

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Vinícius Leobet Lunkes**

**ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR  
EM AMOSTRAS DE SORO EQUINO E BUBALINO**

Santa Maria, RS  
2016

**Vinícius Leobet Lunkes**

**ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM  
AMOSTRAS DE SORO EQUINO E BUBALINO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Orientador: Prof. Rudi Weiblen**

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lunkes, Vinícius Leobet

Anticorpos contra o vírus da estomatite vesicular em amostras de soro equino e bubalino / Vinícius Leobet Lunkes.-2016.

50 f.; 30cm

Orientador: Rudi Weiblen

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. Sorologia 2. Zoonose 3. Doença vesicular 4. Febre aftosa 5. Bubalus bubalis I. Weiblen, Rudi II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Vinícius Leobet Lunkes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

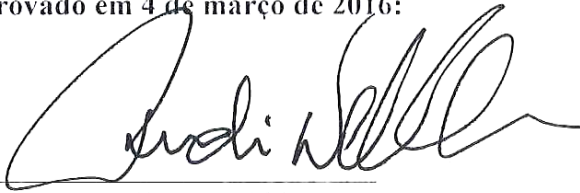
E-mail: vini.lunkes@gmail.com

Vinícius Leobet Lunkes

**ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM  
AMOSTRAS DE SORO EQUINO E BUBALINO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

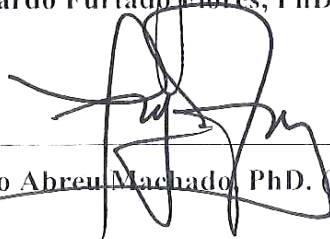
Aprovado em 4 de março de 2016:



**Rudi Weiblen, PhD.**  
(Presidente/Orientador)



**Eduardo Furtado Flores, PhD. (UFSM)**



**Sergio Abreu Machado, PhD. (UNOESC)**

Santa Maria, RS

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meus pais Romeu e Noemi, pelo apoio para a realização dos meus estudos.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, não só pela oportunidade de estudar em um curso de pós-graduação de alta qualidade, mas também pela oportunidade de emprego nesta instituição de ensino.

Agradeço ainda aos meus orientadores prof. Rudi Weiblen e prof. Eduardo Furtado Flores, que abriram as portas para a minha entrada no laboratório.

Aos colegas do Setor de Virologia, entre estagiários, bolsistas, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos que auxiliaram com a realização deste trabalho e propiciaram bons momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de alta qualidade, com uma infra-estrutura que permite a realização da pesquisa em sua totalidade.

Às Secretarias de Agricultura dos Estados envolvidos, pelo fornecimento das amostras.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

### ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM AMOSTRAS DE SORO EQUINO E BUBALINO

AUTOR: VINÍCIUS LEOBET LUNKES

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

O vírus da estomatite vesicular (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) é o agente de doença vesicular que afeta várias espécies, e que em suínos e ruminantes é clinicamente confundível com a febre aftosa. Além de ruminantes domésticos, a infecção pode ocorrer em outras espécies, incluindo equinos e bubalinos. Capítulo 1 descreve a investigação da presença de anticorpos neutralizantes contra o VSV Indiana III (VSIV-3) em amostras de soro de 3626 equinos de seis estados das regiões Sul (Rio Grande do Sul - RS, n=1011), Centro-oeste (Goiás e Distrito Federal - GO e DF, n=1767) e Nordeste (Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará - PE, PB, RN e CE, n= 848) coletadas entre 2013 e 2014. Anticorpos neutralizantes contra o VSIV-3 em títulos iguais ou superiores a 40 foram detectados em 641 amostras (17,7%), sendo 317 do CE (positividade de 87,3%); 109 do RN (65,7%); 124 da PB (45,4%); 78 de GO/DF (4,4%) e em nove amostras do RS (0,9%). Uma parcela das amostras dos estados do Nordeste e Centro-oeste apresentou altos títulos neutralizantes, indicando exposição recente ao vírus. Já as amostras do RS apresentaram títulos baixos de anticorpos, indicando provável exposição temporalmente remota. Quando testadas contra outros sorotipos do VSV (Indiana I e New Jersey) várias amostras apresentaram atividade neutralizante, porém em títulos muito inferiores, indicando a especificidade dos anticorpos para o VSIV-3. O Capítulo 2 descreve a investigação de anticorpos neutralizantes contra o VSIV-3 em amostras de soro de 758 búfalos do Rio Grande do Sul (RS, n=281), Rondônia (RO, n=294) e Minas Gerais (MG, n=183). Anticorpos neutralizantes contra o VSIV-3 em títulos iguais ou superiores a 40 foram detectados em 20 amostras (2,6%), sendo três do RS (positividade de 1,0%); uma de RO (0,3%) e em 16 amostras de MG (6,0%), geralmente em títulos baixos. Algumas amostras positivas também reagiram com outros sorotipos do VSV, porém em títulos inferiores. Estes resultados demonstram circulação relativamente recente do VSIV-3 em várias regiões do Brasil, sobretudo em estados do Nordeste, e circulação em baixos níveis de VSIV-3 em búfalos nos Estados estudados, confirmando relatos clínicos e demonstrando a importância sanitária desta infecção.

**Palavras-chave:** Sorologia. Zoonose. Doença vesicular. Febre aftosa. *Bubalus bubalis*.

## ABSTRACT

### ANTIBODIES AGAINST VESICULAR STOMATITIS VIRUS IN SERA FROM EQUINE AND BUBALINE

AUTHOR: VINÍCIUS LEOBET LUNKES  
ADVISER: RUDI WEIBLEN

Vesicular stomatitis virus (VSV) is the agent of vesicular disease that affects many species, and in pigs and ruminants may be clinically confused with the FMD. In addition to domestic ruminants, VSV may infect a variety of species, including water buffaloes and horses. Chapter 1 described the investigation of neutralizing antibodies against VSV Indiana III (VSIV-3) in serum samples of 3626 horses of six states in the South (Rio Grande do Sul - RS, n = 1011), Midwest (Goiás and Distrito Federal - GO and DF, n = 1767) and Northeast ( Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará - PE, PB, RN and CE, n = 848) collected between 2013 and 2014. Neutralizing antibodies against VSIV-3 were detected in 641 samples (17.7%), 317 from CE (87.3%); 109 from RN (65.7%); 124 from PB (45.4%); 78 from GO / DF (4.4%) and nine samples of RS (0.9%). A portion of the samples of the states of the Northeast and Midwest showed high neutralizing titers, indicating recent exposure to the virus. As for the RS samples showed low antibody titers, indicating remote display. When tested against other serotypes of VSV (Indiana I and New Jersey) several samples showed neutralizing activity, but at much lower titles, indicating the specificity of the antibodies for VSIV-3. Chapter 2 describes an investigation of neutralizing antibodies against VSIV-3 in serum samples of 758 water buffaloes of Rio Grande do Sul (RS, n = 281), Rondonia (RO, n = 294) and Minas Gerais (MG, n = 183). Neutralizing antibodies against VSIV-3 in titers equal to or higher than 40 were detected in 20 samples (2.6%), three RS (positivity of 1.0%); one from RO (0.3%) and 16 samples from MG (6.0%), usually in low titers. Some positive samples also reacted with other VSV serotypes, yet at lower titles. These results demonstrate a relatively recent circulation VSIV-3 in various regions of Brazil, especially in Northeastern states and circulation of VSIV-3 at low levels in water buffaloes in the studied States, confirming clinical reports and demonstrating the sanitary importance of this infection.

**Keywords:** Serology. Zoonosis. Vesicular disease. Foot-and-mouth disease. *Bubalus bubalis*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Distribution of neutralizing antibody titers to *VSIV-3* *2013SaoBento/ParaibaE* in horses of different Brazilian states. 30



## LISTA DE TABELAS

### **CAPITULO 1**

TABELA 1	- Results of virus-neutralizing tests against vesicular stomatitis virus - VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE – in sera of horses of different Brazilian states.....	29
----------	--	----

### **CAPITULO 2**

TABELA 1	- Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes frente ao VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE em amostras de soro de búfalos de acordo com o Estado de origem.....	40
----------	---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. CAPÍTULO 1 - Antibodies against vesicular stomatitis virus in horses from southern, midwestern and northeastern Brazilian states.....	16
Introduction.....	19
Materials & Methods.....	21
Results & Discussion.....	22
Conclusion.....	25
References.....	25
3. CAPÍTULO 2 - Anticorpos contra o vírus da estomatite vesicular em soro de bubalinos do Rio Grande do Sul, Rondônia e Minas Gerais.....	32
Introdução.....	34
Material & Métodos.....	35
Resultados & Discussão.....	36
Conclusão.....	38
Referências.....	38
4. DISCUSSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da estomatite vesicular (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus*. Além de importância econômica para animais de produção, o VSV possui importância sanitária, pois causa doença confundível com a febre aftosa (*Foot and mouth disease*, FMD) em ruminantes e suínos (RODRIGUEZ et al., 2012). O VSV infecta naturalmente uma variedade de mamíferos, incluindo equinos, bovinos, suínos, mamíferos silvestres e também o homem. Segundo a OIE (2010), os equinos são particularmente susceptíveis à infecção pelo VSV em comparação com ruminantes e suínos. Ovelhas e cabras são consideradas mais resistentes e são raramente afetadas (RODRÍGUEZ, 2002). A infecção pelo VSV ocorre de forma endêmica nas Américas, sendo restrita ao hemisfério ocidental (LETCHWORK et al., 1999). O VSV geralmente não causa doença vesicular nas infecções humanas, e o quadro clínico é semelhante à gripe ou mesmo cursa com infecção assintomática (LICHTY et al, 2004).

