CAMILA SOUZA TORELLI

Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos 1 e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado de São Paulo

São Paulo

2011

CAMILA SOUZA TORELLI

Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos1e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado deSão Paulo

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

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:
Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2011

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
3/8/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2495
FMVZ

Torelli, Camila Souza
Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos 1 e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado de São Paulo / Camila Souza Torelli. -- 2011.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Herpesvírus equino tipo 1. 2. Herpesvírus equino tipo 4. 3. Soroneutralização. 4. ELISA Gg. 5. Ocorrência. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de anticorpos séricos contra Herpesvirus Equinos (HVE) tipos 1 (HVE-1) e 4 (HVE-4) em equinos de propriedades do Estado de São Paulo com histórico de doença", protocolado sob o nº 2078/2010, utilizando 473 (quatrocentos e setenta e três) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Survey of serum antibodies to equine Herpesvirus (EHV) types 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) equine properties in the State of São Paulo with a history of disease", protocol number 2078/2010, utilizing 473 (four hundred seventy three) horses, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: 55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

ERRATA

TORELLI, C. S. **Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos 1 e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado de São Paulo.** 2011. 62 f. Dissertação(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º	65 f.	62 f.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TORELLI, Camila Souza

Título: **Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos 1 e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado de São Paulo**

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

Data: _____ /_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Ao Antonio, meu filho querido, que me ensinou uma nova forma de amar e deu um novo sentido à minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a graça de viver.

A meus pais, por terem me proporcionado o lar e me apoiado a buscar meus sonhos.

Ao meu companheiro de vida, Marcos, por toda a paciência, apoio e carinho nos momentos mais difíceis da jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, por ter aceitado me orientar, pelos conselhos e pelo exemplo de profissional.

Ao meu primeiro orientador científico, Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, por ter me proporcionado o contato com o universo dos laboratórios.

Às pesquisadoras do Laboratório de Raiva do Instituto Biológico, Dra. Elenice M. S. Cunha, Dra. Maria do Carmo C. S. H. Lara, Dra. Eliana M. C. Villalobos, Dra. Alessandra F. C. Nassar, pelo ambiente de trabalho, por toda a amizade, pelos conselhos e pela companhia.

Ao pesquisador Dr. Enio Mori, por todo suporte, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às minhas amigas Laura, Karen, Juliana e Sibele, pela companhia na jornada da pós graduação.

Aos meus amigos do tempo do colégio, que mesmo sem ter participado ativamente, são parte muito importante da minha vida.

RESUMO

TORELLI, C. S.**Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos 1 e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado de São Paulo.** [Occurrence of antibodies against EHV types 1 and 4 in vaccinated and unvaccinated animals of the State of São Paulo].2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os herpesvírus equinos do tipo 1 (EHV-1) e do tipo 4 (EHV-4) são considerados os principais agentes infecciosos para a espécie equina. Dentre as doenças causadas por estes agentes, destacam-se a rinopneumonite em animais jovens, o abortamento em fêmeas no terço final da gestação, a mortalidade perinatal em potros e a mieloencefalopatia. Estudos anteriores relatam ampla disseminação do EHV-1 na população eqüina no Estado de São Paulo, entretanto a ocorrência de infecção pelo EHV-4 não possui registro. Devido à similaridade antigênica entre os dois tipos virais, a diferenciação pelos métodos de sorodiagnóstico tradicionais, como a Soroneutralização e a Reação de Fixação de Complemento, não é possível. Assim, este trabalho avaliou, pela primeira vez no Estado de São Paulo, através de um teste de ELISA indireto que emprega uma região da glicoproteína G para diferenciar o EHV-1 do EHV-4 (iELISAgG),a presença de anticorpos específicos para os dois tipos de herpesvírus equino em 512 animais de 20 municípios de 8 mesoregiões do Estado de São Paulo, dentre equinos, muares e asininos, de ambos os sexos, diferentes faixas etárias, vacinados e não vacinados. As mesmas amostras foram testadas para o EHV através do teste de soroneutralização, tradicionalmente empregado para a pesquisa de anticorpos contra o vírus. Os resultados obtidos com a soroneutralização revelam 205/512 (40,03%) animais soropositivos. Através do teste de ELISA obteve-se 3/512 (0,59%) animais positivos para o EHV-1, 347/512 (67,77%) animais positivos para o EHV-4 e 108/512 (21,09%) animais positivos para ambos. O grupo de animais não vacinados apresentou 127/352 (36,07%) soropositivos pelo teste de soroneutralização; enquanto 4/352 (1,14%) foram positivos para o EHV-1, 237/352 (67,33%) foram positivos para o EHV-4 e 69/352 (19,6%) foram positivos para ambos, pelo teste de ELISA. O grupo de animais vacinados apresentou 78/160 (48,75%) soropositivos pelo teste de soroneutralização; enquanto 1/160 (0,63%) foram positivos para

o EHV-1, 112/160 (70%) foram positivos para o EHV-4 e 37/160 (23,13%) foram positivos para ambos, pelo teste de ELISA. Os resultados sugerem baixa circulação de EHV-1 e alta circulação de EHV-4, de acordo com os resultados encontrados nos animais não vacinados. A análise de correlação entre os dois testes empregados mostrou baixa concordância.

Palavras-chave:Herpesvírus equino tipo 1, Herpesvírus equino tipo 4, soroneutralização, iELISAgG

ABSTRACT

TORELLI, C. S. **Occurrence of antibodies against EHV types 1 and 4 in vaccinated and unvaccinated animals of the State of São Paulo**. [Ocorrência de anticorpos contra o EHV dos tipos 1 e 4 em animais vacinados e não vacinados do Estado de São Paulo]. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) and type 4 (EHV-4) are considered the major infectious agents for the equine species. Among the diseases caused by these agents, we highlight the rinopneumonite in young animals, abortion in females in the final third of pregnancy, perinatal mortality in foals and encefalopathy. Previous studies have reported wide spread of EHV-1 equine population in the State of São Paulo, however the occurrence of infection with EHV-4 is not registered. Due to the antigenic similarity between the two virus types, the differential serodiagnosis by traditional methods such as neutralization and complement fixation reaction, it is not possible. Thus, this study evaluated the first time in São Paulo, through an indirect ELISA employing a region of glycoprotein G to differentiate EHV-1 EHV-4 (iELISAgG), the presence of specific antibodies to the two types of equine herpesvirus in 512 animals from 20 municipalities in 8 regions the State of São Paulo, among horses, mules and donkeys of both sexes, different age groups, vaccinated and unvaccinated. The same samples were tested for EHV through the neutralization test, traditionally used for the detection of antibodies against the virus. The results obtained with the neutralization revealed 205/512 (40.03%) seropositive animals. By ELISA we obtained 3/512 (0.59%) animals positive for EHV-1, 347/512 (67.77%) animals positive for EHV-4 and 108/512 (21.09%) animals positive for both. The group of unvaccinated animals showed 127/352 (36.07%) HIV-positive by serum neutralization test, while 4/352 (1.14%) were positive for EHV-1, 237/352 (67.33%) were positive for EHV-4 and 69/352 (19.6%) were positive for both ELISA. The group of vaccinated animals showed 78/160 (48.75%) seropositive by neutralization test, while 1 / 160 (0.63%) were positive for EHV-1, 112/160 (70%) were positive for EHV-4 and 37/160 (23.13%) were positive for both ELISA. The results

suggest low circulation of EHV-1 and high circulation of EHV-4 according to the results found in unvaccinated animals. The correlation analysis between the two tests employed showed poor agreement.

Keywords: Equid Herpesvirus type 1, Equid Herpesvirus type 4, seroneutralization, iELISA gG

LISTA DE ABREVIATURAS

AHV – Herpesvírus Asinino

BHV – Herpesvírus Bovino

EAV – Vírus do Aborto Equino

EHV – Herpesvírus Equino

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

HSV – Herpes Simplex

PsR – Vírus da Pseudoraiva ou Doença de Aujezky

SN – Soroneutralização

*Devido ao fato de terem sido consagradas, na literatura especializada, algumas abreviaturas seguem sua grafia no idioma inglês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sequência de aminoácidos alinhados contendo epítopos tipo específicos EHV-1 e EHV-4 próximos da região terminal variável C da gG. A linha de consenso (con) demonstra resíduos idênticos 18

Figura 2 - Ilustração do princípio da técnica de ELISA indireto. O anticorpo primário é a variável do sistema; em sua presença há ligação do anticorpo secundário e posterior geração de sinal revelando a positividade no teste 29

Figura 3 - Esquema ilustrativo da reação de soroneutralização viral. A presença de anticorpos específicos contra o vírus adicionado à reação impede a geração de efeito citopático no cultivo celular 30

Figura 4 - Ilustração do princípio da técnica de Fixação de Complemento. A presença, no soro testado, do anticorpo contra o vírus conhecido, consome o complemento adicionado à reação mantendo as células sanguíneas intactas 31

Figura 5 - Ilustração do kit de ELISA utilizado para detectar simultaneamente EHV-1 e EHV-4, utilizando em espaços adjacentes regiões que diferenciam os dois tipos virais como antígenos 33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos Herpesvírus de Equídeos 16

Quadro 2 - Histórico de Pesquisa de Anticorpos contra Herpesvírus no Brasil 36

Quadro 3- Relação dos Animais Estudados, Classificados de Acordo com os Municípios 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados Gerais 43

Tabela 2 - Resultados de acordo com o status vacinal 43

Tabela 3 - Resultados de acordo com faixa etária, sexo e status vacinal 44

Tabela 4 - Resultados de acordo com a localização geográfica e status vacinal 45

Tabela 5 - Comparação entre SN e ELISA para EHV-1 46

Tabela 6 - Comparação entre SN e ELISA para EHV-4 46

Tabela 7 - Comparação entre SN e ELISA para EHV-1 e EHV-4 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 HERPESVÍRUS DE EQUÍDEOS 16
1.2 SORODIAGNÓSTICO DOS HERPESVÍRUS 29
1.3 HERPESVÍRUS EQUINO NO BRASIL 34
2 OBJETIVOS 37
3 MATERIAIS E MÉTODOS 38
Animais Estudados 38
Obtenção dos Soros 39
Pesquisa de Anticorpos Séricos para o EHV pela Técnica de Soroneutralização 39
Pesquisa de Anticorpos Séricos para o EHV pela Técnica de iELISA gG 40
Análise dos Resultados 41
4 RESULTADOS 43
5 DISCUSSÃO 48
6 CONCLUSÕES 52
REFERÊNCIAS 54

1 INTRODUÇÃO

1.1 HERPESVÍRUS DE EQUÍDEOS

Os herpesvírus de equídeos (EHVs) são patógenos altamente bem sucedidos em todos os membros da família Equidae ao redor do mundo. Sabe-se que cinco herpesvírus infectam o cavalo, conforme disposto no quadro1. Os EHVs estão presentes nas populações equinas domésticas e selvagens, e provavelmente o sucesso do EHV como um patógeno está relacionado à sua capacidade de indução de latência, assegurando assim uma disseminação eficiente dentro da população equídea (SLATER, 2007; WOOD et al., 2008).

Família	Sub-Família	Gênero	Espécie
Herpesviridae	*Alphaherpesvirinae*	*Varicellovirus*	Herpesvirus Equino tipo 1 – Vírus do Abortamento Equino
			Herpesvírus Equino tipo 3 – Vírus do Exantema Coital Equino
			Herpesvírus Equino tipo 4 – Vírus da rinopneumoniteeqüina
			Herpesvírus Equino tipo 8 – Herpesvírus Asinino tipo 3
			Herpesvírus Equino tipo 9 – Herpesvírus de Gazela
	Gammaherpesvirinae	*Rhadinovirus*	Herpesvírus Equino tipo 2
			Herpesvírus Equino tipo 5
			Herpesvírus Equino tipo 7

Fonte: ICVT (www.ictvdb.org)

Quadro 1 - Classificação dos Herpesvírus de Equídeos

O herpesvírus equino do tipo 1 (EHV-1), um DNA-vírus dupla fita (MURPHI, 1995), é o agente causador da rinopneumoniteeqüina, podendo também causar abortamento e mieloencefalopatia. A primeira descrição da doença em equinos foi feita por Dimock e Edwards em 1936, nos Estados Unidos, em éguas que abortaram em seguida a alterações do sistema respiratório com sintomas semelhantes aos da gripe.

EHV-1 e EHV-4 são *Alphaherpesvírus* relacionados, os quais são os principais causadores de aborto e doença respiratória, respectivamente, e são de importância econômica considerável ao redor do mundo (CAMPBELL; STUDDERT, 1983; ALLEN;BRYANS, 1986; ALLEN, 1997).

Os herpesvírus podem sobreviver de uma geração para a próxima através do estabelecimento de infecções latentes. Latência, isto é, persistência do vírus por toda a vida, é uma característica de todos os herpesvírus. A reativação é geralmente intermitente e pode estar associada com estresse bem como uma doença intercorrente, transporte, frio ou aglomeração. A eliminação do vírus é nasal, oral ou através de secreções genitais, inclusive podendo transmitir da égua para o potro. Muitos *Alphaherpesvirus* persistem em neurônios, provavelmente como uma forma circular epissomal do genoma. *Alphaherpesvirus* mostram crescimento rápido e produzem infecções líticas agudas (SLATER, 2007; WOOD et al., 2008).

