serão usados exclusivamente para os fins declarados desta revista e não serão disponibilizados para nenhuma outra finalidade ou para terceiros.