O VSV possui dois sorogrupos antigenicamente distintos: New Jersey (VSNJV) e Indiana (VSIV). O sorogrupo VSNJV está disseminado na região centro-sul dos Estados Unidos. O sorogrupo VSIV possui subtipos antigenicamente distintos: Indiana I (VSIV-1-amostra clássica), Indiana II (VSIV-2 Cocal e Argentina) e Indiana III (VSIV-3 - Alagoas). Os subtipos VSIV-2 e VSIV-3 têm sido ocasionalmente isolados no Brasil, sendo que o subtipo VSIV-3 tem sido mais restrito à região Nordeste (NE) do país (CARGNELUTTI et al., 2014, ROSENDO et al, 2013). Isolados do sorotipo VSNJV e VSIV-1 são endêmicos em rebanhos do sul do México, América Central, Venezuela, Colômbia, Equador e Peru, sendo o VSNJV envolvido com a maioria dos casos, com atividade esporádica no norte do México e oeste dos Estados Unidos. Segundo o ICTV (2014), existem cerca de 20 outros subtipos que ainda não foram caracterizados.

A estomatite vesicular (VS) geralmente possui ocorrência sazonal, ocorrendo com mais frequência após a temporada de chuvas em regiões de clima tropical (OIE, 2010). Os surtos geralmente ocorrem após as chuvas e diminuem durante as semanas quentes de verão, reaparecendo após as chuvas de outono (DE STEFANO et al., 2002). Tal comportamento tem sugerido a disseminação pelo vento, pássaros e insetos vetores (TESH et al., 1970).

A aglomeração de animais em feiras, exposições, centrais de inseminação (OKUDA et al., 2003) e outros eventos parece facilitar a transmissão e disseminação do vírus entre animais susceptíveis (RODRIGUEZ et al., 2012). Fatores de manejo e do hospedeiro têm sido associados com a doença clínica e animais e incluem o uso de pastagens grosseiras e concentrados peletizados, resíduos alimentares em cochos, movimentos de animais, más condições de piso e falta de higiene na ordenha, alta produção leiteira e baixo período de lactação (HANSEN et al, 1985). Tais fatores resultam ou facilitam a formação de lesões nas mucosas, favorecendo a infecção dos estratos dérmicos, e a transmissão por meio da contaminação de cochos.

Evidências epidemiológicas que fortalecem a transmissão vetorial do VSV incluem descobertas de que a presença de potenciais vetores, aumento das populações de mosquitos, proximidade de animais à água corrente e falta de utilização de abrigos estão associados com um risco aumentado de VS (VANLEEUEWEN et al, 1995; HURD et al, 1999). Ainda, fatores como a relação entre a estação do ano e a ocorrência de surtos contribuem para a suspeita de transmissão vetorial (MCCLUSKEY & MUMFORD, 2000). Tendo em vista a suspeita de ser uma doença transmitida por mosquitos, a presença de água é necessária para permitir o ciclo de vida do artrópode. Índices pluviométricos acima da média podem fornecer muitos locais potenciais para reprodução viral e, portanto, maiores populações de vetores artrópodes, e aumentando a população de insetos no ano seguinte. Além disso, condições topográficas como a presença de rios e lagos (DUARTE, 2008) em locais com surtos de VS corroboram para a importância da transmissão do VSV. Acredita-se que a presença desses rios e lagos influenciaria no ciclo reprodutivo dos mosquitos, prováveis transmissores do agente. Além disso, a manutenção destes animais em abrigos protegidos dos insetos diminui a ocorrência de VS (DUARTE, 2008). Ainda, a distribuição de focos da doença tem um padrão irregular (MASON, 1978), onde muitas vezes propriedades vizinhas à infectada não apresentam casos. Tal padrão é epidemiologicamente importante na diferenciação entre surtos de VS e FMD, que apresenta distribuição regular dos casos.

Três fatores sugerem que a VS seja transmitida por insetos: a ocorrência ligada a estações do ano, a grande distribuição de vetores e a forma de disseminação. Em períodos de alta temperatura, que propiciam o ciclo de desenvolvimento dos mosquitos, favorecem a ocorrência da VS. Além disso, há grande quantidade de espécies de insetos presentes durante esses períodos de calor intenso, que infestam animais de produção. Risco de infecção com o

VSV parece estar associado com a elevação em relação ao nível do mar. Em um estudo realizado na Costa Rica, a maior probabilidade de detecção de anticorpos era em rebanhos localizados de 500 a 1.500 metros acima do nível do mar (ATWILL et al., 1993). A ocorrência estacional da doença e a distribuição geográfica aleatória sugerem transmissão por insetos. O VSIV-1 já foi insulado de mosquitos coletados na selva (YUILL, 1981) e de mosquitos coletados nos Estados Unidos (SUDIA et al., 1967). A replicação do vírus e a transmissão pela picada foram demonstrados em mosquitos (TESH et al., 1971) e altas taxas de transmissão vertical (transovariana) também foram encontrados (TESH et al., 1972). A infecção subclínica é mais provável pela transmissão por meio de artrópodes (MEAD et al., 2004), portanto, animais com anticorpos mas sem infecção produtiva ainda são considerados em risco de transmissão de VSV e estão sujeitos a restrições no comércio e movimentação (TESH, 1994).

A infecção causa um período febril curto, com baixa mortalidade (SCHMITT, 2002), tendo um período de incubação de 24 a 48 horas. A doença caracteriza-se principalmente por lesões vesiculares na cavidade oral, língua, tetos e na banda coronária de bovinos, suínos e equinos (RODRIGUEZ et al., 2012). Na maioria dos casos, a resolução ocorre em 7 a 10 dias (DE STEFANO et al., 2002). Animais infectados apresentam anticorpos neutralizantes que podem permanecer por 8 a 10 anos. Entretanto, a reinfeccção pelo VSV pode ocorrer mesmo na presença de altos títulos de anticorpos (SCHMITT, 2002). Não obstante, a maioria das infecções pelo VSV é subclínica (SCHMIDTMANN et al., 1999). A recuperação completa ocorre em cerca de duas a três semanas após a formação de vesículas, entretanto, a ocorrência de infecções secundárias é comum e pode levar a laminite em equinos, formação de cicatrizes em tetos ou mastite em bovinos (OIE, 2010).

Altos títulos de vírus são encontrados nas margens das lesões e no fluido vesicular logo após a infecção (FENNER, 1993). Viremia não é detectável em animais de produção, porém, já foi descrita em morcegos e em ratos-veadeiros (DONALDSON, 1970; CORNISH, 2001), indicando que estes animais podem atuar como reservatórios do agente.

A VS é clinicamente muito semelhante à febre aftosa, o que torna imprescindível o diagnóstico diferencial com brevidade. O diagnóstico da VS pode ser realizado por isolamento viral ou por provas sorológicas, como o ensaio imunoenzimático, a soroneutralização (SN) e a fixação de complemento (FERRIS & DONALDSON, 1988; ALONSO FERNANDEZ et al., 1991). O isolamento viral pode ser realizado em células de

linhagem de primata (Vero), camundongo (BHK-21) ou suíno (IB-RS-2), ou em cultivos primários, e a identificação da replicação viral pode ser realizada pela visualização de efeito citopático característico. Para tal, pode ser utilizado material das vesículas, tanto epitélio como líquido vesicular e refrigerado (OIE, 2010).

No Brasil, a presença de anticorpos contra o VSV tem sido detectada em várias espécies animais. Inquéritos sorológicos demonstraram a circulação do vírus em morcegos e macacos, no Estado da Bahia (ANDRADE et al, 1981). ALLENDE & GERMANO (1993) comparando duas técnicas de diagnóstico analisaram 305 amostras de soro de bovinos, equinos e suínos de áreas endêmicas no Brasil e detectaram 300/305 (98,40%) animais soropositivos para o VSIV-3 pela técnica de SN. CUNHA et al. (2009) pesquisaram a prevalência de anticorpos para diversos agentes virais em equinos e encontraram 21% de positividade para o VSIV-2 (Cocal) e 5% para VSIV-3 (Alagoas) no sul do Estado de São Paulo. DE STEFANO et al. (2003) detectaram 2,5% de amostras de bovinos positivas para VSIV-1. Tendo em vista que o VSIV-1 tem uma distribuição mais limitada no Brasil, é possível que o trabalho tenha subestimado títulos de anticorpos, tendo em vista a baixa reatividade sorológica entre os sorotipos. É importante observar que CUNHA et al. (2009) encontraram resultados semelhantes para VSIV-3 em equinos no Estado de São Paulo. Recentemente, anticorpos foram detectados em amostras de soro de bubalinos do Estado de São Paulo (KLEIN et al., 2014; KLEIN et al., 2015), indicando circulação viral nessa espécie.

A participação de animais selvagens no ciclo da doença já foi estudada (STALLKNECHT et al., 1993) e acredita-se que estes animais possam atuar como amplificadores do vírus pela sua excreção viral duradoura, servindo de fonte de infecção para mosquitos. A impossibilidade de demonstrar a viremia nestes animais ainda é um argumento contra um ciclo de transmissão baseado em artrópodes. Apesar de transmissão viral por artrópodes já ter sido demonstrada em outros vírus, como o vírus *Thogoto* e o vetor *Rhipicephalus appendiculatus* (JONES et al., 1990), esta forma de infecção ainda precisa ser demonstrada no VSV. A circulação de VSV já foi detectada em roedores, na Costa Rica (JIMENEZ et al., 1996) e postula-se que a ingestão de grama contaminada com saliva infectada ou ingestão de artrópodes contaminados, ou ainda pela picada de insetos seja responsável pela infecção. A presença de anticorpos neutralizantes em espécies selvagens pode determinar alguns denominadores comuns para identificação de reservatórios em potencial ou partes do ciclo de transmissão da VS. A transmissão de um vírus transmitido por

artrópodes para outro mosquito já foi demonstrada, sem ocorrer soroconversão do hospedeiro (JONES et al., 1987)

Para um vírus ser mecanicamente transmitido por insetos, ao menos dois fatores devem ser considerados: deve haver quantidade suficiente de vírus no sangue, vesículas ou pele e o vírus deve apresentar alguma resistência às condições ambientais (SMITH et al., 2009). O período virêmico de um hospedeiro vertebrado é determinado pela interação entre hospedeiro e patógeno, e geralmente é muito mais longo que o período de alimentação do inseto. O VSV já foi isolado de um grande número de espécies de insetos, tanto hematófagos como não hematófagos, como simulídeos, flebotomíneos e culicídeos (COMER et al., 1990). Apesar de a replicação ter sido demonstrada em flebótomos infectados, acredita-se que os insetos atuem como vetores mecânicos do VSV. Foi sugerido que altos títulos virais na pele associados com lesões vesiculares podem ser a fonte para a transmissão do vírus a insetos vetores (STALLKNECHT et al., 1993). Surtos frequentemente ocorrem de forma simultânea em uma ampla região geográfica (FRANCY et al., 1998).