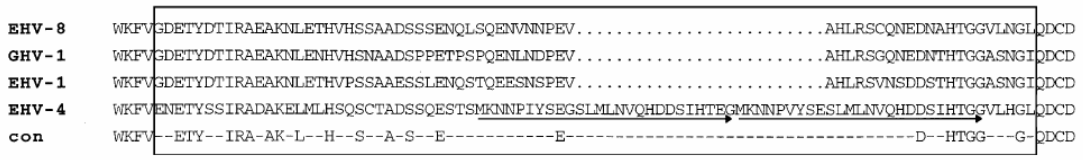
Dentre os herpesvírus isolados de cavalos, pelo menos 4 são distinguíveis antigenicamente. Eles causam uma variedade de infecções variando de doenças subclínicas a fatais e podem ser assim classificados:

1. Herpesvírus Equino tipo 1 (EHV-1), também conhecido como vírus do aborto equino (EAV), anteriormente conhecido como subtipo 1 do EHV-1 (PLUMMER et al., 1969);
2. EHV-2, o citomegalovírus equino (ECM) (PLUMMER; WATSON, 1963);
3. EHV-3, conhecido como o vírus do exantema coital dos equinos (ECE) (PETZOLDT, 1970; LUDWIG et al., 1971) e
4. EHV-4, o vírus da rinopneumonite, anteriormente o subtipo 2 do EHV-1. Este vírus foi recentemente reclassificado como um novo tipo, o vírus tipo 4 (STUDDERT et al., 1981; ALLEN; TURTINEN, 1982; CHOWDHURY et al., 1986).

Foi então aceito que dois tipos de herpesvírus, EHV-1 e -4 são agrupados separadamente com base nas diferenças em seus genomas (ALLEN; TURTINEN, 1982). Estes dois tipos foram anteriormente classificados como subtipos 1 e 2 do complexo vírus do aborto/rinopneumonite equinos (EHV-1) (DOLL et al., 1957). Deste modo, as estirpes agrupadas como EHV-4 são em sua maioria associadas a doenças respiratórias e aquelas definidas como EHV-1, por suas propriedades biológicas e seus meios moleculares

(PLUMMER et al., 1973; BORGEN; LUDWIG, 1974; STUDDERT et al., 1981; ALLEN; TURTINEN, 1982; STUDDERT, 1983; PATEL; EDINGTON, 1983) são causas de infecções respiratórias, abortos, natimortos, mortes neonatais e encefalites ocasionais em cavalos (THEIN, 1981; ALLEN et al., 1983; CHOWDHURY et al., 1986). Assumiu-se que o EHV-1 causava doença respiratória, estabelecia uma infecção latente e subsequentemente causava aborto por reativação do vírus latente. Uma série similar de eventos estava implícita para a ocorrência da encefalite por EHV-1. Através de enzimas de restrição foi possível separar e visualizar em padrões eletroforéticos os dois tipos de vírus (SABINE et al., 1981; STUDDERT et al., 1981; TURTINEN et al., 1981). Em 1988 os vírus foram designados EHV-1 e EHV-4 (ROIZMAN et al., 1992).A propriedade abortiva do EHV-1 aparentemente está restrita ao cavalo. Entretanto, relatos de isolamento de estirpes de EHV-1 de bezerros abortados (SMITH, 1976; CRANDELL et al., 1979) levantaram a questão do cruzamento da barreira natural de espécies agindo como patógeno em outros animais. Em 2011, Wohlseinet al. relataram a ocorrência de infecção por EHV-1 em quatro ursos e duas gazelas de um zoológico e em 18 cobaias de um outro. Os ursos morreram ou foram eutanasiados, todos com doença neurológica causada pelo herpesvírus, semelhante à que ocorre em equinos. As gazelas também tiveram doença neurológica fatal.Até 1981, EHV-1 e EHV-4 eram considerados o mesmo vírus e nomeados EHV-1.

Apesar da dissimilaridade genética entre EHV-1 e EHV-4 (ALLEN; TURTINEN, 1982) estes dois vírus mostraram significante reatividade sorológica cruzada intertipos. Relatos preliminares revelaram que ambos possuem glicoproteínas com reatividade cruzada (ALLEN; BRYANS, 1986).Na comparação entre as seqüências de bases dos genes das regiões homólogas que codificam as glicoproteínas G (gG) e B (gB) do HVE-4, HVE-8, HVE-9 e do HVE-1 demonstrou que, na análise filogenética, o HVE-9 é o mais próximo (FUKUSHI et al., 1997) (Figura 1).



Fonte: (TELFORD et al., 1998)

Figura 1- Sequência de aminoácidos alinhados contendo epítopos tipo específicos EHV-1 e EHV-4 próximos da região terminal variável C da gG. A linha de consenso (con) demonstra resíduos idênticos

O herpesvírus equino tipo 1 é similar a outros herpesvírus em características morfológicas e bioquímicas. Sua estrutura genômica é composta de quatro segmentos: U_L, I_R, U_S e T_R, arranjados em duas formas isoméricas as quais exemplificam os herpesvírus de classe D-tipo (ROIZMAN, 1982) similar ao genoma do vírus PsR (STEVELY, 1977; BEN-PORAT et al., 1979), VZV (DUMAS et al., 1981; STRAUS et al., 1982) e BHV-1 (MAYFIELD et al., 1983). No genoma de HSV, entretanto, tanto a sequência U_L quanto a U_S são limitados por repetições invertidas (tipo E), consequentemente, tanto o componente U_L quanto o U_S se invertem relativamente ao outro, dando origem a quatro formas isoméricas do genoma (HAYWARD et al., 1975; SKARE; SUMMERS, 1977).

O genoma do EHV-1 se mostrou uma molécula de DNA dupla fita com peso molecular de 92 Md (O'CALLAGHAN et al., 1983; SOEHNER et al., 1965), densidade flutuante de 1,716 g/cm3 em $CsCl_2$– densidade flutuante é diferente de coeficiente de sedimentação – (SOEHNER et al., 1965; O'CALLAGHAN et al., 1968), conteúdo de G + C de 56% (SOEHNER et al., 1965; O'CALLAGHAN etl al., 1983) e temperatura de fusão de 93°C (SOEHNER et al., 1965). Topograficamente, o DNA viral consiste em quatro segmentos: uma região longa única (U_L; 71,6 md), repetições internas (I_R; 6,4 md), uma região curta única (U_S; 6,5 md) e repetições terminais (T_R; 6,4 md) (HENRY et al., 1981; WHALLEY et al., 1981; RUYECHAN et al., 1982). Este arranjo permite que a molécula de DNA do EHV-1 exista em duas formas isoméricas uma vez que a região U_S pode inverter em relação à orientação da região U_L (HENRY et al., 1981; RUYECHAN et al., 1982).

Estudos sobre a homologia genética entre o vírus da pseudo raiva (PsR) e o herpesvírus simples (HSV) relevaram cerca de 10% de homologia DNA-DNA (LUDWIG et al., 1972) e uma colinearidade parcial indicando que ambos evoluíram de um ancestral comum (BEN-PORAT et al., 1983; DAVISON; WILKIE, 1983). Esta afirmação tem base nos relatos de reações antigênicas cruzadas entre diferentes herpesvírus (HONESS; WATSON, 1977). Os herpesvírus equinos EHV-1, -2, -3 e -4 são morfologicamente indistinguíveis entre si e similares aos herpesvírus de outras espécies. Seu tamanho varia de 150 a 190 nm, mas entre 150-170 nm é o mais frequentemente registrado (O'CALLAGHAN et al., 1978).

A composição protéica do EHV-1 compreende seis polipeptídeos arranjados para formar uma subunidade 162, estrutura icosaédrica, formam o nucleocapsídeo completo do vírus, de 100 nm de diâmetro, que envolve o conteúdo de DNA no centro do vírus (O'CALLAGHAN et al., 1983). A proteína mais abundante do nucleocapsídeo, a fosfoproteína (VP9) de 140 Kd, está presente em 800 cópias por virion e participa de mais de 65% da massa total de proteína do capsídeo viral (O'CALLAGHAN; RANDALL, 1976).

O capsídeo destes vírus possui diâmetro de 100 nm e consiste de 162 capsômeros elongados, poligonais, côncavos arranjados para formar um icosaedro que exibe simetria dupla, tripla ou quíntupla (DARLINGTON; RANDALL, 1963; DARLINGTON; JAMES, 1966; ABODEELY et al., 1970; LUDWIG et al., 1971; O'CALLAGHAN et al., 1978; WHARTON et al., 1981). O centro dos vírions de EHV mostraram conter genoma viral de forma significativamente resistente a DNAse (PERDUE et al., 1976) e que exibe as características morfológicas de uma estrutura toroide (FURLONG et al., 1972; ROIZMAN & FURLONG, 1974; NAZERIAN, 1974). Esta estrutura toroide elétron-densa no EHV tem um diâmetro interno de 16 nm e o diâmetro externo de 64 nm e contém um cilindro central menos elétron-denso de estrutura de barra (aproximadamente 13 nm de diâmentro) ao redor do qual a molécula linear de DNA viral está disposta em vertentes com espaçamento regular (PERDUE et al., 1975, 1976; O'CALLAGHAN; RANDALL, 1976). A área entre o capsídeo e o envelope dos vírions EHV aparece como camadas de material amorfo (tegumento) (ROIZMAN; FURLONG, 1974) e se mostrou de tamanho variável de acordo com a família de herpesvírus bem como entre os vírions de EHV do mesmo tipo ou de tipos diferentes (ROIZMAN; FURLONG, 1974; O'CALLAGHAN; RANDALL, 1976; SPEAR; ROIZMAN, 1980). O envelope é a membrana exterior, de camada tripla que envolve o nucleocapsídeo e é composto de uma camada dupla lipídica e proteínas associadas (SPEAR; ROIZMAN, 1980). Contém lipídeos, glicoproteínas virais e fosfoproteínas e é derivado da membrana intranuclear da célula infectada através do processo de brotamento dos nucleocapsídeos maduros (DARLINGTON; JAMES, 1966; ABODEELY et al., 1970; O'CALLAGHAN; RANDALL, 1976; O'CALLAGHAN et al., 1978; WHARTON et al., 1981).

As glicoproteínas G (gG) das regiões C-terminais do EHV-1 e do EHV-4 são especificamente reconhecidas pelo soro de cavalos infectados com os respectivos vírus (CRABB; STUDDERT, 1993), e ensaios ELISA com regiões tipo-específicas como antígenos

podem distinguir sorologicamente infecções por estes vírus (CRABB et al., 1995). Uma modificação de um ELISA tipo-específico para isolados do Japão foi útil para estudos soroepizoóticos e para o sorodiagnóstico de infecções com ambos os tipos de EHV (YASUNAGA et al., 1998). Este método não detectou nenhum anticorpo induzido por vacina inativada contra o EHV-1 mas pode distinguir entre EHV-1 e EHV-4 cavalos vacinados e não vacinados (YASUNAGA et al., 2000).

Desde seu isolamento a partir de seus hospedeiros naturais (membros da família Equidae), os herpesvírus equinos tem sido inoculados em uma variedade de animais experimentais. O cultivo de EHV-1 em cultura de tecidos foi primariamente relatada em tecidos fetais de cavalo, gato e hamster por RANDALL et al. (1953, 1954). Resultados variáveis foram obtidos das tentativas de propagar o EHV-1 em cultura de tecidos. Não houve proliferação em tecido renal bovino (HENSEL; DONATH, 1964). Woychiechowska (1962) notou efeito citopático (ECP) parcial em rim de macaco e nenhum efeito em rim de coelho ou células da linhagem L (fibroblasto de camundongo). Em contraste, Plummer e Waterson(1963) e Girardet al. (1963) registraram pronta proliferação em células renais de coelho, enquanto Randall e Lawson (1962) adaptaram EHV-1 passado em HeLa para crescer em células da linhagem L. Burrows e Goodridge (1973) encontraram que a maioria das linhagens de referência e fetais do vírus produziam placas em rim de bezerro, testículo de bezerro, rim de cordeiro, rim embrionário de cobaia e células RK-13, enquanto a maioria das linhagens isoladas do trato respiratório não induziam placas em tais células. Variações na morfologia da placa e características de crescimento são marcadores úteis para distinguir entre as linhagens virais. Borgen (1970, 1972) diferenciou linhagens com base na produção de placas na linha L de células murinas. Em um importante estudo, células equinas e suínas se mostraram o sistema mais adaptado para isolamento, proliferação e passagem de linhagens do EHV-1 (KOCH, 1967).

Os ciclos replicativos dos herpesvírus equinos exibem diferenças em relação à quantidade de vírions infecciosos produzidos, à duração do período de eclipse, e à quantidade de vírus liberada da célula. O EHV-1 se replica rapidamente a altos títulos virais de 10^7 UFP/mL a 10^9 UFP/mL. A quantidade de vírus liberado varia de acordo com o tipo celular (DARLINGTON; JAMES, 1966; O'CALLAGHAN et al., 1968; LAWRENCE, 1971; ALLEN; BRYANS, 1974, 1976).

Infecções com o herpesvírus equino (tipos 1-4) são caracterizadas pela formação de corpúsculos de inclusão eosinofílicos típicos, intranucleares (Cowdry tipo A) (McKERCHER, 1973; STTUDERT, 1974). Em infecções por EHV-1 os efeitos citopáticos se desenvolvem rapidamente e são concomitantes com a aparição de corpúsculos de inclusão, as células cultivadas em monocamada perdem sua morfologia característica, se tornando arredondadas, agregadas e destacadas. Ambos os tipos formam sincício bem como placas sob a camada embora o tamanho das placas e o tempo necessário para sua formação variem (PASCOE et al., 1969).