O primeiro isolamento do VSV no Brasil foi realizado em 1964, no Estado de Alagoas, a partir do epitélio oral de equinos doentes (ANDRADE et al., 1980). O vírus isolado foi denominado VSIV-3 Alagoas, em virtude de diferenças antigênicas dos sorogrupos VSIV-2 e VSIV-3. Em Minas Gerais, no Município de Araçuaí, ARAÚJO et al. (1977) relataram o isolamento do tipo VSIV-3 em bovinos. Em 1984 no Estado de Sergipe, ALONSO FERNANDES & SÖNDAHL (1985) isolaram também o tipo VSIV-3 em equinos. Vírus pertencente ao sorotipo VSIV-3 foi isolado em bovinos no município de Pombal, na Paraíba (CLEMENTINO et al., 2014). ARRUDA et al. (2015) isolaram vírus do sorotipo VSIV-3 em amostras de bovinos no Estado do Maranhão. A maior parte dos relatos de isolamentos de VSV é em equinos e bovinos, ressaltando a importância destes animais no ciclo da doença. Um número reduzido de isolamentos foi realizado a partir de ovelhas e cabras, ressaltando a menor adaptação do agente a essas espécies.

Vários focos de VS foram relatados na região Nordeste e Centro-oeste do Brasil (ROSENDO et al., 2013; CARGNELUTTI et al., 2014; CLEMENTINO et al., 2014). Boletins da PANAFTOSA (2015) também indicam atividade viral endêmica em estados do Nordeste nos últimos anos, em países na fronteira com o Brasil, sendo o VSNJV o sorotipo mais comumente isolado fora do Brasil. Em 2013, surtos de VS foram relatados em equinos e

bovinos de seis propriedades de quatro municípios nos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, nos quais foi identificado o sorogrupo VSIV-3 (CARGNELUTTI et al., 2014).

A circulação do VSV nos Estados do Nordeste nos últimos anos, com surtos relatados em equinos e bovinos, motivou a realização deste trabalho. Em um primeiro estudo (CAPÍTULO 1), investigou-se a presença de anticorpos neutralizantes contra o VSV em equinos de Estados do NE e também do centro-oeste e sul do país. Um segundo estudo investigou a presença de anticorpos contra o VSV em bubalinos – espécie também susceptível ao vírus - do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Rondônia (CAPÍTULO 2).



## 2. CAPÍTULO 1

**Antibodies against vesicular stomatitis virus in horses from southern,  
midwestern and northeastern Brazilian states.**

Vinícius Leobet Lunkes<sup>I</sup> Alexandre Alberto Tonin<sup>I</sup> Gustavo Machado<sup>II</sup> Luis  
Gustavo Corbellini<sup>II</sup> Gustavo Nogueira Diehl<sup>III</sup> Lucila Carboneiro dos Santos<sup>III</sup>  
Camila de Sousa Bezerra<sup>IV</sup> Sérgio Santos de Azevedo<sup>IV</sup> Nebson Fernandes  
Pequeno<sup>V</sup> Adriana Moraes da Silva<sup>VI</sup> Rudi Weiblen<sup>I</sup> Eduardo Furtado Flores<sup>I</sup>

(Artigo submetido à revista *Ciência Rural* – 2015)

**Antibodies against vesicular stomatitis virus in horses from southern, midwestern and northeastern Brazilian states.**

Vinícius Leobet Lunkes<sup>I</sup> Alexandre Alberto Tonin<sup>I</sup> Gustavo Machado<sup>II</sup> Luis Gustavo Corbellini<sup>II</sup> Gustavo Nogueira Diehl<sup>III</sup> Lucila Carboneiro dos Santos<sup>III</sup> Camila de Sousa Bezerra<sup>IV</sup> Sérgio Santos de Azevedo<sup>IV</sup> Nebson Fernandes Pequeno<sup>V</sup> Adriana Moraes da Silva<sup>VI</sup> Rudi Weiblen<sup>I</sup> Eduardo Furtado Flores<sup>I</sup>

**ABSTRACT.** - Lunkes V.L., Tonin A.T., Machado G., Corbellini L.G., Diehl G.N, dos Santos L.C., Bezerra C.S., Azevedo S.S., Pequeno N.F., Silva A.M., Weiblen R, Flores E.F. 2015

**ABSTRACT**

Vesicular stomatitis virus (VSV) is the agent of a vesicular disease that affects many animal species and which, in ruminant and swine, may be clinically confused with foot-and-mouth disease. Horses are especially susceptible to VSV and may act as sentinels for virus circulation. The present study investigated the presence of neutralizing antibodies against VSV Indiana III (VSIV-3) in 3626 sera of horses from six states in three Brazilian regions: Southern (RS, n = 1011), Midwest (GO/DF, n = 1767) and Northeast (PB, PE, RN and CE, n = 848) collected between 2013 and 2014. Neutralizing antibodies against VSIV-3 (titers  $\geq$  40) were detected in 641 samples (positivity of 17.7%; IC<sub>95%</sub>:16,45% - 18,96%), being 317 samples from CE (87.3%; IC<sub>95%</sub>: 83,35%-90,48%); 109 from RN (65.7%; IC<sub>95%</sub>: 57,84%-72,73%); 124 from PB (45.4%; IC<sub>95%</sub>: 39,44%-51,53%); 78 from GO/DF (4.4%; IC<sub>95%</sub>: 3,52%-5,50%) and nine samples of RS (0.9%; IC<sub>95%</sub>: 0,4%-1,7%). Several samples from the

<sup>I</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com). \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup> Laboratory of Veterinary Epidemiology, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>III</sup> Secretary of Agriculture, Livestock and Agribusiness of State of Rio Grande do Sul (SEAPA-RS), Brazil, Av. Getúlio Vargas, 1384, CEP 95150-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>IV</sup> Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos - PB

<sup>V</sup> Laboratório Veterinária Diagnóstico Ltda, Catolé do Rocha - PB

<sup>VI</sup> Laboratório de Virologia Faculdades Integradas UPIS, Brasília, DF

Northeast and Midwest harbored high neutralizing titers, indicating a recent exposure to the virus. In contrast, samples from RS had low titers, possibly due to a past remote exposure. Several positive samples presented neutralizing activity against other VSV serotypes (Indiana I and New Jersey), yet in lower titers, indicating the specificity of the response to VSIV-3. These results demonstrate a relatively recent circulation of VSIV-3 in northeastern Brazilian states, confirming clinical findings and demonstrating the sanitary importance of this infection.

**Key words:** serology, differential diagnosis, foot-and-mouth disease, zoonosis, vesicular disease.

## RESUMO

O vírus da estomatite vesicular (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) é o agente de doença vesicular que afeta várias espécies, e que em suínos e ruminantes é clinicamente confundível com a febre aftosa. Os equinos são particularmente susceptíveis ao VSV, servindo de sentinelas para a circulação viral. O presente trabalho investigou a presença de anticorpos neutralizantes contra o VSV Indiana III (VSIV-3) em amostras de soro de 3626 equinos de seis estados das regiões Sul (RS, n=1011), Centro-oeste (GO e DF, n=1767) e Nordeste (PE, PB, RN e CE, n= 848) coletadas entre 2013 e 2014. Anticorpos neutralizantes contra o VSIV-3 em títulos iguais ou superiores a 40 foram detectados em 641 amostras (17,7%; IC<sub>95%</sub>: 16,45% - 18,96%), sendo 317 do CE (positividade de 87,3%; IC<sub>95%</sub>: 83,35%-90,48%); 109 do RN (65,7%; IC<sub>95%</sub>: 57,84%-72,73%); 124 da PB (45,4%; IC<sub>95%</sub>: 39,44%-51,53%); 78 de GO/DF (4,4%; IC<sub>95%</sub>: 3,52%-5,50%) e em nove amostras do RS (0,9%; IC<sub>95%</sub>: 0,4%-1,7%). Uma parcela das amostras dos estados do Nordeste e Centro-oeste apresentou altos títulos neutralizantes, indicando exposição recente ao vírus. Já as amostras do RS

apresentaram títulos baixos de anticorpos, indicando provável exposição temporalmente remota. Quando testadas contra outros sorotipos do VSV (Indiana I e New Jersey) várias amostras apresentaram atividade neutralizante, porém em títulos muito inferiores, indicando a especificidade dos anticorpos para o VSIV-3. Estes resultados demonstram circulação relativamente recente do VSIV-3 em várias regiões do Brasil, sobretudo em estados do Nordeste, confirmando relatos clínicos e demonstrando a importância sanitária desta infecção.

**Palavras-chave:** sorologia, diagnóstico diferencial, febre aftosa, zoonose, doença vesicular.

## INTRODUCTION

Vesicular stomatitis virus (VSV) is a viral agent belonging to the order *Mononegavirales*, family *Rhabdoviridae*, genus *Vesiculovirus*. Besides its economical importance for the livestock, VSV represents a sanitary threat since it causes a disease confundible with foot and mouth disease in cattle and pigs (RIET-CORREA et al., 1996). VSV infects naturally a variety of mammals including horses, cattle, swine, wild mammals and man. VSV infection is endemic in the Americas and seems to be restricted to the western hemisphere (LETCHWORTH et al., 1999). The disease is characterized by the development of vesicular lesions in the mouth, tongue, teats and coronary bands of cattle, horses and pigs (RIET-CORREA et al., 1996). In most cases, the disease is self-limiting and the clinical course lasts approximately two to three weeks (REIS JR et al., 2009).