O EHV-1 se replica em uma etapa cinética (?) de crescimento in vivo no Hamster Sírio (RANDALL; BRACKEN, 1957; O'CALLAGHAN et al., 1972) e in vitro na linhagem celular L-M (DARLINGTON; JAMES, 1966; O'CALLAGHAN et al., 1968). Shimizu et al. (1957, 1963) relataram para cultivos em monocamada um período latente de 7 horas para o EHV-1. O mesmo grupo (ISHIZAKI et al, 1962; ISHIZAKI; SHIMIZU, 1964) demonstrou por técnica de imunofluorescência que durante o período latente do EHV-1 somente o antígeno solúvel "S" se desenvolveu no interior do núcleo e provavelmente seja codificado pelo DNA viral. Um antígeno "V" associado à partícula infecciosa viral poderia ser demonstrado no citoplasma à hora 7 coincidindo com o primeiro aparecimento de vírus associados à células; após a propagação através do citoplasma, pouca fluorescência ou infectividade permaneceu à hora 24 pós-infecção.

Partículas defeituosas que interferem com a replicação de vírus não-defeituosos (padrão) relacionados foram detectadas na maior parte dos sistemas virais animais (HUANG, 1973). A produção de partículas defeituosas interferentes (DI) foi demonstrada durante passagens de rotina de diversos herpesvírus incluindo o vírus herpes simplex (BRONSON et al., 1973; FRENKEL et al., 1975), vírus da pseudoraiva (BEN-PORAT et al., 1974, 1975; RUBINSTEIN; KAPLAN, 1975), herpesvírussaimiri (FLECKENSTEIN et al., 1975) e herpesvírus equino tipo 1 (CAMBELL et al., 1976). EHV-1 é o único herpesvírus que demonstrou produzir partículas DI in vivo (CAMBELL et al., 1976).

Tanto o EHV-1 quanto o EHV-4 mostram um padrão complexo e variável de produção de doença no cavalo. Em quase todas as tentativas, feitas para estabelecer uma correlação entre EHV-1 e EHV-4 (anteriormente classificados como tipos 1 e 2 do EHV-1) e uma

entidade patológica específica no cavalo, foram encontradas inconsistências. A primeira observação relatada que indicava que poderiam haver maiores diferenças antigênicas entre isolados clínicos de EHV-1 e EHV-4 foi feita em 1959 (SHIMIZU et al., 1959). Estes investigadores registraram que um isolado de material fetal proveniente do Japão (estirpe 45) diferia significativamente da estirpe Americana Ky-D através de testes de neutralização cruzada. Mais tarde, Burrows e Goodridge (1972) demonstraram alta correlação entre o tipo antigênico e a origem anatômica dos isolados virais. Na maioria das instâncias, vírus isolados de fetos abortados pertenciam a um tipo antigênico, EHV-1, (anteriormente subtipo 1), enquanto isolados recuperados de infecções do trato respiratório se encaixavam num tipo diferente, EHV-4, (anteriormente subtipo 2). Comparações posteriores de isolados fetais e neonatais com isolados de trato respiratório (EHV-4) por pesquisadores na Austrália (STUDDERT; BLACKNEY, 1979) e no Reino Unido (BURROWS; GOODRIDGE, 1975) revelaram diferenças adicionais entre os dois grupos antigênicos do vírus na sua gama de hospedeiros de cultura de tecidos, medida de multiplicação e eliminação nasofaríngea do cavalo, capacidade de causar viremia e abortigenicidade. Embora as consistentes, mas leves, diferenças entre os isolados de EHV-1 e EHV-4 (aproximadamente 4-8 vezes de diferença nos títulos de neutralização cruzada) permitiram que fossem separados em dois tipos distintos (anteriormente subtipos do EHV-1) em 1959, a magnitude das diferenças entre os dois tipos não foi plenamente reconhecida e gerou confusões como isolados fetais eventualmente classificados como subtipo 2 através de sorologia e ensaios de gama de hospedeiros, e isolados caracterizados como subtipo 1 eram ocasionalmente recuperados da nasofaringe de cavalos com infecções do trato respiratório. Devido a tais incertezas, a identificação definitiva não foi possível até 1981, quando seus DNAsgenômicos foram comparados por análise de endonucleases de restrição (SABIN et al., 1981; STUDDERT et al., 1981; TURTINEN et al., 1981). A análise de DNA viral com enzimas de restrição foi recentemente estabelecida como uma poderosa ferramenta para investigar diversidade genética entre isolados de espécies particulares de herpesvírus e para estudos epidemiológicos (BUCHMAN et al., 1978; LONSDALE et al., 1979; ALLEN et al., 1983; CHOWDRHURY et al., 1986). A aplicação desta nova e altamente sensível técnica de *fingerprinting* para isolados de EHV-1 representativos dos dois subtipos do vírus previamente revelaram um achado inesperado: a variedade das diferenças genéticas entre os dois subtipos de EHV-1 era muito maior do que podia ser previsto a partir de testes extensos de reatividade cruzada entre os dois grupos de vírus. A

falha em demonstrar qualquer padrão de clivagem da endonuclease de restrição comum aos dois subtipos de EHV-1 imediatamente levaram à sugestão feita por Studdertet al. (1981) de que dois grupos de herpesvírus equinos classificados por muitos anos como subtipos do EHV-1 deveriam agora ser tratados como agentes biológica, genética e taxonomicamente distintos (EHV-1 & EHV-4) que retiveram um grande grau de relação imunológica durante sua evolução divergente a partir de um herpesvírus ancestral comum.

O aborto do feto equino devido a uma possível infecção viral específica foi primeiramente descrito como uma entidade clínica por Dimock e Edwards (1932) e no mesmo ano foi produzido em éguas através da inoculação de material proveniente de fetos abortados. Estudos subsequentes estabeleceram a etiologia viral e definiram a manifestação clínica e as lesões patológicas definidas no potro abortado (DIMOCK; EDWARDS, 1933; DIMOCK, 1940). Desde sua origem nos EUA a doença tem sido relatada em diversos países em várias partes do mundo. Os vírus isolados em muitas partes do mundo são antigenicamente muito similares ao vírus originalmente isolado cerca de quatro décadas antes a partir de fetos abortados no Kentucky (STUDDERT, 1974).

A infecção respiratória associada ao vírus do aborto equino (EAV) foi pela primeira vez estudado experimentalmente por Dollet al. (1954). As evidências deste estudo mostraram que o EAV era o agente etiológico de uma doença respiratória epizoótica de cavalos jovens. Dollet al. (1957) sugeriram que o agente primordialmente conhecido como EAV deveria ser considerado como um vírus respiratório devido às lesões histológicas como necrose epitelial e formação de trombos e petéquias no trato respiratório de cavalos jovens e potros abortados. Portanto, o agente foi nomeado vírus da rinopneumonite.

A epidemiologia da infecção por EHV-1 se tornou mais complexa com o aparecimento de síndromes diferentes da doença respiratória e do aborto. O EHV-1 foi isolado a partir do material proveniente de 22 de 27 potros que morreram em uma fazenda durante um surto de natimortos e morte perinatal (HARTLEY; DIXON, 1979). Além disso, houve um número de relatos de infecções por EHV-1 associadas a síndromes paralíticas. A última doença é geralmente esporádica, mas foram registrados surtos (SAXEGAARD, 1966; GREENWOOD; SIMSON, 1980; CROWHURST et al., 1981; THEIN, 1981). Em ocorrências naturais e experimentais a prenhez se mostrou como um pré-requisito para a doença neurológica

(JACKSON; KENDRICK, 1971; LITTLEE; THORSON, 1976; JACKSON et al., 1977), mas diversos trabalhos (DINTER; KLINGEBORN, 1976; THOMSON et al., 1979; PLATT et al., 1980; CROWHURST et al., 1981; THEIN, 1981) demonstraram que a doença também ocorre em fêmeas improdutivas, garanhões, castrados e potros.Nugentet al. (2006) encontraram uma associação significativa da mutação na ORF30 com surtos de doenças neurológicas.

Como ocorre com todos os herpesvírus, assume-se que tanto o EHV-1 quanto o EHV-4 estabelecem infecções latentes persistentes e vitalícias. Experimentalmente, ambos os vírus podem ser reativados com altas e prolongadas doses de corticosteróides e leve trauma nasal (EDINGTON et al., 1985; BROWNING et al., 1988). A reativação do EHV-4 latente provavelmente causa doença recorrente acompanhada de dispersão viral e a oportunidade de transmissão para outros animais, direta ou indiretamente. Usualmente, cada geração de potros nascida em uma fazenda é acompanhada de uma rodada de doença respiratória causada por EHV-4 (rinopneumonite). A reativação do EHV-1 latente no cavalo pode causar doença respiratória branda e transmissão para os outros animais contactantes. Se o vírus é reativado em uma fêmea prenhe sem histórico de aborto, ela pode vir a abortar em decorrência desta reativação. O abortamento de um feto (feto, membranas e fluidos fetais) infectado por EHV-1 proporciona um alto risco de infecção para fêmeas contactantes. É assim que se forma o cenário para um surto de abortamentos onde até 80% de fêmeas infectadas desta forma podem abortar em 3 semanas a partir do primeiro caso. Onde há ocorrência de abortamento, o caso pioneiropode ter pelo menos três origens: 1) uma fêmea portadora que dissemina o vírus após reativação a partir somente do trato respiratório; 2) uma fêmea que aborta um feto; ou 3)uma fêmea que inicialmente dissemina o EHV-1 pelo trato respiratório e em seguida aborta. Aparentemente as fêmeas abortam por EHV-1 apenas uma vez. Seguindo o primeiro caso de abortamento, o vírus é transmitido eficientemente de forma horizontal para outras fêmeas contactantes (CAMPBELL; STUDDERT, 1983; ALLEN; BRYANS, 1986; STUDDERT et al., 1992).

A doença nervosa associada à infecção por EHV-1 foi relatada com aumento da frequência em 20 anos (SAXEGAARD, 1966; BITSCH; DAM, 1971; CHARLTON et al., 1976; DINTER; KINGEBORN, 1976; LITTLE; THORSON, 1976; THEIN, 1979; GREENWOOD; SIMSON, 1980; CROWHURST et al., 1981; THEIN, 1981). Surtos naturais de doença nervosa por EHV-1 são geralmente associados a abortos e/ou doença respiratória, mas este não é o caso

invariavelmente; houve relatos de doença nervosa por EHV-1 sem aborto concorrente ou doença respiratória (DINTER; KLINGEBORN, 1976; THEIN, 1981). Estudos epizootiológicos moleculares feitos por análise de endonuclease de restrição revelaram que estirpes de EHV-4 raramente são causa de abortos equinos e nunca foram associadas a surto de múltiplo caso de aborto, mortalidade perinatal ou casos de doença do sistema nervoso central relacionada ao EHV-1. Reciprocamente, epizootias evidentes de doença do trato respiratório por EHV-1 em cavalos jovens, embora geralmente resultado de infecção por EHV-4 (anteriormente subtipo 2 do EHV-1), podem ocasionalmente ser causadas por EHV-1 (anteriormente subtipo 1 do EHV-1), também.

Embora o hospedeiro natural de infecções por EHV-1 seja o cavalo, há relatos de jumentos susceptíveis ao EHV-1 (HENNING, 1946; MATUMOTO et al., 1965). Bovinos, ovinos e suínos são improváveis de serem portadores (SHIMIZU et al., 1963). Entretanto, Crandellet al. (1978) caracterizaram com base em sorologia e infecção experimental em pôneis um isolado de EHV-1 proveniente de feto bovino.

Os mapas de clivagem da enzima de restrição foram construídos para os genomas de duas estirpes de EHV-1, a estirpe de célula de camundongo adaptada L-M de alta passagem (HENRY et al., 1981), e a estirpe HVS-25, isolado de campo de baixa passagem em cultura de tecido (WHALLEY et al., 1981). Diferenças significativas entre as duas estirpes de EHV-1 são evidentes na distribuição dos sítios de clivagem da enzima de restrição dentro do DNA viral. Tais diferenças levantaram a questão sobre o efeito da passagem múltipla serial do EHV-1 em cultura de células ou animais de laboratório na estabilidade do genoma viral.

Passagens múltiplas de EHV-1 em linhagens celulares derivadas de diversas espécies não equinas (p. e. camundongo, macaco, coelho, hamster) ou em hamster sírio rapidamente deu origem à perda ou ao ganho de sítios de clivagem de restrição. As alterações nos padrões de restrição do DNA de diversas estirpes de EHV-1 vacinais atenuadas são sem dúvida o resultado do alto número de passagens laboratoriais em linhagens celulares não equinas (ALLEN et al., 1983).

Um segundo tipo de passagem induziu variação genônica do EHV-1 consistindo em alterações menores de tamanho, e, portanto, de mobilidade eletroforética dos fragmentos selecionados da enzima de restrição. Este tipo de variação aparentemente foi o resultado de

alterações nas freqüênciasde cópias de sequencias repetitivas de DNA curto ocorrendo em regiões restritas do genoma do herpesvírus (UMENE et al., 1983; HAMMERSCHMIDT et al., 1986). Entretanto, a uniformidade das impressões de DNA do EHV-1 durante múltiplas passagens em linhagens celulares equinas fazem a análise de endonuclease de restrição uma ferramenta valiosa para diferenciação destas estirpes virais.