VSV isolates belong to two antigenically distinct serogroups: New Jersey (VSNJV) and Indiana (VSIV). Viruses of the VSNJV serogroup are disseminated in the southern-central United States. Serogroup VSIV contains three subtypes: Indiana I (VSIV-1- classical strains), Indiana II (VSIV-2 Cocal and Argentina) and Indiana III (VSIV-3 - Alagoas). Subtypes VSIV-2 and VSIV-3 have been occasionally isolated in Brazil, being the serotype

VSIV-3 more restricted to the northeastern states (CARGNELUTTI et al., 2014). According to the ICTV (2014), at least 20 additional serotypes do exist and await characterization.

Vesicular stomatitis (VS) usually presents a seasonal pattern, whose occurrence is usually higher in the summer or in rainy seasons (OIE, 2010; MASON et al., 1978). This behaviour has led to the hypothesis of dissemination by winds, birds and insect vectors (TESH et al., 1970). In this sense, the virus has been already isolated from mosquitoes *Phlebotomus* and *Aedes*, indicating their possible role in virus transmission (HAYEK et al., 1998). According to OIE (2010) horses are particularly susceptible to VSV infection comparing to cattle and pigs. Animal gathering in fairs, races, artificial insemination centers and other events seem to facilitate virus spread among susceptible animals (OKUDA et al., 2003).

VS is clinically undistinguishable from foot-and-mouth disease (FMD), making critical its prompt differential diagnosis. VS diagnosis may be performed by virus isolation or serological tests as virus-neutralization (VN), immunoenzymatic assays and complement-fixation (FERRIS & DONALDSON, 1988; ALONSO FERNANDEZ et al., 1991).

In Brazil, positive serology to VSV has been demonstrated in several states and different animal species. By comparing two serological tests, ALLENDE & GERMANO (1993) analysed 305 cattle, horse and pig sera, detecting 300/305 (98,40%) samples containing VN antibodies to VSIV-3. CUNHA et al. (2009) detected 21% of positivity to VSIV-2 (Cocal) and 5% to VSIV-3 (Alagoas) in the São Paulo state.

VSV was first isolated in Brazil in 1964, in Alagoas state, from sick horses and named VSIV-3 Alagoas, due to differences from serogroups VSIV-1 and VSIV-2 (ANDRADE et al., 1980). In Minas Gerais, ARAÚJO et al. (1977) reported the isolation of serotype VSIV-3 from cattle. In Sergipe (1984) ALONSO FERNANDES & SÖNDAHL (1985) isolated a serotype VSIV-3 from horses.

In the last years, several outbreaks of VS have been reported in midwestern and northeastern (NE) Brazilian states (ROSENDO et al., 2013; CARGNELUTTI et al., 2014). Reports from the PANAFTOSA (2015) have also indicated viral activity in NE states in the last years. In 2013, outbreaks of VS were reported in horses and cattle in states of Paraíba and Rio Grande do Norte, with the identification of VSIV-3 (CARGNELUTTI et al., 2014).

Considering the sanitary and economic importance of the disease, this study was designed to investigate the circulation of VSV-3, through serology, in horse from three Brazilian regions: Southern, Midwestern and Northeast.

## **MATERIAL AND METHODS**

The presente study used 3626 serum samples from horses of three Brazilian regions: southern (Rio Grande do Sul [RS]), midwest (Goiás [GO] and Federal District [DF]) and northeast (Pernambuco [PE], Paraíba [PB], Rio Grande do Norte [RN] and Ceará [CE]). Samples from northeast (n=848) and midwest (n=1767) were provenient from the official diagnosis of equine infectious anemia virus (EIAV) collected between 2013 and 2014. RS samples (n=1011) were collected in 2013, as a part of an official serological survey of EIA.

Serum samples were submitted to VN test for detection of antibodies to VSV, according to the OIE (2010) protocol, using the isolate *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE* (CARGNELUTTI et al., 2014). After complement inactivation, serum samples were diluted 1:40 and incubated with 400-500 TCID<sub>50</sub> of the isolate *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE* for 1h at 37°C, followed by addition of a suspension of Vero cells and incubation at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 72h, the cultures were monitored for citopathic effect (cpe). The samples not presenting cpe were considered positive for VSV antibodies at the used dilution. Then, positive samples were submitted to a quantitative VN test, in which a fixed dose of virus (400-500 TCID<sub>50</sub>) was incubated with 2 fold dilutions of the sera, starting at 1:40. In this test,

each sample was tested against three VSV strains/isolates: isolate *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*, strain Indiana (VSIV-1) and VSNJV. After 72h, the cultures were monitored for cpe and the VN titers were considered as the reciprocal of the highest serum dilution capable to prevent cpe. Virus titers were transformed in  $\log_2$  (THRUSFIELD, 1986) and graded as low ( $\log_2 \leq 3$ ), moderate ( $3 < \log_2 \leq 4$ ) and high ( $\log_2 > 4$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of VN assays revealed the presence of neutralizing antibodies reacting with isolate *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*, in varied frequency and titers, in all three studied regions. The overall rate of seropositivity was 17,7% (IC<sub>95%</sub>: 16,45%-18,96%), with the highest values observed in NE states (Table 1). High percentages of positive samples were observed in CE (87,3%; IC<sub>95%</sub>: 83,35%-90,48%) and RN (65,7%; IC<sub>95%</sub>: 57,84%-72,73%); moderate rates in PB (45,4%; IC<sub>95%</sub>: 39,44%-51,53%); low levels in PE (8,7%), GO/DF (4,4%; IC<sub>95%</sub>: 3,52%-5,50%) and very low prevalence rates in RS (0,9%; IC<sub>95%</sub>: 0,4%-1,7%). Since no commercial VSV vaccines are available in Brazil (SINDAN, 2015), the positive serological response is obviously due to a previous exposure to the virus in the respective regions, reflecting different levels of virus circulation in the three regions. These results indicate that CE, RN and PB state presented viral activity more spread, in contrast with the viral circulation in the midwest and Southern regions, whose immunological reaction probably reflects a low frequency and remote viral activity.

The high prevalence of VSV-3 antibodies in most NE states is compatible with study by ALLENDE & GERMANO (2003), who detected 91,5% (300/328) of seropositivity. Based upon these results, however, is difficult to estimate the real prevalence of VSV antibodies in the region since the *Centro Panamericano de Febre Aftosa* (PANAFTOSA) reports only the cases notified from 2013 to the present. Regardless, several outbreaks/cases of vesicular

disease have been notified in the NE states in the last 10 years (CARGNELUTTI et al., 2014; OIE, 2010), from which several were confirmed as VS. Information by PANAFTOSA (2015) also indicate recent virus circulation in NE in the last years.

The moderate to high antibody prevalence in horses from NE states likely reflects the environmental conditions, especially the climate, which favors the maintenance of large populations of insects (especially mosquitoes), probable virus vectors (BENNETT et al., 2008). Likewise, the low frequency of VSV antibodies in RS (0,9%) may be attributed, in part, to the climatic conditions that may not favor the perpetuation of abundant insect populations. The low levels of antibodies in RS horses likely reflect a timely remote exposure to VSIV-3 or related viruses. Similar findings have been reported for other arboviruses, such Dengue, Bluetongue and EIAV, whose frequency in RS is markedly lower than that observed in central and northern states (MELLOR & LEAKE, 2000). Regardless, VS cases have been reported in Santa Catarina, a southern state (LOPES et al., 1999).

After the initial screening with isolate *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*, the positive samples were tested against VSIV-1 (Indiana) and VSNJV, trying to determine the viral serotype involved. In RS, 9 samples were also positive for VSIV-1 (titers from 40 to 160) and none reacted with VSNJV. In GO/DF, 10 samples reacted with VSIV-1 (titers 40 to 80) and none with VSNJV. In NE states, 164 samples reacted with VSIV-1 (40 to 1280) and 7 reacted also with VSNJV (titer of 40). In spite of the antigenic differences between VSV serotypes, variable levels of cross-neutralization are observed among VSIV-1, 2 e 3 (PAUSZEK et al., 2011). In contrast, cross-neutralization between VSIV and VSNJV occurs in very low levels due to their antigenic differences (CARTWRIGHT & BROWN, 1972). The positivity to VSNJV is probably to this cross-reactivity since VSNJV is considered exotic in Brazil (OIE, 2010; PANAFTOSA, 2015). In summary, the results of VN tests indicate that the neutralizing antibodies detected were probably produced in response to infection by viruses antigenically



related to VSIV-3 (*VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*), confirming the frequent circulation of this serotype in the region.

Unfortunately, we could not test the samples against (Cocal) since we could not obtain a virus of this serotype. Thus, it can not be discarded that part of the samples that reacted with *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE* might be, in fact, result from exposure to VSIV-2, since there are reports indicating the circulation of this serotype in Brazil (REIS JR et al., 2009). In this sense, the circulation of VSIV-2 seems to be more abundant in the southeastern and midwestern regions (LÓPEZ et al., 1996-1997).

Figure 1 presents the frequency and distribution of neutralizing titers by state. In NE states – PE is an exception – moderate titers (160 – 1280) were more frequent, but high titers were also observed (2560, 5120, >10240). Moderate titers suggest a not recente exposure since high titers are usually observed within weeks or months after VSV infection (CARGNELUTTI et al., 2014). On the other hand, high titers (2560 a  $\geq 10240$ ) indicate recente exposure. These findings are compatible with data by PANAFTOSA(2015), which report several confirmed cases/outbreaks of VS in the region in the last years, including those reported by CARGNELUTTI et al. (2014). A similar distribution of virus titers, with predominant moderate titers (160 – 1280) and some high titers ( $\geq 2560$ ) were observed in GO/DF, also suggesting recent exposure.

VSV infection is considered endemic in Brazilian northeastern states, where it is probably undernotified. The present results reinforce this idea since they indicate the circulation of VSV – likely serotype 3 – in horses from this region. In addition, they indicate viral activity of lower intensity also in GO/DF, and residual antibodies probably reflecting remote past exposure to the virus in RS.

Since cattle is the most important target species for VSV infection – because it can be confused with FMD and thus lead to serious sanitary consequences -, it would be interesting

to investigate the presence and distribution of VSV antibodies in cattle of the studied regions. In this sense, a report by CARGNELUTTI et al. (2014) described VS cases predominantly in horses but also in cattle in northeastern states. Regardless, the presence of antibodies in horses already demonstrates VSV circulation in these regions.

## CONCLUSION

The serologic data indicate the circulation of VSIV-3 (related to *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*) in horses in NE states, circulation in low levels in GO/DF and residual levels of antibodies in RS, probably reflecting a timely remote virus circulation. Our results reinforce the sanitary importance of this infection, contributing for its understanding, notification and control.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil).

## REFERENCES

ALLENDE, R.; GERMANO, P.M.L. Comparison of virus neutralisation and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.12, p.849-855, 1993. Disponível em: < <http://www.oie.int/doc/ged/D8756.PDF>>. Acesso em: 07 fev. 2015.

- ALONSO FERNANDEZ, A. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection, typing and subtyping of vesicular stomatitis virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Information**, v.3, p. 287-292, 1991. Disponível em: < <http://vdi.sagepub.com/content/3/4/287.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1177/104063879100300403
- ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S. Caracterización antigenica e inmunogenica de varias cepas del sorotipo Indiana de estomatitis vesicular aisladas en Brasil. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v.51, p. 23-26, 1985.
- ANDRADE, C.M. et al. Vesicular Stomatitis in Brazil I - Isolation and identification of the Alagoas strain. **Anais de microbiologia**, v.25, p.81-87, 1980.
- ARAÚJO, M.L.R. et al. Isolamento do vírus da Estomatite Vesicular tipo Indiana, subtipo Indiana III no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos da Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v.29, p.185-189, 1977.
- BENNETT, K.E. et al. Blood-feeding behavior of vesicular stomatitis virus infected **Culicoides sonorensis** (Diptera: Ceratopogonidae). **Journal of Medical Entomology**, v.45, p.921-926, 2008. Disponível em: < <http://jme.oxfordjournals.org/content/45/5/921.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1603/0022-2585(2008)45[921:BBOVSV]2.0.CO;2
- CARGNELUTTI, J.F. et al. Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Information**, v.26, p.788-794, 2014. Disponível em: < <http://vdi.sagepub.com/content/26/6/788.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1177/1040638714553428.
- CARTWRIGHT, B.; BROWN, F. Serological Relationships between different strains of vesicular stomatitis virus. **The Journal of General Virology**, v.16, p.391-398, 1972. Disponível em: <<http://vir.sgmjournals.org/content/16/3/391.full.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2015.

CUNHA, E.M.S. et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.165-171, 2009. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76\\_2/cunha2.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_2/cunha2.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

FERRIS, N.P.; DONALDSON, A.I. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. **Veterinary Microbiology**, v.18, p.243-258, 1998.

HAYEK, A.M. et al. Financial impact of the 1995 outbreak of vesicular stomatitis on 16 beef ranches in Colorado. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 6, p. 820-823, 1998.

FERRIS, N.P.; DONALDSON, A.I. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. **Veterinary Microbiology**, v.18, p.243-258, 1998.

ICTV. **ICTV Virus Taxonomy 2014**. Virus taxonomy: 2014 Release, Edinburgh, jul. 2014. Acessado em 07 fev. 2015. Online. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

LETCHWORTH, G.J. et al. Vesicular stomatitis. **The Veterinary Journal**, v.157, p.239-260, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023398903033> > Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1053/tvj.1998.0303

LOPES, S.S. et al. Caso de estomatite vesicular em bovinos na área livre de febre aftosa com vacinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 3, 1999, São Paulo, SP. **Arquivos Instituto Biológico**. São Paulo, 1999. V.66. p. 128.

LÓPEZ, I. A. et al. Distribución histórica de la estomatitis vesicular en Brasil. **Boletim del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v. 62-63, n. 1, p. 10-20, 1996-1997. Disponível

em: < <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/file/textoc/Boletin62-62-Lopez-esp.pdf> >. Acesso em: 11 fev. 2015.

MASON, J. Epidemiologia de la stomatitis vesicular. **Boletim del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v. 29-30, n. 1, p. 13-33, 1978. Disponível em: < <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c4.pdf> >. Acesso em: 09 nov. 2015.

MELLOR, P.S., LEAKE, C.J. Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v.19, p.41-54, 2000. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/d9286.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

OIE. VESICULAR STOMATITIS. OIE Terrestrial Manual 2010, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: < [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.19\\_VESICULAR\\_STOMATITIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.19_VESICULAR_STOMATITIS.pdf) >

OKUDA, L.H. et al. Estomatite vesicular: monitoramento em touros doadores de sêmen de uma central de inseminação artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.11-15, 2003. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70\\_1/okuda.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_1/okuda.pdf) >. Acesso em: 11 fev. 2015.

PANAFTOSA. Informes PANAFTOSA. Listserv 16.0, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <<http://listserv.paho.org/scripts/wa.exe?A0=INFORMES-PANAFTOSA>>

PAUSZEK, S.J. et al. Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. **Archives of Virology**, v. 156, n. 11, p.1961-1968, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-011-1081-1>>. Acesso em: 08 abr. 2015. doi: 10.1007/s00705-011-1081-1

REIS JR, J.L. et al. Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis virus. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, n. 1, p.49-58, 2009 . Disponível em: < [http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/V.2-N.1-12-20881\\_2009\\_12\\_30\\_29\\_6.pdf](http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/V.2-N.1-12-20881_2009_12_30_29_6.pdf)>.

Acesso em: 08 abr. 2015.

RIET-CORREA, Franklin et al . Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, Santa Maria , v. 26, n. 2, p. 323-332, Ago. 1996 . Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781996000200027> >. Acesso on 09 Nov. 2015. doi: 10.1590/S0103-84781996000200027.

ROSENDO, A.R.G.V. et al. Estomatite vesicular no município Umarizal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.11, n. 3, 2013. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/19563/20401>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

SINDAN. CPVS. Compêndio de Produtos Veterinários, s.l., 11 fev 2015. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>

TESH, R.B. et al Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. **American Journal of Epidemiology**, v.91, p.216-224, 1970. Disponível em: < <http://aje.oxfordjournals.org/content/91/2/216.long>>. Acesso em: 08 abr. 2015.

THRUSFIELD, M.V. Serological epidemiology. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, 1986. Cap.16, p.175-186.

Table 1: Results of virus-neutralizing tests against vesicular stomatitis virus - VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE – in sera of horses of different Brazilian states.

State	Number	Positive (%)*	Neutralizing titers**	log <sub>2</sub>
Rio Grande do Sul	1011	9 (0,9)	40-160	2,1
Goiás/Distrito Federal	1767	78 (4,4)	40-≥10240	3,0
Pernambuco	46	4 (8,7)	40-1280	3,0
Paraíba	273	124 (45,4)	40-≥10240	4,5
Rio Grande do Norte	166	109 (65,7)	40-≥10240	3,8
Ceará	363	317 (87,3)	40-≥10240	4,4
Total	3626	641 (17,7)	40-≥10240	4,1

Neutralizing titers ≥ 40.

\*\* Reciprocal of the highest serum dilution capable to prevent the production of cytopathic effect.