Isolados de EHV-1 foram subdivididos em 16 estirpes genéticas através das impressões de DNA. Dois dos tipos eletroforéticos isolados de fetos abortados foram identificados como estirpe vacinal de EHV-1 vivo modificado. Somente 14% do número total de sítios de clivagem reconhecidos por cinco enzimas de restrição foram variáveis entre 235 isolados de campo de EHV-1 de origem não-vacinal. Este fato juntamente com a observação de que 67% das epizootias de aborto por EHV-1 são causadas por isolados de EHV-1 que não podem ser diferenciados por análise de restrição (ALLEN et al., 1983) indicam que as estirpes de EHV-1 não exibem a variabilidade extensa observada entre os isolados de herpesvírus humanos (ROIZMAN; BUCHMAN, 1979). Uma diversidade mais extensa nos padrões de impressão de DNA foi observada entre os isolados de EHV-4 nos quais 13 distintos padrões de DNA se revelaram entre 21 isolados epizootiológicos não relacionados (ALLEN et al., 1983).

Allen e Turtinen(1982) investigaram a relação entre os genomas dos EHV-1, -2 e -4. Os resultados mostraram que o DNA do EHV-2 não compartilha homologiacom os EHV-1 e -4 e vice-versa.

A análise da distribuição de sequências relacionadas no genoma de diferentes herpesvívurs pela técnica de hibridização Southern blot indica que embora a história evolucionária separada estes vírus evoluíram a partir de um ancestral comum (BEN-PORAT et al., 1983; DAVISON; WILKIE, 1983).

Os genomas dos HSV-1 e -2 são colineares e compartilham homologia extensiva em aproximadamende 50% de suas sequencias (LUDWIG et al., 1972; DAVISON; WILKIE, 1983). Os genomas do EHV-1 e do VZV são colineares com certos arranjos genômicos isoméricos do HSV (DAVISON; WILKIE, 1983). Aproximadamente 7-8% das sequências do vírus PsR são compartilhadas com o DNA dos HSV-1 e -2 (LUDWIG, 1972) e as regiões homólogas são distribuídas por todo o genoma do vírus PsR (RAND; BEN-PORAT, 1980). O genoma do vírus PsR é essencialmente colinear com arranjos específicos do genoma do HSV exceto a região

das unidades 0,1 a 0,4 do genoma fracional, aparentemente invertidas (DAVISON; WILKIE, 1983). A comparação entre o tipo D de herpesvírus animais revelaram 8% de sequencias homólogas no DNA do vírus PsR e BHV-1 (BUSH; PRITCHELL, 1985). Entretanto, o EHV-1 não foi comparado com outros herpesvírus animais tipo D em respeito à homologia de DNA.

Do ponto de vista da infecção em início, variante viral, tropismo tecidual e imunidade provocada do animal, os polipeptídeos presentes no envelope viral são as proteínas mais importantes do EHV-1. Estes são também os antígenos que imunizam o cavalo contra a infecção viral e servem como antígenos-alvo contra os quais a resposta imune do hospedeiro é direcionada (PAPP-VID; DERBYSHIRE, 1978, 1979). Uma análise compreensiva das proteínas do envelope do EHV-1 e -4 (TURTINEN; ALLEN, 1982; TURTINEN, 1983) revelaram que cerca de 12polipeptídeos diferentes (6 maiores e 6 menores) estão localizados dentro do envelope para os dois grupos virais.

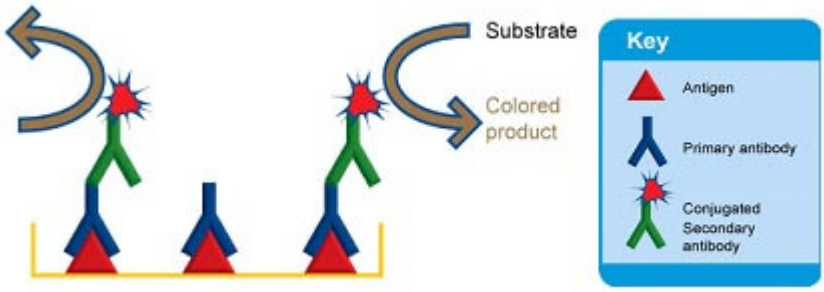
Os polipeptídeos estruturais de isolados não relacionados epizootiologicamente ou geneticamente distintos de EHV-1 exibem uma notável homogeneidade em seus perfis eletroforéticos em gel de acrilamida. Entretanto quando proteínas de EHV-1 e -4 são comparadas, são detectadas diferenças maiores (TURTINEN; ALLEN, 1982; TURTINEN, 1983). Tais diferenças não foram relacionadas à variação na mobilidade eletroforética de grlicoproteínas de envelope e proteínas não-glicosiladas estruturais.

Os antígenos individuais do EHV-1 que provocam a formação do anticorpo específico para o vírus tanto no cavalo quando no coelho de laboratório, foram identificados e caracterizados (TURTINEN, 1983; TURTINEN et al., 1985). O soro convalescente de animais recuperados de infecções respiratórias por EHV-1 continham anticorpos reativos com 5 das 6 glicoproteínas maiores do vírus (VGP1, 10, 13, 14 e 22a) além da proteína de capsídeo maior (VP9). Foi demonstrada também uma imunorreatividade similar no soro produzido contra o EHV-1 para as proteínas VGP2, 10, 13 e 14 do EHV-4. A reação de imunoblotting com soro hiperimune de coelho com nove isolados de EHV-1 não relacionadosentre si mostrou quatro glicoproteínas que geram reação cruzada sorologicamente entre EHV-1 e -4 (VGP2, 10, 13 e 14). As glicoproteínas VGP2, 10, 13 e 14 parecem ser os antígenos mais imunogênicos em cavalos e coelhos, enquanto VGP2 e 14 foram os antígenos que geraram mais reação cruzada nestes dois grupos de herpesvírus equino.

1.2 SORODIAGNÓSTICO DOS HERPESVÍRUS

Para diagnosticar a presença de anticorpos contra os herpesvírus, pode-se lançar mão de testes imunológicos, como o ELISA (teste de ligação primária), a soroneutralização e a fixação de complemento (testes de ligação secundária).

O teste de ELISA indireto consiste em revestir o fundo de placas de poliestireno com o antígeno (a partícula viral à qual o anticorpo se liga preferencialmente). Adiciona-se aos poços o soro a ser testado: se houver anticorpos, haverá ligação. Segue-se a este passo a adição de anticorpos marcados com enzima contra partículas conhecidas do anticorpo que deve estar presente no soro testado e então a reação é revelada, como indica a figura 2.



Fonte: www.abcam.com

Figura 2- Ilustração do princípio da técnica de ELISA indireto. O anticorpo primário é a variável do sistema; em sua presença há ligação do anticorpo secundário e posterior geração de sinal revelando a positividade no teste

O teste de soroneutralização consiste em adicionar ao soro testado, vírus com título conhecido. Adiciona-se então células de cultivo em concentração conhecida e o resultado da reação advém da presença ou não de efeito citopático. Se houver ligação anticorpos-vírus, as células nada sofrerão. Se o soro testado não contiver os anticorpos procurados, os vírus ficam livres e atacam as células, gerando o efeito citopático, como indica a figura 3.

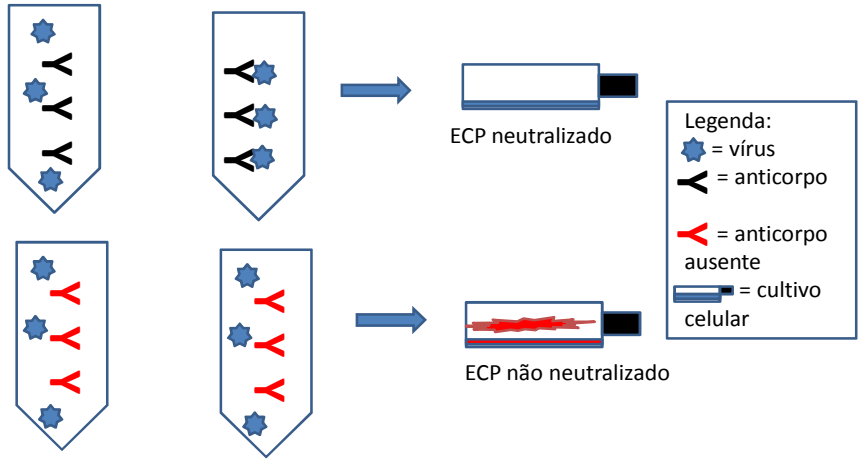
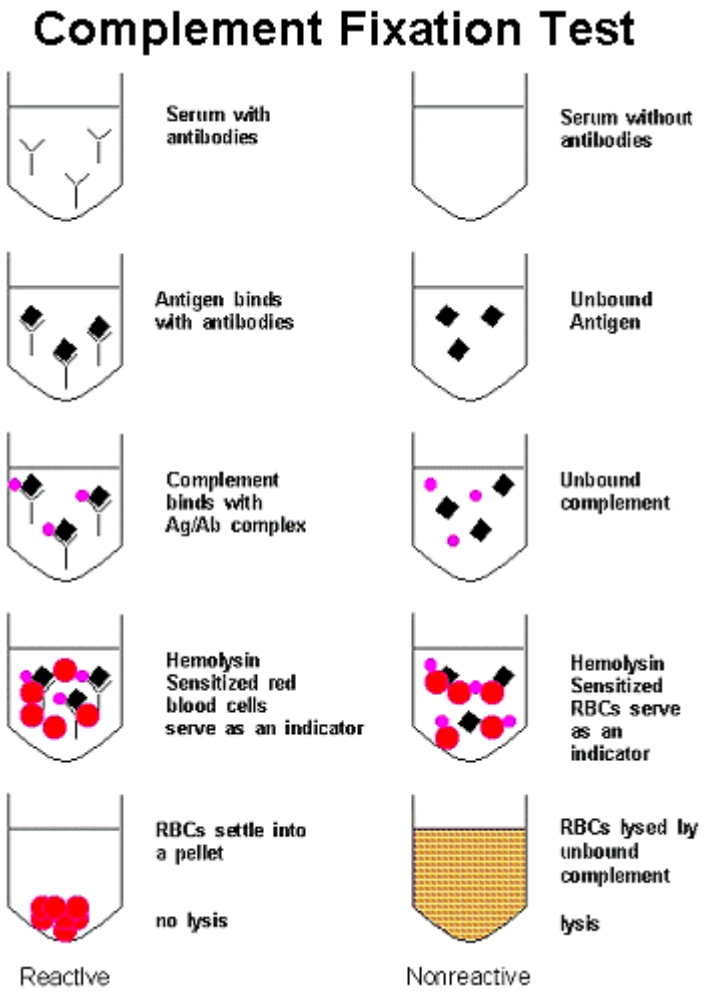


Figura 3 - Esquema ilustrativo da reação de soroneutralização viral. A presença de anticorpos específicos contra o vírus adicionado à reação impede a geração de efeito citopático no cultivo celular

O teste de fixação de complemento utiliza um sistema hemolítico como revelador da reação de ligação antígeno-anticorpo, de acordo com a figura 3.



Fonte: Texas Department of State Health.

Figura 4 - Ilustração do princípio da técnica de Fixação de Complemento. A presença, no soro testado, do anticorpo contra o vírus conhecido, consome o complemento adicionado à reação mantendo as células sanguíneas intactas

O conhecimento da extensa reatividade cruzada entre os dois subtipos de EHV-1 e o fato de que repetidas infecções respiratórias pelo EHV-4 em cavalos podem resultar no desenvolvimento de um nível significativo de imunidade a infecções com o vírus EHV-1 abortigênico é compatível com uma observação epizootiológica precoce de abortos por EHV-1 de que os surtos mais sérios de abortamento ocorreram em fazendas que estiveram livres de doenças do trato respiratório em animais jovens por diversos anos (DOLL; BRYANS, 1963).

Testes sorológicos realizados para evidenciar a presença de anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4 têm demonstrado que esses vírus estão disseminados em todos os países do mundo (MATUMOTO et al., 1965) incluindo Austrália (BAGUST; PASCOE, 1968; DUXBURY;

OXER, 1968; STUDDERT et al., 1970; GILKERSON et al., 1994, 1999b; CRABB et al., 1995), Japão (KAWAKAMI et al., 1962), Reino Unido (POWELL et al., 1976), Nova Zelândia (JOLLY et al., 1986), Canadá (CARMAN et al., 1997), EUA (DOLL; BRYANS, 1963; MUMFORD et al., 1998) e China (MASON et al., 1989). A categoria da população eqüina mais susceptível à doença respiratória causada pelo EHV-1 e pelo EHV-4 é a de potros, mais notadamente ao desmame (BRYANS, 1981). Entretanto, estudos epidemiológicos focados em animais com mais de 12 meses de idade (DOLL; BRYANS, 1963; TURNER et al., 1970; BAGUST et al., 1972) e em diversos casos a exposição ao EHV-1 e ao EHV-4 não era diferenciada pelos testes sorológicos tradicionais, como por exemplo, a fixação de complemento e a soroneutralização devido a reações cruzadas de antigenicidade.

Ambos os virus possuem ampla distribuição e possuem importância econômica considerável para a indústria da eqüinocultura. Uma vez que os anticorpos policlonais ao EHV-1 e ao EHV-4 possuem altas taxas de reação cruzada, determinações sorológicas da infecção causada por qualquer um dos dois tipos virais tem sido difícil. A maioria dos animais recuperados clinicamente se mantém infectados para o resto da vida. Os animais podem se tornar portadores crônicos da doença, disseminando o vírus. As vacinas disponíveis atualmente proporcionam um meio de restringir a disseminação do vírus. Entretanto, não proporcionam proteção total, portanto pode se valer de métodos diagnósticos para identificar e isolar animais infectados.

Foi desenvolvido um teste ELISA capaz de distinguir animais infectados por EHV-1, EHV-4 e ambos (CRABB et al., 1995), conforme a figura 5. Utilizando este teste em uma ampla pesquisa soroepidemiológica, Crabbe Studdert (1993) mostraram que apenas 9% dos soros testados foram positivos para o EHV-1, enquanto todos os soros testados foram positivos para o EHV-4. Os soros eram provenientes de animais Autralianos Puros escolhidos randomicamente obtidos entre 1967 e 1974, anterior ao primeiro caso de abortamento confirmado na Austrália em 1977. Mais recentemente, a prevalência do anticorpo específico ao EHV-1 em uma amostragem randômica de 97 cavalos Australianos Puros foi de 30% (CRABB et al., 1994) enquanto a prevalência de anticorpos específicos ao EHV-4 nestes cavalos foi de 100%.

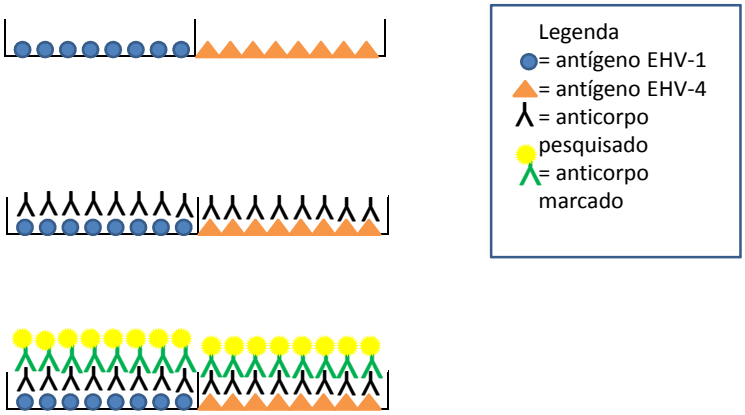


Figura 5 - Ilustração do kit de ELISA utilizado para detectar simultaneamente EHV-1 e EHV-4, utilizando em espaços adjacentes regiões que diferenciam os dois tipos virais como antígenos

1.3 HERPESVÍRUS EQUINO NO BRASIL

Uma vez que o agronegócio ligado a cavalos emprega mais de 1 milhão de pessoas no Brasil, distribuídas em mais de 120 atividades que variam desde a confecção de selas até o turismo eqüestre, reconhece-se a importância de estudar doenças que possam de alguma forma afetar este panorama.

No Brasil, o primeiro relato de doença relacionada ao EHV foi feito por Corrêa e Nilsson(1964), com a identificação de inclusões de partículas virais em hepatócitos de fetos equinos abortados, provenientes da região de Campinas – SP, em propriedades com histórico prévio de sintomatologia respiratória.

As vacinas disponíveis no Brasil são compostas de vírus morto, contendo tanto EHV-1 quanto EHV-4. O esquema de vacinação proposto é de dose dupla inicial em intervalo de 1 mês, sendo repetida anual ou semestralmente, para animais adultos. Para potros, o esquema vacinal sugerido é de 1 dose aos 4 meses e reforço 30 dias depois, seguindo o esquema vacinal para adultos a partir de então. Para fêmeas adultas vacinadas, propõe-se que seja feita aplicação no quinto, sétimo e nono meses de gestação, de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial dos EHVs em nosso país é feito por meio do isolamento e identificação viral e por testes sorológicos com anticorpos policlonais (KOTAIT et al., 1989; MODOLO et al., 1989; WEIBLEN et al., 1994). No entanto, as provas de sorodiagnóstico empregadas rotineiramente, como a fixação de complemento e a soroneutralização viral, são ineficientes na diferenciação dos tipos 1 e 4 do EHV devido às reações cruzadas, fato que compromete a interpretação dos resultados de levantamentos epidemiológicos (ALLEN; BRYANS, 1986; CRABB; STUDDERT, 1993).

No Brasil, foi relatado isolamento de EHV-1 de caso de doença neurológica (LARA et al., 2008) e de abortamento ou mortalidade perinatal (REINER et al., 1972; CUNHA et al., 1993; WEIBLEN et al., 1994; CARVALHO et al., 2000; CARVALHO et al., 2004).

Através de PCR e sequenciamento, a detecção do EHV-1 de caso de doença neurológica no Brasil foi realizada por Costaet al., 2006.

Levantamentos sorológicos realizados no Brasil empregando o EHV-1 como antígeno, revelam diferentes porcentagens de animais sororreatores (Quadro 2). Vale ressaltar que a maioria destes trabalhos foi realizada com bancos de conveniência, excetuando os estudos de Heinemann (2002) e Cunha (2009), os quais empregaram amostragem a fim de estimar a prevalência da infecção.

Autores	Amostras	Teste sorológico	Antígeno	% de positivos	N	Localidade
FERNANDES (1988)	BC	FC	EHV-1	67,2	586	SP
MODOLO et al. (1989)	BC	FC	EHV-1	17,6	250	SP (Noroeste)
KOTAIT et al. (1989a)	–	SN	EHV-1	13,5	1.178	SP
KOTAIT et al. (1989b)	–	SN SN SN SN	EHV-1	24,3 (1986) 50,0 (1987) 70,0 (1988) 40,0 (1989)	– – – –	SP (Ribeirão Preto) SP (Ribeirão Preto) SP (Ribeirão Preto) SP (Ribeirão Preto)
VASCONCELLOS (1992)	BC	FC FC	EHV-1	88,14 67,3	59* 52**	SP SP
GAMA (1992)	BC	FC IP IFI SN	EHV-1	55,0 92,0 92,0 92,3	300 300 300 300	SP SP SP SP
DIAS (2000)	BC		EHV-1 EHV-4			PA
CUNHA et al. (2002)	–	SN	EHV-1	27,2	1.341	SP (noroeste)
HEINEMANN et al. (2002)	DE	SN	EHV-1	17,71	96	PA (Uruará)
LARA, et al. (2003a)	BC	SN	EHV-1	14,3	70	PR
LARA, et al. (2003b)	BC	SN	EHV-1	33,4	659	SP
CUNHA et al. (2005)	BC	SN	EHV-1	22,7	174	RO
LARA, et al. (2006)	BC	SN	EHV-1	4,1	97	PR
DIEL et al. (2006)	BC	SN	EHV-1	4,5	1506	RS
CUNHA et al. (2009)	DE	SN	EHV-1	26,0	163	SP (sul)

BC = Banco de Conveniência; DE = Delineamento Experimental; FC = Fixação de Complemento; SN = Soroneutralização.

*histórico de abortamento

**sem histórico de abortamento

Quadro 2 - Histórico de Pesquisa de Anticorpos contraHerpesvírus no Brasil

Até o presente somente um estudo relata a pesquisa de anticorpos específicos contra o EHV-4, realizado no Pará (DIAS, 2000).

Vale ressaltar que todos os demais levantamentos sorológicos realizados no Brasil empregaram as técnicas de fixação de complemento ou de soroneutralização, as quais não permitem diferenciar os dois tipos de EHV.

2 OBJETIVOS

Face à inexistência, na literatura consultada, de informações sobre a ocorrência de anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4 em equinos do Estado de São Paulo, foi delineado o presente estudo, visando:

- ✓ Pesquisar, através da técnica de iELISAgG, a ocorrência de anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4 em equinos,vacinados e não vacinados, assintomáticos,de propriedades do Estado de São Paulo assintomáticos;
- ✓ Comparar os resultados obtidos pela técnica de iELISAgG com aqueles obtidos pela técnica convencional de soroneutralização em cultivo celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais Estudados

Foram estudados os soros de 512equídeos de propriedades do Estado de São Paulo, provenientes de banco de soros, de acordo com o quadro 3.

Mesorregião	Município	Nº de Animais	Status Vacinal
Araçatuba	Lavínia	54	NV
Bauru	Agudos	25	NV
Campinas	Águas de Lindóia	25	NV
	Amparo	42	V
	Campinas	20	V
	Pirassununga	59	NV
Itapetininga	Apiaí	22	NV
	Capão Bonito	59	NV
	Cesário Lange	13	NV
	Iporanga	25	NV
Litoral Sul	Barra do Turvo	27	NV
	Eldorado	6	NV
	Miracatú	1	NV
	Pariquera-Açu	8	NV
	Pedro de Toledo	4	NV
	Sete Barras	10	NV
Macro Metropolitana Paulista	Ibiúna	5	V
	Itu	25	V
Metropolitana de São Paulo	Cotia	16	V
	Mairiporã	8	NV
Ribeirão Preto	Colina	31	NV
	Orlândia	27	V
Total		512	V=160 / NV=352

NV = Não Vacinados; V = Vacinados

Quadro 3-Relação dos Animais Estudados, Classificados de Acordo com os Municípios

Destes animais, foram colhidas informações como: espécie, idade e sexo.

Obtenção dos Soros

Dos animais estudados foram obtidas, por punção em sistema de colheita a vácuo (BD) da veia jugular externa, amostras de 10,0 mL de sangue sem anticoagulante. Em seguida, as amostras de soro foram separadas pela centrifugação a 260 g por 15 minutos em centrífuga Eppendorf e armazenadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL a -20°C até a realização das provas de soroneutralização viral ou iELISAgG.

Pesquisa de Anticorpos Séricos para o EHV pela Técnica de Soroneutralização

A detecção de anticorpos contra o EHV foi realizada utilizando a microtécnica de soroneutralização, segundo metodologia publicada por Kotaitet al. (1989) e descrita a seguir:

- Depositar 25 µL de meio MEM em cada um dos 96 poços de uma placa 8 X 12 de poliestireno de fundo plano;
- Depositar 10 µL de soro não reagente no poço A6;
- Depositar 10 µL de soro reagente no poço A7;
- Depositar 10 µL de cada soro a ser testado nos poços A8, A9, A10, A11 e A12;
- Diluir os soros, passando 25 µL da solução formada para os poços da linha B, desta para a C e assim sucessivamente, retirando 25 µL da linha G e descartando;
- Diluir o vírus de acordo com a titulação:
- A solução que contém 100 doses de vírus é colocada na coluna 2 e em todas as outras colunas de soros a serem testados;
- A solução que contém 10 doses é colocada em toda a coluna 3;
- A solução que contém 1 dose é colocada em toda a coluna 4;

- A solução que contém 0,1 dose é colocada em toda a coluna 5;
- Incubar em estufa a 37°C por 1 hora;
- Adicionar, em cada orifício, 200 µL de suspensão de células VERO, contendo aproximadamente 100.000 – 200.000 células;
- Incubar em estufa a 37°C por 72 horas;
- Proceder a leitura em microscópio óptico;
- A presença de efeito citopático indica soro não reagente e a ausência do efeito indica soro reagente (os anticorpos presentes foram capazes de neutralizar a ação do vírus sobre as células).

Os títulos dos soros sanguíneos (expressos em log10) foram considerados positivos a partir da menor diluição (maior ou igual a 4) capaz de inibir 100% do efeito citopático.

Pesquisa de Anticorpos Séricos para o EHV pela Técnica de iELISAgG

Para a detecção e diferenciação dos anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4 foi utilizado o kit comercial SVANOVIR EHV ¼ Ab (SvanovaBiotech AB), com antígeno recombinante da região variável C terminal da glicoproteína G (gG) do EHV-1 e do EHV-4, de acordo com os passos descritos a seguir:

- Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes do uso. Dar à cada faixa da placa um número;
- Pré-diluir as amostras de soro a 1/100 com tampão de diluição de amostra;
- Adicionar 100 de Solução Controle Positivo e 100 µL de Solução Controle Negativo aos orifícios selecionados. Para fins de confirmação, recomenda-se que as soluções-controle sejam utilizadas em duplicata;
- Adicionar 100 µL da amostra de soro pré-diluída a cada orifício;

- Selar as faixas e incubar por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação;
- Lavar as placas 4 vezes com Tampão PBS-Tween: a cada ciclo de lavagem, preencher os orifícios, esvaziar a placa e bater contra a bancada para eliminar todos os resquícios de fluido;
- Adicionar 100 µL de conjugado HRP diluído a cada orifício;
- Incubar a placa por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação;
- Lavar as placas 4 vezes com Tampão PBS-Tween: a cada ciclo de lavagem, preencher os orifícios, esvaziar a placa e bater contra a bancada para eliminar todos os resquícios de fluido;
- Adicionar 100 µL de Solução Substrato a cada orifício. Incubar por 10 minutos à temperatura ambiente. Iniciar a contagem do tempo ao preencher o primeiro orifício;
- Interromper a reação ao adicionar 50 µL de Solução Stop a cada orifício. Adicionar a Solução Stop na mesma ordem que a Solução Substrato;

Medir a Densidade Óptica (OD) dos controles e das amostras a 450 nm em espectrofotômetro Multiskan, Titertek (utilizar ar como branco). Medir a OD em 15 minutos após a adição da Solução Stop para prevenir a variação dos valores de OD.