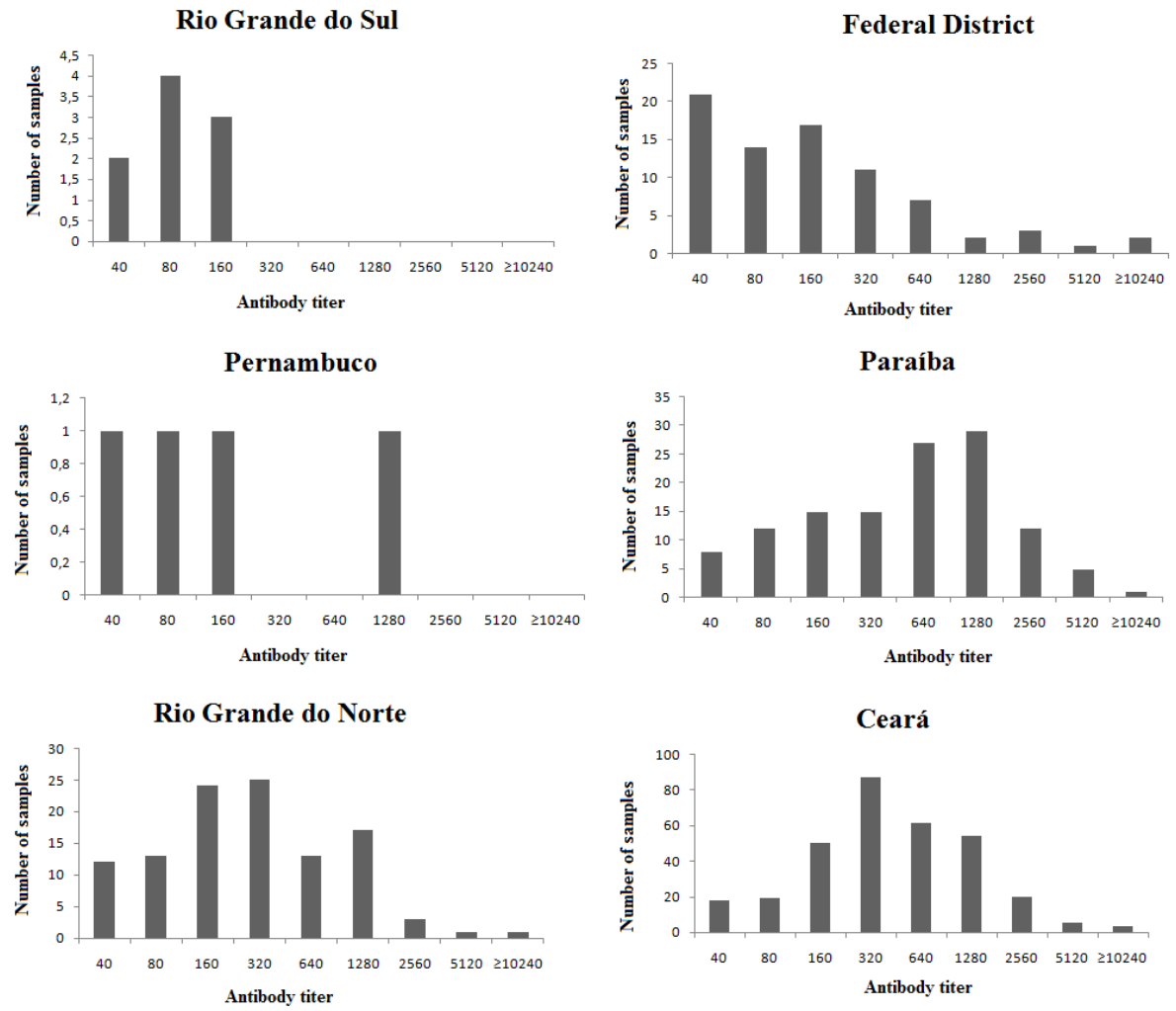


Figure 1: Distribution of neutralizing antibody titers to *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE* in horses of different Brazilian states.



### **3. CAPÍTULO 2**

#### **Anticorpos contra o vírus da estomatite vesicular em soro de bubalinos do Rio Grande do Sul, Rondônia e Minas Gerais**

Vinícius Leobet Lunkes<sup>1</sup> Rudi Weiblen<sup>1</sup> Eduardo Furtado Flores<sup>1</sup>

(Nota a ser submetida à revista *Ciência Rural* – 2016)

**Anticorpos contra o vírus da estomatite vesicular em soro de bubalinos do Rio Grande do Sul, Rondônia e Minas Gerais**

**Antibodies against vesicular stomatitis virus in sera of water buffaloes from Rio Grande do Sul, Rondônia and Minas Gerais**

**-NOTA-**

**RESUMO**

O vírus da estomatite vesicular (*vesicular stomatitis virus*, VSV) é o agente de doença vesicular que afeta várias espécies, e que em suínos e ruminantes é clinicamente confundível com a febre aftosa. O presente trabalho investigou a presença de anticorpos neutralizantes contra o VSV Indiana III (VSIV-3) em amostras de soro de 758 búfalos do Rio Grande do Sul (RS, n=281), Rondônia (RO, n=294) e Minas Gerais (MG, n=183). Anticorpos neutralizantes contra o VSIV-3 em títulos iguais ou superiores a 40 foram detectados em 20 amostras (2,6%), sendo três do RS (positividade de 1,0%, títulos de 2560 a  $\geq 5120$ ); uma de RO (0,3%, título=40) e em 16 amostras de MG (6,0%, títulos de 40 a 80), geralmente em títulos baixos. Algumas amostras positivas também reagiram com outros sorotipos do VSV, porém em títulos inferiores. Os resultados indicam a circulação em baixos níveis de VSIV-3 em búfalos nos Estados citados, reforçando a importância da vigilância de doenças vesiculares.

**Palavras-chave:** sorologia, zoonose, doença vesicular, *Bubalus bubalis*.

**ABSTRACT**

Vesicular stomatitis virus (VSV) is a vesicular disease agent that affects many species, and in pigs and ruminants might be confused with FMD. This study investigated the presence

of neutralizing antibodies against VSV Indiana III (VSIV-3) in sera of 758 water buffaloes from Rio Grande do Sul (RS, n=281), Rondônia (RO, n=294) and Minas Gerais (MG, n=183). Neutralizing antibodies against VSIV-3 in titers equal to or higher than 40 were detected in 20 samples (2.6%), being 3 from RS (1.0%, titers from 2560 to  $\geq 5120$ ); 1 from RO (0.3%; titer=40) and 16 samples from MG (6.0%, titers from 40 to 80), usually in low titers. Some of the positive samples also reacted with other VSV serotypes, but in lower titers than those to VSIV-3. These results indicate the low VSIV-3 levels in buffaloes from those states, reinforcing the importance of surveillance of vesicular diseases.

**Key words:** serology, zoonosis, vesicular disease, *Bubalis bubalus*.

O vírus da estomatite vesicular (*vesicular stomatitis virus*, VSV) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus*. Além de importância econômica para animais de produção, o VSV possui grande importância sanitária, pois causa doença confundível com a febre aftosa (FMD) em ruminantes e suínos (RODRIGUEZ et al., 2012). A infecção pelo VSV ocorre de forma endêmica nas Américas sendo restrita ao hemisfério ocidental (LETCHWORTH et al., 1999). A ocorrência da infecção está associada a fatores climáticos (chuvas), presença de mosquitos e aglomeração de animais (OKUDA et al., 2003). A doença (estomatite vesicular, VS) caracteriza-se por lesões vesiculares na cavidade oral, língua, tetos e na banda coronária dos cascos de bovinos, suínos, equinos e bubalinos (SOUZA, 2011; RODRIGUEZ et al., 2012). Na maioria dos casos, a resolução da infecção ocorre em 7 a 10 dias (DE STEFANO et al., 2002).

O VSV possui dois sorogrupos antigenicamente distintos: New Jersey (VSNJV) e Indiana (VSIV). O sorogrupo VSNJV está disseminado na região centro-sul dos Estados Unidos. O sorogrupo VSIV possui subtipos antigenicamente distintos: Indiana I (VSIV-1-

amostra clássica), Indiana II (VSIV-2 Cocal e Argentina) e Indiana III (VSIV-3 - Alagoas). Os subtipos VSIV-2 e VSIV-3 têm sido ocasionalmente isolados no Brasil, sendo que o subtipo VSIV-3 tem sido mais restrito à região Nordeste (NE) do país (CARGNELUTTI et al., 2014). Segundo o ICTV (2013), existem cerca de 20 outros subtipos que ainda não foram caracterizados.

Nos últimos anos, vários focos de VS foram relatados na região Nordeste e Centro-oeste do Brasil (ROSENDO et al., 2013; CARGNELUTTI et al., 2014). Boletins da PANAFTOSA (2015) também indicam atividade viral endêmica em estados do Nordeste nos últimos anos. A presença de baixos níveis de anticorpos contra o VSV em búfalos foi detectada em estudos realizados no Estado de São Paulo (KLEIN et al., 2013; KLEIN et al., 2014). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de anticorpos contra o VSV em amostras de soro de búfalos do Rio Grande do Sul, Rondônia e Minas Gerais.

Para tal, amostras de soro de búfalos (n=758) do Rio Grande do Sul (RS, n=281), Rondônia, (RO, n=294) e Minas Gerais (MG, n=183) foram submetidas ao teste de soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos contra o VSV, de acordo com protocolo descrito pela OIE (2010). Após inativação, as amostras de soro foram diluídas 1:40 e incubadas com 400-500 TCID<sub>50</sub> do isolado *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE* (CARGNELUTTI et al., 2013) durante 1h a 37°C, seguido da adição de suspensão de células Vero e incubação em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras que não apresentaram ecp compatível com o VSV após 72h de incubação foram consideradas positivas para anticorpos na diluição utilizada, e então, submetidas ao teste de SN quantitativo. Neste teste, incubou-se 400-500 TCID<sub>50</sub> do vírus frente a diluições crescentes na base 2 de soro. A fim de detectar o sorotipo viral envolvido, as amostras foram testadas frente a três isolados/cepas do VSV: isolado *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*, cepa Indiana (VSIV-1) e VSNJV. A recíproca da

maior diluição do soro que preveniu a produção de ecp foi considerada o título de anticorpos neutralizantes para os respectivos vírus.

O percentual geral de positividade foi de 2,6% (20/758), sendo que os maiores índices foram observados em Minas Gerais (Tabela 1). No RS, uma amostra foi positiva para VSIV-3 com título igual a 2560 e duas amostras com título  $\geq 5120$ , em RO, uma amostra foi positiva com título 40, e em MG, 14 amostras foram positivas com título 40 e duas com título 80. No RS, duas amostras foram positivas para VSIV-1 (título de 2560) e três foram positivas para VSNJV (título de 160 a 1280); entre as amostras de Rondônia, uma amostra foi positiva para VSIV-1 e VSNJV (títulos de 40 e 80, respectivamente); em Minas Gerais, três amostras foram positivas para VSIV-1 (títulos de 40 a 80) e 15 para VSNJV (títulos de 40 a 640). Tendo em vista que não há vacinas licenciadas para a VS no Brasil (SINDAN, 2015), pode-se inferir que a reação imunológica encontrada é resultante da exposição ao vírus, portanto, os resultados dos testes de SN demonstraram a presença de anticorpos neutralizantes contra o isolado *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*, em frequência e títulos geralmente baixos, nos três estados estudados.

A infecção de búfalos é epidemiologicamente importante, pois como esta espécie também é afetada pela FMD (OIE, 2012), a diferenciação entre casos de uma doença ou outra é fundamental. Apesar do número limitado de amostras, os dados de sorologia encontrados indicam que búfalos podem ser infectados pelo VSV em regiões onde o vírus circula. Estudo recente detectou a circulação de VSIV-3 em equinos nos Estados de Pernambuco, Ceará e Paraíba, circulação em momento não muito distante nos Estados de Goiás e Distrito Federal e circulação em baixos níveis no RS (LUNKES et al, 2015, submetido).