Análise dos Resultados

Infecções pelo EHV-1 e EHV-4

As infecções por EHV-1 e EHV-4, diagnosticadas pelas técnicas de iELISA gG e Soroneutralização foram analisadas em relação a localização da propriedade e raça, sexo, idade e uso dos animais.

Comparação das técnicas de iELISAgG e Soroneutralização na Pesquisa de Anticorpos Séricos para o EHV

As reações de iELISA gG e Soroneutralização na pesquisa de anticorpos séricos para o EHV foram comparadas pela sua concordância, co-positividade e co-negatividade (THRUSFIELD, 1990).

4 RESULTADOS

Foram estudados os soros de 512 equídeos, vacinados e não vacinados, assintomáticos, de acordo com o listado no quadro 3.

Os resultados gerais obtidos na avaliação sorológica estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados Gerais

SN	**ELISA**		
	EHV-1	EHV-4	EHV-1 + EHV-4
40,03% (205/512)	0,59% (3/512)	67,77% (347/512)	21,09% (108/512)

Os resultados obtidos da avaliação sorológica, separando os animais por status vacinal, estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de acordo com o status vacinal

Status Vacinal	**SN**	**ELISA**		
		EHV-1	**EHV-4**	**EHV-1 +EHV-4**
Vacinados	48,75% (78/160)	0,63% (1/160)	70% (112/160)	23,13% (37/160)
Não vacinados	36,07%(127/352)	1,14% (4/352)	67,33% (237/352)	19,6% (69/352)

Os resultados obtidos na avaliação sorológica, agrupados segundo a faixa etária e o sexo, estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de acordo com faixa etária, sexo e status vacinal

Grupo	**Status Vacinal**	**SN**	**ELISA**		
			EHV-1	EHV-4	EHV-1 + EHV-4
Potros Desmamados	V	10,52% (2/19)	0(0/19)	89,47% (17/19)	0(0/19)
	NV	5%(1/20)	0(0/20)	50%(10/20)	10%(2/20)
Potros Lactentes	V	20%(4/20)	0(0/20)	65% (13/20)	0(0/20)
	NV	28,57% (4/14)	7,14% (1/14)	71,43% (10/14)	14,28% (2/14)
Potro de Sobreano	V	80,95% (17/21)	4,76% (1/21)	76,19% (16/21)	14,28% (3/21)
	NV	0(0/9)	0(0/9)	66,67%(6/9)	22,22% (2/9)
Égua Adulta	V	53,33% (32/60)	0(0/60)	66,67% (40/60)	33,33% (20/60)
	NV	46,23% (43/93)	0 (0/93)	76,34% (71/93)	23,65% (22/93)
Cavalo Adulto	V	73,07% (19/26)	0(0/26)	53,85% (14/26)	42,3% (11/26)
	NV	32,71% (35/107)	0 (0/107)	73,83% (79/107)	24,29% (26/107)
Cavalo Jovem	V	28,57% (4/14)	0(0/14)	78,57% (11/14)	21,42% (3/14)
	NV	34,38% (10/29)	0(0/29)	65,52% (19/29)	31,03% (9/29)
Muares	NV	24% (6/25)	4%(1/25)	64% (16/25)	24% (6/25)
Asininos	NV	50,9% (28/55)	1,82% (1/55)	45,45% (25/55)	1,82% (1/55)

Os resultados provenientes da avaliação sorológica, de acordo com a cidade e o status vacinal, estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados de acordo com a localização geográfica e status vacinal

Mesorregião	Cidade	Status Vacinal	SN	ELISA		
				EHV-1	EHV-4	EHV-1 + EHV-4
Araçatuba	Lavínia	NV	25,92% (14/54)	0 (0/54)	68,52% (37/54)	31,48% (17/54)
Bauru	Agudos	NV	28% (7/25)	0 (0/25)	60% (15/25)	32% (8/25)
Campinas	Águas de Lindóia	NV	40% (10/25)	0 (0/25)	56% (14/25)	44% (11/25)
	Amparo	V	21,42% (9/42)	0 (0/42)	71,43% (30/42)	14,28% (6/42)
	Campinas	V	90% (18/20)	0 (0/20)	50% (10/20)	50% (10/20)
	Pirassununga	NV	46,76% (27/59)	1,69% (1/59)	52,54% (31/59)	6,78% (4/59)
Itapetininga	Apiaí	NV	0 (0/22)	0 (0/22)	81,82% (18/22)	18,18% (4/22)
	Capão Bonito	NV	35,59% (21/59)	0 (0/59)	81,36% (48/59)	15,25% (9/59)
	Cesário Lange	NV	38,46% (5/13)	0 (0/13)	84,62% (11/13)	15,38% (2/13)
	Iporanga	NV	32% (8/25)	4% (1/25)	64% (16/25)	20% (5/25)
Litoral Sul	Barra do Turvo	NV	22,22% (6/27)	7,41% (2/27)	70,37% (19/27)	14,81% (4/27)
	Eldorado	NV	50% (3/6)	0 (0/6)	83,33% (5/6)	16,66% (1/6)
	Miracatú	NV	100% (1/1)	0 (0/1)	100% (1/1)	0 (0/1)
	Pariquera-Açu	NV	62,5% (5/8)	0 (0/8)	87,5% (7/8)	12,5% (1/8)
	Pedro de Toledo	NV	25% (1/4)	0 (0/4)	50% (2/4)	50% (2/4)
	Sete Barras	NV	50% (4/10)	0 (0/10)	60% (6/10)	10% (1/10)
Macro Metropolitana Paulista	Ibiúna	V	20% (1/5)	0 (0/5)	100% (5/5)	0 (0/5)
	Itu	V	32% (8/25)	0 (0/25)	84% (21/25)	16% (4/25)
Metropolitana de São Paulo	Cotia	V	81,25% (13/16)	0 (0/16)	75% (12/16)	25% (4/16)
	Mairiporã	NV	75% (6/8)	0 (0/8)	12,5% (1/8)	87,5% (7/8)
Ribeirão Preto	Colina	NV	51,61% (16/31)	0 (0/31)	64,52% (20/31)	3,22% (1/31)
	Orlândia	V	81,48% (22/27)	3,7% (1/27)	70,37% (19/27)	18,51% (5/27)

Os resultados comparativos entre os testes estão dispostos a seguir. Na tabela 5, observa-se a comparação entre os resultados obtidos na soroneutralização com aqueles obtidos no iELISA gG para o EHV-1.

Tabela 5 - Comparação entre SN e ELISA para EHV-1

		SN		Total
		+	-	
EHV-1	+	0,59% (3/512)	0,39% (2/512)	0,98% (5/512)
	-	39,45% (202/512)	59,57% (305/512)	99,02% (507/512)
Total		40,04% (205/512)	59,96% (307/512)	512

Na tabela 6, observa-se a comparação entre os resultados obtidos na soroneutralização com aqueles obtidos no iELISA gG para o EHV-4.

Tabela 6- Comparação entre SN e ELISA para EHV-4

		SN		Total
		+	-	
EHV-4	+	26,76% (137/512)	41,41% (212/512)	68,16% (349/512)
	-	13,28% (68/512)	18,55% (95/512)	31,84% (163/512)
Total		40,04% (205/512)	59,96% (307/512)	512

Na tabela 7, observa-se a comparação entre os resultados obtidos na soroneutralização com aqueles obtidos no iELISA gG para os dois tipos de EHV.

Tabela 7- Comparação entre SN e ELISA para EHV-1 e EHV-4

		SN		Total
		+	-	
EHV-1 + EHV-4	+	9,96% (51/512)	10,74% (55/512)	20,7% (106/512)
	-	30,08% (154/512)	49,22% (252/512)	79,30% (406/512)
Total		40,04% (205/512)	59,96% (307/512)	512

Comparando-se a SN com o ELISA para o EHV-1, obteve-se ao teste de concordância κ=0,01, ou seja, concordância ruim.

Ao comparar a SN com o ELISA para o EHV-4, obteve-se ao teste de concordância κ=-0,02, ou seja, não houve concordância.

Quando se compara a SN com o ELISA para os dois vírus simultaneamente, obteve-se ao teste de concordância κ=0,08, ou seja, concordância ruim.

5 DISCUSSÃO

Em relação à pesquisa de anticorpos contra o EHV, o presente estudo é o pioneiro na tipificação de anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4 pelo iELISAgG na população de eqüídeos do Estado de São Paulo. Levantamentos sorológicos realizados anteriormente limitaram-se as técnicas de soroneutralização viral e de fixação de complemento, incapazes de diferenciar os anticorpos contra esses dois agentes devido a reações cruzadas antigênicas entre eles (CRABB; STUDDERT, 1990).

De todos os animais, 40,03% (205/512) foram positivos através do teste de Soroneutralização. Destes, 36,07% (127/352) dos não vacinados e 48,74% (78/160) dos vacinados. A presença de anticorpos na população não vacinada indica a circulação do vírus. Ainda assim, proporcionalmente, a ocorrência de anticorpos na população de vacinados é maior. É importante ressaltar que este estudo não pretende inferir sobre a prevalência de anticorpos no Estado de São Paulo, uma vez que a amostra utilizada foi obtida para outro estudo realizado no mesmo laboratório, gerando um banco de conveniência de número expressivo (512 animais), com amostras provenientes de várias regiões.

Do total de animais pesquisados, 68,16% (349/512) foram sororreatores exclusivamente para o EHV-4, fato que sugere a disseminação deste agente na população analisada, corroborando assim com os resultados epidemiológicos de estudos realizados em outras localidades, como no Estado do Pará, onde foram encontrados 95,7% positivos para o EHV-4 (DIAS, 2000), na Colômbia, onde, em duas regiões, 98,7% e 96,6% dos animais foram positivos para o EHV-4 (RUÍZ SÁENZ et al., 2007, 2008), na Turquia, onde 81,7% dos 290 animais foram positivos para o EHV-4 (ATASEVEN et al., 2009) e na Austrália, onde mais de 99% dos animais testados foram positivos para o EHV-4 (GILKERSON et al., 1999).Dos não vacinados, 67,32% (237/352) foram positivos para o EHV-4,enquanto 70% (112/160) dos vacinados foram positivos para o mesmo vírus.Por outro lado, os resultados do iELISA gG mostraram 0,59% (5/512) do total de eqüídeos sororreatores exclusivamente para o EHV-1, sendo que 4 destes animais não eram vacinados. Esta proporção surpreende ao revelar a baixa circulação do EHV-1 na população equídea do Estado de São Paulo. Estes dados

diferem do descrito por outros autores em diferentes regiões geográficas, como no Pará, onde 18,3% dos animais foram sororreatores para o EHV-1 (DIAS, 2000), na Colômbia, onde 18,8% e 33,3% dos animais de duas regiões foram sororreatores para o EHV-1 (RUÍZ SÁENZ et al., 2008), na Austrália, onde 26,2% das éguas e 11,4% dos potros foram sororreatores para o EHV-1 (GILKERSON et al., 1999), e na Turquia, onde foram encontrados 14,5% dos cavalos, 37,2% dos muares e 24,2% dos asininos como soropositivos para o EHV-1 (ATASEVEN et al., 2009).De acordo com Dias (2000), esta diferença entre as ocorrências de anticorpos contra os dois tipos virais pode ter explicação nas formas de transmissão de cada um. O EHV-1 é transmitido principalmente pela ingestão ou inalação do vírus proveniente de fetos abortados, membranas e descargas uterinas. O EHV-4, por sua vez, é transmitido principalmente por descargas nasais, oculares e por aerossóis do trato respiratório, atingindo assim rapidamente grande número de animais susceptíveis. Nota-se a semelhança entre as proporções de soropositivos para os dois tipos virais para os grupos de animais vacinados e não vacinados, fato este que levanta a hipótese de os anticorpos provenientes da infecção natural sejam mais duradouros do que aqueles formados pela ação da vacina, a qual é produzida com vírus mortos.

Tanto na prova de ELISA quanto na SN, a maior proporção de soropositivos para o EHV-1 e para o EHV-4 foi observada na categoria de animais adultos, sobretudo entre as fêmeas, grupo este em que 66,67% (40/60) dos vacinados e 76,34% (71/93) dos não vacinados foi soropositivo para o EHV-4. Verificou-se também que entre os potros lactentes, 65% (13/20) dos vacinados e 71,42% (10/14) dos não vacinados apresentavam anticorpos contra o EHV-4 enquanto nenhum dos vacinados e 7,14% (1/14) dos não vacinados apresentavam anticorpos contra o EHV-1. Apesar dos potros em lactação serem susceptíveis à infecção por tais agentes, estes resultados também podem ser decorrentes da presença de resíduos de anticorpos maternais provenientes do colostro (FOOTE et al., 2004), podendo ser mais um indicador da circulação destes vírus entre as fêmeas adultas. Segundo os autores, a detecção dos EHV-1 e EHV-4 por PCR de swab nasal de potros lactentes é um indício mais seguro de infecção nesta fase.

É interessante observar que no grupo de potros de sobreano nenhum animal não vacinado foi positivo à SN enquanto 80,95% (17/21) dos vacinados foram positivos neste teste. O teste iELISAgG revelou que 4,76% (1/21) dos animais vacinados foram positivos

para o EHV-1 e que nenhum dos animais não vacinados foi positivo para este vírus. Para o EHV-4, 76,19% (16/21) dos vacinados e 66,67% (6/9) dos não vacinados foram positivos no teste iELISAgG. Sobre estas proporções, pouco pode ser inferido uma vez que o número de animais em cada grupo não é expressivo.