Segundo DUARTE et al. (2008), a presença de acumulações de água em pastagens estaria associada a maiores taxas de infecções com o VSV, possivelmente pela presença de mosquitos vetores do agente, entretanto, acredita-se que a característica da pele mais grossa

dos búfalos (SHAFIE, 1985) dificulte a infecção pelo vírus, além disso, a maior atividade das glândulas sebáceas dos bubalinos (SHAFIE & ABOUL EL-KHAIR, 1970).

Tendo em vista a ausência de uma amostra de vírus VSIV-2 para teste, não foi possível testar as amostras para esse vírus, portanto, é possível que parte da sorologia encontrada seja decorrente da circulação deste vírus. Ainda, a circulação de vírus deste sorogrupo já foi detectado no Brasil (CUNHA et al., 2009).

A frequência baixa de anticorpos contra o VSV no RS também pode ser atribuída, em parte, às condições climáticas menos propícias a manutenção de populações dos insetos vetores. Poucos animais do RS reagiram sorologicamente, em títulos baixos a moderados, indicando exposição remota ao VSIV-3 ou a outro sorotipo antígenicamente relacionado. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo sorológico realizado em amostras de equinos recente (LUNKES et al., submetido), onde baixos títulos de anticorpos foram encontrados no RS, e altos títulos em Estados do Nordeste, coincidindo com melhores condições climáticas para as populações de insetos.

Relatos recentes têm discutido a possibilidade de existir uma predileção do vírus em relação à espécie do hospedeiro. A soroprevalência em equinos tem sido maior que em bovinos (MUMFORD et al. 1998; LUNKES et al.; submetido), e pode-se inferir que o agente apresenta uma predileção pela infecção da espécie equina, o que pode explicar os níveis de sorologia geralmente baixos encontrados.

Os resultados da sorologia indicam a circulação em baixos níveis de VSIV-3 (relacionados ao *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE*) em búfalos dos Estados do Rio Grande do Sul, Rondônia e Minas Gerais, reiterando a importância desta espécie na cadeia infecciosa desta doença, e confirmando a necessidade de vigilância desta doença no rebanho bubalino.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil

## REFERÊNCIAS

CARGNELUTTI, J.F. et al. Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Information**, v.26, p.788-794, 2014. Disponível em: < <http://vdi.sagepub.com/content/26/6/788.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1177/1040638714553428.

CUNHA, E.M.S. et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.165-171, 2009. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76\\_2/cunha2.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_2/cunha2.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

DE STEFANO, W.P. et al. Estomatite vesicular. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, p.127-133, 2002. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69\\_3/Stefano.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_3/Stefano.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

DUARTE, P.C. et al. Factors associated with vesicular stomatitis in animals in the western United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232, p.249-256, 2008.

ICTV. **ICTV Virus Taxonomy 2013**. Virus taxonomy: 2013 Release, Edinburgh, jul. 2013. Acessado em 07 fev. 2015. Online. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

KLEIN, M.S. et al Sorodiagnóstico de Estomatite vesicular em bufalos. **Biológico**, v.75, n. 2 p.25, 2001. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v75\\_2/p25.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v75_2/p25.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2015.

KLEIN, M.S. et al Sorodiagnóstico de Estomatite vesicular em bufalos. **Biológico**, v.76, n. 2 p.68, 2001. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v76\\_2/p68.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v76_2/p68.pdf)>.

Acesso em: 20 nov. 2015.

LETCHWORTH, G.J. et al. Vesicular stomatitis. **The Veterinary Journal**, v.157, p.239-260, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023398903033>> Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1053/tvjl.1998.0303

MUMFORD, E.L. et al. Public veterinary medicine: public health. Serologic evaluation of vesicular stomatitis virus exposure in horses and cattle in 1996. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.213, p.1265-1269, 1998.

OIE. VESICULAR STOMATITIS. OIE Terrestrial Manual 2010, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.19\\_VESICULAR\\_STOMITIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.19_VESICULAR_STOMITIS.pdf)>

OIE. Foot and mouth disease. OIE Terrestrial Manual 2012, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.01.05\\_FMD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf)>

OKUDA, L.H. et al. Estomatite vesicular: monitoramento em touros doadores de sêmen de uma central de inseminação artificial. Arquivos do Instituto Biológico, v.70, p.11-15, 2003. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70\\_1/okuda.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_1/okuda.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

PANAFTOSA. Informes PANAFOTSA. Listserv 16.0, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <<http://listserv.paho.org/scripts/wa.exe?A0=INFORMES-PANAFTOSA>>

RODRIGUEZ, L.L., et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria : Editora UFSM, 2012. Cap.28, p.795-830.



ROSENDO, A.R.G.V. et al. Estomatite vesicular no município Umarizal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.11, n. 3, 2013. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/19563/20401>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

ROSENDO, A.R.G.V. et al. Estomatite vesicular no município Umarizal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.11, n. 3, 2013. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/19563/20401>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

SHAFIE, M.M.; ABOU EL-KHAIR, M.M. Activity of the sebaceous glands of bovines in hot climate (Egypt). **United Arab Republic Journal of Animal Production**. v.10, p.81-98, 1970.

SHAFIE, M. M. Physiological responses and adaptation of water buffalo. In: YOUSEF, M.K. **Stress physiology in livestock**. Florida : CRC, 1985.

SINDAN. CPVS. Compêndio de Produtos Veterinários, s.l., 11 fev 2015. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>

SOUZA, L.H. Biossegurança e a febre aftosa no Brasil panorama histórico das ações direcionadas à erradicação. Rio de Janeiro:Instituto de Biosseguração, FIOCRUZ, 2011.

TABELA 1 Distribuição dos títulos de anticorpos neutralizantes frente ao *VSIV-3 2013SaoBento/ParaibaE* em amostras de soro de búfalos de acordo com o Estado de origem.

Região	Número de amostras	Positivo (%)	Títulos neutralizantes**
Rio Grande do Sul	281	3 (1,0)	2560- $\geq$ 5120
Rondônia	294	1 (0,3)	40
Minas Gerais	183	16 (6,0)	40-80
Total	758	15 (2,0)	40- $\geq$ 5120

Títulos neutralizantes  $\geq$ 40

\*\* Recíproca da maior diluição do soro capaz de impedir a produção de efeito citopático.

### 3. DISCUSSÃO

A estomatite vesicular é uma enfermidade importante do ponto de vista sanitário e econômico para as criações de equinos e ruminantes. Apesar de numerosos estudos realizados nas últimas décadas, vários aspectos ainda necessitam ser elucidados envolvendo a epidemiologia da doença.

O Capítulo 1 demonstrou a presença de anticorpos contra o VSV em amostras de soro de equinos. A ocorrência de anticorpos em diversas regiões do Brasil já foi relatada em estudos anteriores (CUNHA et al., 2009). No NE, onde foram encontrados os maiores níveis de positividade, há relatos recentes de isolamento de VSV (CARGNELUTTI et al., 2014, CLEMENTINO et al., 2015). Portanto, a vigilância epidemiológica desta doença deve ser reforçada em todo o país, especialmente na região NE.

No Capítulo 2, a circulação em baixos níveis do VSV em búfalos foi demonstrada. A ocorrência de anticorpos em baixos níveis também foi descrita anteriormente (KLEIN et al., 2014, KLEIN et al., 2015) no Estado de São Paulo. Apesar do número limitado de amostras, os dados de sorologia encontrados indicam que búfalos podem ser infectados pelo VSV em regiões onde o vírus circula.

A ausência de uma amostra viral do sorogrupo VSIV-2 impediu o teste das amostras para esse vírus. Portanto, não é possível descartar a possibilidade que parte da sorologia encontrada seria decorrente da exposição a esse vírus.

A ocorrência de VS no Brasil, especialmente na região NE é considerada endêmica, é provavelmente subnotificada. Os resultados do presente trabalho reforçam esta hipótese, porque encontrou-se altos índices de positividade, principalmente nas amostras de equinos dos Estados de CE e RN. Da mesma forma, a circulação do agente em baixos níveis em búfalos também foi demonstrada. Neste contexto, é importante destacar que o diferencial diagnóstico em búfalos envolve a febre aftosa, portanto, a ocorrência de doenças vesiculares envolve a ação de agentes do Serviço Veterinário Oficial.

Relatos recentes têm discutido a possibilidade de existir uma predileção do vírus em relação à espécie do hospedeiro. A soroprevalência em equinos tem sido maior que em bovinos (MUMFORD et al. 1998; LUNKES et al.; submetido), e pode-se inferir que o agente apresenta uma predileção pela infecção da espécie equina. Neste contexto, os resultados do presente estudo confirmam essa afirmação.

As informações obtidas neste trabalho responderam os objetivos inicialmente propostos, contribuindo com os estudos de epidemiologia da estomatite vesicular, bem como

na circulação do vírus e na vigilância epidemiológica. Além disso, gera perspectivas para futuros estudos envolvendo a ocorrência em outras espécies animais e regiões do país. A associação com dados epidemiológicos enriqueceria a pesquisa de anticorpos para este agente.

#### 4. REFERÊNCIAS

ALLENDE, R.; GERMANO, P.M.L. Comparison of virus neutralisation and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. **Rev. - Off. Int. Epizoot.**, Paris, v.12, p.849-855, 1993. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D8756.PDF>>. Acesso em: 07 fev. 2015.

ALONSO FERNANDEZ, A. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection, typing and subtyping of vesicular stomatitis virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.3, p. 287-292, 1991. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/3/4/287.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 fev. 2015. DOI: 10.1177/104063879100300403

ALONSO FERNANDEZ, A.; SÖNDAHL, M.S. Caracterización antigenica e inmunogenica de varias cepas del sorotipo Indiana de estomatitis vesicular aisladas en Brasil. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v.51, p. 23-26, 1985.