No teste de soroneutralização, entre os muares e asininos (animais não vacinados), 24% (6/25) e 50,9% (28/55), respectivamente, foram sororreatores. Ao analisar os resultados do iELISA gG nos grupos de muares e asininos, constatou-se que 4% (1/25) dos muares e 1,82% (1/55) dos asininos foram positivos para o EHV-1, enquanto 64% (16/25) dos muares e 45,45% (25/55) dos asininos foram positivos para o EHV-4. É importante ressaltar que o teste de iELISA gG foi padronizado para detecção de anticorpos de equinos (conjugado marcado com peroxidaseanti-IgG equina) e neste estudo o teste foi empregado em muares e asininos, podendo este fato interferir com os resultados obtidos. Outro fato que deve ser destacado é a similaridade entre o EHV-8 e o AHV-3, vírus este que pode ser detectado como EHV-1 no iELISAgG, uma vez que EHV-8 e EHV-1 não possuem diferença na região da glicoproteína G empregada como antígeno no teste.

Tanto no total quanto nas diferentes categorias, observou-se maior número de soropositivos pela prova de SN quando comparada à técnica de iELISA gG para o EHV-1. Em todos os grupos foi detectada a ocorrência simultânea de anticorpos contra o EHV-1 e o EHV-4.

Admitindo-se que as vacinas disponíveis no mercado brasileiro possuem antígenos dos herpesvírus tipos 1 e 4, não é possível inferir sobre a infecção por EHV-4 nos animais vacinados. A população de animais vacinados utilizada no estudo foi incluída somente para aprimorar a comparação entre as técnicas de soroneutralização e iELISA gG, uma vez que nesta população a inferência sobre a infecção viral fica prejudicada.

A falta de correlação entre os testes de soroneutralização e de iELISAgG poderia ser explicada pelo fato da primeira prova detectar anticorpos neutralizantes dirigidos para diferentes glicoproteínas do EHV, ao passo que a segunda prova detecta anticorpos contra uma região específica da glicoproteína G do EHV, diferente entre o EHV-1 e o EHV-4.

No presente estudo, ao detectar anticorpos específicos contra os diferentes tipos do EHV, ficou evidente a baixa ocorrência de anticorpos contra o EHV-1 em todas as categorias animais estudadas. Estes dados sugerem que os levantamentos sorológicos anteriormente realizados no Brasil, os quais empregaram como antígeno o EHV-1 em provas de soroneutralização e fixação do complemento (técnicas que não possibilitam diferenciar anticorpos contra o EHV-1 daqueles contra o EHV-4), devem ser analisados com cautela.

A presença de anticorpos na população de jumentos chama a atenção para a presença de mais uma fonte de transmissão do vírus nas populações, uma vez que em muitas propriedades existe o manejo conjunto destas duas espécies, além do interesse comercial na formação de híbridos – os quais também apresentaram anticorpos contra o EHV nos dois testes e para os dois tipos.

A presença de anticorpos contra o EHVna população de asininos e muares, demonstrada tanto na soroneutralização quanto no iELISAgG em nosso meio é inédita e desperta a atenção para que outros estudos sejam realizados para avaliar a circulação de herpesvírus nesses animais, procurando esclarecer qual herpesvírus estaria envolvido.

6 CONCLUSÕES

- O presente estudo sugere que tanto o herpesvírus equino do tipo 1 quanto o do tipo 4 circulam na população equina do Estado de São Paulo, uma vez que foram encontrados anticorpos contra ambos os vírus em animais não vacinados de todas as mesorregiões estudadas.
- A frequência acentuadamente maior de anticorpos contra o EHV-4 em relação aos contra o EHV-1, sugere uma maior circulação de EHV-4 na população equídea do Estado de São Paulo, fazendo com que levantamentos sorológicos anteriormente realizados no Brasil empregando como antígeno o EHV-1 sejam cuidadosamente interpretados.
- A comparação dos resultados obtidos com as duas técnicas empregadas, soroneutralização e iELISA, mostrou baixa concordância no teste kappa.

REFERÊNCIAS

ABCAM.Indirect ELISA protocolsummary. [200-?]. Disponível em: <**http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=12065**>.Acessoem: 21 jul. 2011.

ABODEELY, R.A.; LAWSON, L.A.; RANDALL, C.C. Morphology and entry of enveloped and deenveloped equine abortion (herpes)vírus. **Journal of Virology**, n. 5, p. 513-527, 1970.

ALLEN, G. P. The equine virology research foundation – a view from abroad.**Equine Veterinary Journal**, n. 26, v. 4, p. 259-262, 1997.

ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Studies of an established equine cell line derived from a transitional cell carcinoma. **American Journal of Veterinary Research**, n. 35, p. 1153-1160, 1974.

ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Cell-free synthesis of equine herpesvirus type 3 nucleocapsid polypeptides.**Virology**, n. 69, p. 751-762, 1976.

ALLEN, G.P.; BRYANS, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infectious. In: PANDEY, R. **Progress in veterinary microbiology and immunology**: veterinary microbiology. Basel: D. Karger, 1986. p. 78-144.

ALLEN, G.P.; TURTINEN,L.W. Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus-1.**Journal of Virology**, n. 44, p. 249-255, 1982.

BEN-PORAT, T.; DEMARCHI, J.M.; KAPLAN, A.S. Characterization of defective interfering viral particles present in a population of pseudorabiesvirions.**Virology**, n. 60, p. 29-37, 1974.

BEN-PORAT, T.; RIXON, F.J.; BLANKENSHIP, M. Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus.**Virology**, n. 95, p. 285-294, 1979.

BEN-PORAT, T.; VEACH, R.A.; IHARA, S. Localization of the regions of homology between the genomes of Herpes Simplex Virus Type 1 and Pseudorabies Virus.**Virology**, n. 127, p. 194-204, 1983.

BORGEN, H.C. Differentiation of equine herpesvirus type 1 strains by a plaque marker. Arch. Ges. **Virusforsch**,v., n. 32, p. 283-285, 1970.

BORGEN, H.C. Equine herpesvirus type 1: The L-characteristics in two of forty three field isolates. Arch. Ges. **Virusforsch**,n. 36, p. 391-393, 1972.

BORGEN, H.C.; LUDWIG, H. Equine herpesvirus 1: Biological and biophysical comparison of two viruses from different clinical entities. **Intervirology**, n. 4, p. 189-198, 1974.

BRONSON, D.L.; DREESMAN, G.R.; BISWAL, N.; BENYESH-MELNICK, M. Defective virions of herpes simplex viruses. **Intervirology**,n. 1, p. 141-153.

BROWNING, G.F.; FICORILLI, N.; STUDDERT, M.J. Asinine herpesvirus genomes: comparison with those of the equine herpesviruus. **Archives of Virology**, v. 101, n. 3-4, p. 183-190, 1988.

BROWNING, G. F.; AGIUS, C. T. Equine herpesvirus 2 and 5 (equine gammaherpesviruses) and Asinine herpesvirus 2 infections.In: SUDDERT, M. J. (Ed.), **Virus infections of equines**. Parkville:Elsevier Science Pub Co, 1996. p. 47-60.(Virus Infections of Vertebrates Series).

BUCHMAN, T.G.; ROIZMAN, B.; ADAMS, G.; STOVER, B.H. Restriction endonuclease fingerprinting of herpes simplex DNA: a novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. **Journal of Infectious Diseases**, n. 138, p. 488-498.

BURROWS, R.; GOODRIDGE, D.In vivo and in vitro studies on equine rhinopneumonitis strains.3rd International Conference of Equine Infectious Diseases, Paris, 17-21.7.1972.

BURROWS, R.; GOODRIDGE, D.In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis strains.**Equine Infectious Diseases**, n. 3, p. 306-321, 1973.

CAMBELL, D.E.; KEMP, M.C.; PERDUE, M.L.; RANDALL, C.C.; GENTRY, G.A. Equine herpesvirus in vivo: Cyclic production of a DNA density variant with repetitive sequences. **Virology**, n. 69, p. 737-750, 1976.

CAMPBELL, T. M.; STUDDERT, M. J. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1).Veterinary Bulletin, v. 53, n. 2, p. 135-146, 1983.

COSTA, E. A.; LIMA, G. B. L.; CASTRO, R. T.; FURTINI, R.; PORTILHO, R. V.; RESENDE, M. Meningoencephalitis in a horse associated with equine herpesvirus 1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 60, n. 6, 2008.

CRABB, B. S.; MACPHERSON, C. M.; REUBEL, G. H.; BROWNING, G. F.; STUDDERT, M. J.; DRUMMER, H. E. A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 1 and 4. **Archives of Virology**, v. 140, p. 245-258, 1995.

CRABB, B.S.; STUDDERT, M.J. Epitopes of glycoprotein G of equine herpesvirus 4 and 1 located near the C-termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. **Journal of Virology**, n. 67, p. 6332-6338, 1993.

CRANDELL, R. A.; DRYSDALE, S.; STEIN, T. L.A comparative study of bovine herpesvirus 1247 and equine herpesvirus 1 in ponies.**CanadianJournalofComparative Medicine**, v. 43, n. 1, p. 94-97, 1979.

CUNHA, E.M.S.; DE FERRARI, C.I.; LARA, M.C.C.S.H.; SILVA, L.H.Q. Presença de anticorpos contra o herpesvírus equino 1 (HVE-1) em equinos do noroeste do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 1, p. 1-5, 2002

CUNHA, E.M.S.; VILLALOBOS, E.M.C.; NASSAR, A.F.C.; LARA, M.C.C.S.H.; PERES, N.F.; PALAZZO, J.P.C.; SILVA, A.; DE STEFANO, E.; PINO, F.A. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em eqüídeos no sul do Estado de São Paulo. **Arquivos do InstitutoBiológico**, v.76, n. 2, p. 165-171, 2009.

DARLINGTON, R.W.; JAMES, C. Biological and morphological aspects of the growth of equine abortion virus. **Journal of Bacteriology**,n. 92, p. 250-257, 1966.

DARLINGTON, R. W.; RANDALL, C. C.The nucleic acid content of equine abortion virus, **Virology**, v. 19, p. 322-327, 1963.

DIAS, H. L. T. **Soroepidemiologia de cinco enfermidades infecciosas em equinos criados no Estado do Pará**. 2000. 147 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2000.

DIEL, D.G.; ALMEIDA, S.R.; WEIBLEN, R.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; KREUTZ, L.C.; GROFF, F.H.S.; FLORES, E.F. Prevalência de anticorpos contra o vírus da influenza, da arterite viral eqüina e herpesvírus em equinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, 2006.

DIMOCK, W.W. The diagnosis of virus abortion in mares.**Journalof the American Veterinary Medical Association**, v. 96, p. 665-666, 1940.

DIMOCK, W.W.; EDWARDS, P.R. Infections of fetuses and foals, Kentucky Acric. **Experimental Station Bulletin,** Supplement 333, 1932.

DIMOCK, W.W.; EDWARDS, P.R. Is there a filterable virus of abortion in mares? **Kentucky AgricultureExperimental Station Bulletin,** Supplement333, 1933.

DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R.The differential diagnosis of equine abortion with special reference to a hitherto undescribed form of epizootic abortion of mares.**The Cornell Veterinarian**, v. 26, n. 3, p. 231-240, 1936.

DOLL, E.R.; BRYANS, J.T.; MCCOLLUM, W.H.; CROWE, M.E.W. Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares: Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. **Cornell veterinary,** n. 57, p. 3-41, 1957.

DUMAS, A.M.; GEELEN, J.L.M.C.; WESTSTRATE, M.W.; WERTHEIN, P.; VAN DER NOORDA, J. Xba I, Pst I and Bgl II restriction endonuclease maps of the two orientations of the varicella-zoster virus genome. **Journal of Virology**,n. 39, p. 390-400, 1981.

EDINGTON, N.; BRIDGES, C. G.; HUCKLE, A. Experimental reactivation of equidherpesvirus 1 (EHV-1) following the administration of corticosteroids. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. 5, p. 369-372, 1985.

EQUID BLOG. Equine Herpesvirus 1 Isn't Just For Horses. <http://www.equidblog.com/2011/05/articles/another-category/equine-herpesvirus/equine-herpesvirus-1-isnt-just-for-horses/>. Acesso em: 20 jul. 2011.

FERNANDES, W.R. **Determinação da infecção por herpesvírus equino tipo 1 em animais criados no Estado de São Paulo, através da reação de fixação do complemento**. 1988. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

FOOTE, C. E.; LOVE, D. N.; GILKERSON, J. R.; WHALLEY, J. M. Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in unweanedthoroughbread foals from vaccinated mares on a large stud farm. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 4, p. 341-345, 2004.

Fort Dodge Saúde Animal. http://www.fortdodge.com.br/divisoes/equinos/equinos_exibicao_bula.php?Produto=38&TipoProduto=7, página acessada em 21/07/2011.

FLECKENSTEIN, B.; BORNKAMM, G.S.; LUDWIG, H. Repetitive sequences in complete and defective genomes of herpesvirussaimiri. **Journal of Virology**,n. 15, p. 398-406, 1975.

FRENKEL, N.; JACOB, R.J.; HONESS, R.W.; HAYWARD, G.S.; LOCKER, H.; ROIZMAN, B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. III. Characterization of defective DNA molecules and biological properties of virus populations containing them. **Journal of Virology**, n. 16, p. 153-167, 1975.