ANDRADE, C.M. et al. Vesicular Stomatitis in Brazil I - Isolation and identification of the Alagoas strain. **An Microbiol (Rio J)**, Rio de Janeiro, v.25, p.81-87, 1980.

ANDRADE, C.M. et al. Vesicular stomatitis in Brazil. II - Epidemiological survey in equines, bats and Saguinus. **An Microbiol (Rio J)**, Rio de Janeiro, v.26, p.47-51, 1981.

ARAÚJO, M.L.R. et al. Isolamento do vírus da Estomatite Vesicular tipo Indiana, subtipo Indiana III no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos da Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.29, p.185-189, 1977.

ARRUDA, R.C.N. et al. Investigação epidemiológica de Estomatite vesicular por achados clínicos em bovinos e equinos no Estado do Maranhão. **Pesqui Vet Bras**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, p.391-395, 2014. Disponível em: <[http://www.pvb.com.br/pdf\\_artigos/27-06-2015\\_12-35Vet%201797\\_3846%20LD.pdf](http://www.pvb.com.br/pdf_artigos/27-06-2015_12-35Vet%201797_3846%20LD.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

ATWILL, E.R. et al. Environmental and host factors associated with seropositivity to New Jersey and Indiana vesicular stomatitis viruses in Costa Rican cattle. **Prev. Vet. Med.** Amsterdam, v.15, v. 4, p.303-314, 1993. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016758779390102Y>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

CARGNELUTTI, J.F. et al. Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.26, p.788-794, 2014. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/26/6/788.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1177/1040638714553428.

CLEMENTINO, I.J. et al. First case report of vesicular stomatitis in the State of Paraíba, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.35, n.5, p.2601-2605, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n5p2601>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n5p2601

COMER, J.A et al. Vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype: replication in and transmission by *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.42, p.483-490, 1990. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/42/5/483.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

CORNISH, T.E. et al. Pathogenesis of experimental vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). **Vet. Pathol.**, New York, v.38, n.4, p.396-406, 2001. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/38/4/396.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 fev. 2015. DOI: 10.1354/vp.38-4-396

CUNHA, E.M.S. et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)**, São Paulo, v.76, p.165-171, 2009. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76\\_2/cunha2.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_2/cunha2.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

DE STEFANO, W.P. et al. Estomatite vesicular. **Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)**, São Paulo, v.69, p.127-133, 2002. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69\\_3/Stefano.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_3/Stefano.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

DE STEFANO, E. et al. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da Estomatite Vesicular em bovinos de corte criados na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil em 2000. **Braz**

**J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v.40, p.29-35, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v40n1/19292.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

DONALDSON, A.I. Bats as possible maintenance hosts for vesicular stomatitis virus. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.92, p.132-136, 1970.

DUARTE, P.C. et al. Factors associated with vesicular stomatitis in animals in the western United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Ithaca, v.232, p.249-256, 2008.

FENNER, F.J. et al. Rhabdoviridae. In: *Veterinary virology*. San Diego: Academic; 1993. p. 489-509.

FERRIS, N.P.; DONALDSON, A.I. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.18, p.243-258, 1988.

FRANCY, D.B. et al. Epizootic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: Isolation of Virus from Insects Collected Along the Northern Colorado Rocky Mountain Front Range. **J. Med. Entomol.**, Oxford, v.25, n. 5, 1988. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/content/25/5/343.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

HANSEN, D.E.; THURMOND, M.C.; THORBURN, M. Factors associated with the spread of clinical vesicular stomatitis in California dairy cattle. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.46, p.789-795, 1985.

HURD, H.S.; MCCLUSKEY, B.J.; MUMFORD, E.L. Management factors affecting the risk for vesicular stomatitis in livestock operations in the western United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Ithaca, v.215, v.9, p.1263-1268, 1999.

ICTV. **ICTV Virus Taxonomy 2014**. Virus taxonomy: 2014 Release, Edinburgh, jul. 2014. Acessado em 07 fev. 2015. Online. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

JIMENEZ, A.E. et al. A Serological survey of small mammals in a vesicular stomatitis virus enzootic area. **J. Wildl. Dis.**, Lawrence, v.32, n. 2, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-32.2.274>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.7589/0090-3558-32.2.274

JONES, L.D. et al. A Novel Mode of Arbovirus Transmission Involving a Nonviremic Host. **Science**, New York v.237, n. 4816, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/237/4816/775.abstract>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

KLEIN, M.S. et al. Sorodiagnóstico de Estomatite vesicular em búfalos. **Biol**, São Paulo, v.75, n. 2 p.25, 2013. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v75\\_2/p25.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v75_2/p25.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2015.

KLEIN, M.S. et al Sorodiagnóstico de Estomatite vesicular em búfalos. **Biol**, São Paulo, v.76, n. 2 p.68, 2014. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v76\\_2/p68.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v76_2/p68.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2015.

LETCHWORTH, G.J.; RODRIGUEZ, L.L.; DEL CBARRERA, J. Vesicular stomatitis. **Vet. J.**, London, v.157, p.239-260, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023398903033>> Acesso em: 11 fev. 2015. DOI: 10.1053/tvj.1998.0303

LICHTY, B.D. et al. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. **Trends Mol Med**, Oxford, v.10, n.5 p.210-216, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491404000760>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.1016/j.molmed.2004.03.003

MASON, J. et al. Vesicular Stomatitis in Mexico. Proc. 80th. Ann. Meeting, U.S. Animal Health Assoc. pp. 234-253, 1976.

MCCLUSKEY, B.J, MUMFORD, E.L. Vesicular stomatitis and other vesicular, erosive, and ulcerative diseases of horses. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Philadelphia, v.16, n. 3, p. 457-469, 2000.

MEAD, D.G et al. Biological transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*). **J. Med. Entomol.**, Oxford, v.41, n. 1, p.78-82, 2004. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/content/41/1/78.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

OIE. VESICULAR STOMATITIS. OIE Terrestrial Manual 2010, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <



[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.19\\_VESICULAR\\_STO\\_MITIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.19_VESICULAR_STO_MITIS.pdf) >

OKUDA, L.H. et al. Estomatite vesicular: monitoramento em touros doadores de sêmen de uma central de inseminação artificial. **Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)**, São Paulo, v.70, p.11-15, 2003. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70\\_1/okuda.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_1/okuda.pdf)>. Acesso em: 11 fev. 2015.

PANAFTOSA. Informes PANAFTOSA. Listserv 16.0, 1 may. 2010. Acessado em 11 fev. 2015. Online. Disponível em: <<http://listserv.paho.org/scripts/wa.exe?A0=INFORMES-PANAFTOSA>>

RODRIGUEZ, L.L. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. **Virus Res.**, Amsterdam, v.85, n. 2, p. 211-219, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170202000266>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

RODRIGUEZ, L.L., et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria : Editora UFSM, 2012. Cap.28, p.795-830.

ROSENDO, A.R.G.V. et al. Estomatite vesicular no município Umarizal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.11, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/19563/20401>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

SCHMITT, B. Vesicular Stomatitis. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v.18, n. 3, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442577>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

SCHMIDTMANN, E.T. et al. 1995 epizootic of vesicular stomatitis (New Jersey serotype) in the western United States: an entomologic perspective. **J. Med. Entomol.**, Oxford, v.36, n. 1, p.1-7, 1999.

SMITH, P.F. et al. Mechanical transmission of vesicular stomatitis New Jersey virus by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*). **J. Med. Entomol.**,

Oxford, v.46, n. 6, 2009. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/content/46/6/1537.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

STALLKNECHT, D.E et al. Feral swine as a potential amplifying host for vesicular stomatitis virus New Jersey serotype on Ossabaw Island, Georgia. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v.29, v. 3, p.377-383, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-29.3.377>>. Acesso em: 11 fev. 2015. doi: 10.7589/0090-3558-29.3.377

SUDIA, W.D. et al. The isolation of vesicular stomatitis virus (indiana strain) and other viruses from mosquitoes in New Mexico, 1965. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.86, n. 3, 1967. Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/content/86/3/598.extract>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

TESH, R.B. PERALTA, P.H; JOHNSON, K.M. Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.91, p.216-224, 1970. Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/content/91/2/216.long>>. Acesso em: 08 abr. 2015.

TESH, R.B. CHANIOTIS, B.N.; JOHNSON, K.M. Vesicular stomatitis virus, Indiana serotype: multiplication in and transmission by experimentally infected phlebotomine sandflies (*Lutzomyia trapidoi*). **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.93, v.6, p.491-495, 1971. Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/content/93/6/491.long>>. Acesso em: 08 abr. 2015.

TESH, R.B. CHANIOTIS, B.N.; JOHNSON, K.M. Vesicular stomatitis virus (Indiana serotype): transovarial transmission by phlebotomine sandflies. **Science**, New York, v.175, v. 4029, p.1477-1479, 1972. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/175/4029/1477.long>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

TESH, R. B. 1994. Factors associated with the transmission and maintenance of vesicular stomatitis virus, pp. 633-647. In A.P.A. Travassos da Rosa and R. Ishak[eds.], *Virologica 91, II Simpósio internacional sobre arbovírus dos trópicos e febres hemorrágicas*. Sociedade Brasileira de Virologia, Belém, Brasil.

VANLEEUEWEN, J.A.; RODRIGUEZ, L.L.; WALTNER-TOEWS, D. Cow, Farm, and Ecologic Risk Factors of Clinical Vesicular Stomatitis on Costa Rican Dairy Farms. **Am. J.**

**Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.53, n. 4, p.342-250, 1995. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/53/4/342.long>. Acesso em: 11 fev. 2015.

YUILL, T.M. Vesicular stomatitis. In: STEELE, H. **CRC handbook series in zoonosis**. Boca Raton: CRC Press, 1981, p. 125-142.