FUKUSHI, H.; TOMITA, T.; TANIGUCHI, A.; OCHIAI, Y.; KIRISAWA, R. MATSUMURA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. **Virology**, v. 227, n. 1, p. 34-44, 1997.

GILKERSON, J. R.; JORM, L. R.; LOVE, D. N.; LAWRENCE, G. L.; WHALLEY,, J. M. Epidemiologic investigation of equidherpesvirus 4 (EHV-4) excretion assessed by nasal swabs taken from thoroughbred foals. **Veterinary Microbiology**, v. 39, p. 275-283, 1994.

GILKERSON, J. R.; WHALLEY, J. M.; DRUMMER, H. E.; STUDDERT, M. J.; LOVE, D. N. Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. **Veterinary Microbiology**, v. 68, p. 27-34, 1999.

GIRARD, A.; GREIG, A.S.; MITCHELL, D. Equine virus abortion in Canada II.Isolation of viruses and detection of antibodies in tissue culture. **Cornell Veterinary**, n. 53, p. 88-98, 1963.

HARTLEY, W.J.; DIXON, R.J. An outbreak of foal perinatal mortality due to equidherpesvirus type 1: pathological observations. **Equine Veterinary Journal**, v. 11, p. 215-218, 1979.

HAYWARD, G.S.; JACOB, R.J.; WADSWORTH, S.C.; ROIZMAN, B. Anatomy of herpes simplex virus DNA: Evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, n. 72, p. 4243-4247, 1975.

HEINEMANN, M. B.; CORTEZ, A.; SOUZA, M. C. C.; GOTTI, T.; FERREIRA, F.; HOMEM, V. S. F.; FERREIRA NETO, J. S.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; CUNHA, E. M. S.; RICHTZENHAIN, L. J. Soroprevalência da anemia infecciosa eqüina, da arterite viral dos equinos e do aborto viral equino no município de Uruará, PA, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 50-53, 2002.

HENRY, B.E.; ROBINSON, R.A.; DAUENHAUER, S.A.; ATHERTON, S.S.; HAYWARD, G.S.; O'CALLAGHAN, D.J. Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. **Virology**, n. 115, p. 97-114, 1981.

HENSEL, L.; DONATH, C. ErstmaligeIsolierung des PferdeabortvirusausabortiertenFeten in Wes-Deutschland.**DeutcshTierärztl. Wschr,**n. 71, p. 421-424, 1964.

HONESS, R.W.; WATSON, D.H. Unity and diversity in the herpesviruses. **Jounal of General Virology**, n. 37, p. 15-38, 1977.

HUANG, A.S. Defective interfering viruses.**Annual Reviewof Microbiology,** v. 27, p. 101-117, 1973.

ISHIZAKI, R.; SHIMIZU, T. Sequential development of antigens of equine rhinopneumonitis virus in infected hamster liver cells as studied with fluorescent antibodies. **Natural Animal Health Qt. Tokyo**,v. 4, p. 194-204, 1964.

ISHIZAKI, R.; SHIMIZU, T.; MATUMOTO, M. Sequential development of antigens of equine rhinopneumonitis virus in cultures horse kidney cells as studied with fluorescent antibodies. **Arch Gesamte Virusforsch,** v. 12, p. 346-362, 1962.

KOCH, H. VergleichendeUntersuchungüber das Verhalten des Rhinopneumonitis Virus des Pferdes in verschiedenen **Zellkulturen Zentralbl Veterinarmed,** v. 14, p. 493-506, 1967.

KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; QUEIROOZ, L. H.; CUNHA, E. M. S.; SOUZA, M. C. A. M.; MACRUZ, R.; FREITAS, C. A. Diagnóstico laboratorial do aborto equino a vírus através de

imunofluorescência e soroneutralização. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 128-132, 1989a.

KOTAIT, I.; TOLEDO, C. Z. P.; CUNHA, E. M. S.; SANTOS, O. L.; QUEIROZ, L. H.; PEIXOTO, Z. M. P. Pesquisa de anticorpos anti EHV-1 ("equineherpesvirustype1") em equinos da região de Ribeirão Preto (SP). In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE VIROLOGIA: VIROLÓGICA 89, 1., 1989, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Virologia, 1989b. Resumo 054.

LARA, M. C. C. S. H.; BARROS FILHO, I.; VIANA, F.; GREGORY, L.; CUNHA, E. M. S.; CASTRO, A. F.; BIRGEL, E. H.; FERNANDES, W. R. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da arterite dos equinos (VAE) e herpes equino tipo 1 (HVE-1) em cavalos criados em Curitiba, PR. **A Hora Veterinária**, v. 23, n. 135, p. 26-28, 2003a.

LARA, M.C.C.S.H.; CUNHA, E.M.S.; NASSAR, A.F.C.; GREGORY, L.; BIRGEL, E.H.; FERNANDES, W.R. Ocorrência do EHV-1 em cavalos criados no Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 254-259, 2003b.

LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; ASANO, K. M.; FERNANDES, W. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E.; MORI, E. First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil.**Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 221-224, 2008.

LAWRENCE, W.C. Nucleic acid and protein synthesis I nKB cells infected with equine abortion virus (equine herpesvirus type 1). **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, p. 41-49, 1971.

LUDWIG, H.; BISWAL, N.; BENYESH-MELNICK, M. Studies on the relatedness of herpes-viruses through DNA-DNA hybridization. **Virology**, v. 49, p. 95-101, 1972.

LUDWIG, H.; BISWAL, N.; BRYANS, J.T.; MCCOMBS, R.M.Some properties of the DNA from a new equine herpesvirus.**Virology**, v. 45, p. 534-537, 1971.

MAYFIELD, J.E.; GOOD, O.J.; VANORT, H.J.; CAMPELL, A.R.; REED, D.E. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). **Journal of Virology**, v. 47, p. 259-264, 1983.

MCKERCHER, D.G. Viruses of other vertebrates. In: KAPLAN, A.S. (Ed.).**The Herpesviruses**. New York: Academic Press, 1973. p. 427-493

MODOLO, J. R.; PETZOLDT, K.; GOTTS-CHALK, A. F.; MARGATHO, L. F. F.; FORLIN, W.; CARREIRA, E. L. C. Investigação sorológica do *Herpesvirus equi-1* em equinos pelo teste de fixação do complemento, considerações sobre seu uso na saúde do haras. **A HoraVeterinária**, v. 8, n. 48, p. 25-27, 1989.

O'CALLAGHAN, D.J.; RANDALL, C.C. Molecular anatomy of herpesviruses: recent studies. **Progress in Medical Virology**.v. 22, p. 152-210, 1976.

O'CALLAGHAN, D.J.; RANDALL, C.C.; GENTRY, G.A. Herpesvirus replication in vivo. **Virology**, v.49, p. 784-793, 1972.

O'CALLAGHAN, D.J.; GENTRY, G.A.; RANDALL, C.C.The equine Herpesviruses. In: ROIZMAN, B. (Ed.).**The herpesviruses.** New York, London: Plenum Press, 1983. v. 2, p. 215-318.

O'CALLAGHAN, D.J.; ALLEN, G.P.; RANDALL, C.C. Structure and replication of equine herpesviruses. In: BRYANS, J.T., GERBER, H. (Ed.).Equine infectious diseases. New Jersey: Vet. Publications, Princeton, 1978. v. 4, p. 1-32.

PASCOE, R.R.; SPRADBROW, P.B.; BAGUST, T.J. An equine genital infection resembling coital exanthema associated with a virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 45, p. 166-170, 1969.

PATEL, J. R.; EDINGTON, N.The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1.**Veterinary Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-305, 1983.

PERDUE, M.L.; COHEN, J.C.; KEMP, M.C.; RANDALL, C.C.; O'CALLAGHAN, D.J. Characterization of the three species of nucleocapsids of equine herpesvirus type 1 (EHV-1). **Virology**, v. 64, p. 187-204.

PERDUE, M.L.; COHEN, J.C.; RANDALL, C.C.; O'CALLAGHAN, D.J. Biochemical studies of the maturation of herpesvirusnucleocapsid species. **Virology**, v.74, p. 194-208, 1976.

PETZOLDT, K. Equines coital-exanthem.**Berliner und Münchener Tierarztliche Wochenschrift,** v. 83, p. 93-95, 1970.

PLUMMER, G.; WATERSON, A.P. Equine herpesviruses. **Virology**,v. 19, p. 412-416, 1963.

PLUMMER, G.; BOWLING, C.P.; GOODHEART, C.R. Comparison of four horse herpesviruses. **Journal of Virology**, v. 4, p. 738-741, 1969.

PLUMMER, G.; GOODHEART, C.R.; STUDDERT, M.J. Equine herpesviruses: antigenic relationships and deoxyribonucleic acid densities. **Infection and Immunity,** v. 8, p. 621-627, 1973.

RANDALL, C.C.; BRACKEN, E.C. Studies on hepatitis in hamsters infected with equine abortion virus. I. Sequential development of inclusions and the growth cycle. **American Journal of Pathology**, v. 33, p. 709-727, 1957.

RANDALL, C.C.; LAWSON, L.A. Adaptation of equine abortion virus to Earle's L cells in serum free medium with plaque formation.**Society for Experimental Biology and Medicine,**v. 110, p. 487-489, 1962.

RANDALL, C.C.; RYDEN, F.W.; DOLL, E.R.; SHCELL, F.S. Cultivation of equine abortion virus in fetal horse tissue in vitro. **American Journal of Pathology**, v. 29, p. 139-153, 1953.

RANDALL, C.C., TURNER, D.; DOLL, E.R.The cultivation of equine abortion virus in car tissue in vitro.**American Journal of Pathology**, v. 30, p. 1049-1055, 1954.

ROIZMAN, B. The family herpesviridae.General description, taxonomy and classification. In: ROIZMAN, B. (Ed.).**The Herpesviruses**. New York: Plenum Press, 1982. v. 1, p. 1-23.

ROIZMAN, B.; DESROISIERS, R.S.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, p. 425-449, 1992.

ROIZMAN, B.; FURLONG, D.The replication of herpesviruses. In: FRAENKEL-CONRAT H.; WAGNER, R.R. (Ed.). Comprehensive Virology, New York: Plenum Press, 1974. v. 3, p. 229-403.

RUBINSTEIN, A.S.; KAPLAN, A.S. Electron microscope studies of the DNA of defective and standard pseudorabiesvirions. **Virology**, v. 66, p. 385-392. 1975.

RUYECHAN, W.T.; DAUENHAUER, S.A.; O'CALLAGHAN, D.J. Electron microscopic study of equine herpesvirus type 1 DNA. **Journal of Virology**, v. 42, p. 297-300, 1982.

SABINE, M.; ROBERTSON, G. R.; WHALLEY, J. M. Differentiation of subtypes of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 148-149, 1981.

SAXEGAARD, F. Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from causes of abortion and paralysis. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 18, p. 504-512, 1966.

SHIMIZU, T.; ISHIZAKI, R.; KONO, K.Y.; ISHI, S.; MATUMOTO, M. Propagation of equine abortion virus in horse kidney tissue culture. **Japan Journal of Experimental Medicine** v. 27, p. 175-180, 1957.

SHIMIZU, T.; ISHIZAKI, S.; ISHI, S.; KAWAKAMI, Y.; KAJI, T.; SUGIMURA, K.; MATUMOTO, M. Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell culture. **Japan Journal of Experimental Medicine,** v. 29, p. 643-649, 1959.

SKARE, J.; SUMMERS, S.W. Structure and function of herpesvirus genomes. II. EcoRI, Xbai and Hindill endonuclease cleavage sites on herpes simplex virus type 1 DNA. **Virology**, v. 76, p. 581-595, 1977.

SLATER, J. Equine herpesviruses. In: SELLON, D. C.; LONG, M. T. Equine infectious diseases. Canada: Saunders; Elsevier, 2007. p. 134-153.

SMITH, P.C. The bovine herpesviruses: An overview. In: Proceedings of the 80 annual Meeting of the US Animal Health Association, 1976,**Anais...** 1976. p. 149-158

SOEHNER, R.L.; GENTRY, G.A.; RANDALL, C.C.Some physiochemical characteristics of EHV nucleic acid. **Virology**, v. 26, p. 394-405, 1965.

SPEAR, P.G.; ROIZMAN, B. Herpes simplex viruses. In: TOOZE, J. (Ed.). Molecular biology of tumor viruses, part 2, DNA tumor viruses, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980. p. 615-745.

STEVELY, W.S. Inverted repetition in the chromosome of pseudorabies virus.**Journal of Virology**, v. 22, p. 232-234, 1977.

STRAUS, S.E.; OWENS, J.; RUYECHAN, W.T.; TAKIFF, H.E.; CASEY, T.A.; VAN DE WOUDE, G.F.; HAY, J. Molecular cloning and physical mapping of varicell-zoster virus DNA. **Proceedings of the Natural Academy of Science of the USA**, n. 79, p. 993-997, 1982.

STUDDERT, M.J. Comparative aspects of equine herpesvirus. **Cornell Veterinary**, v. 64, p. 94-122, 1974.

STUDDERT, M.J. Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1. **Archives of Virology**, v. 77, p. 249-258, 1983.

STUDDERT, M.J.; BLACKNEY, M.H. Equine herpesviruses: on differentiation of respiratory from foetal strains of type 1. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, p. 488-492, 1979.

STUDDERT, M.J.; SIMPSON, T.; ROIZMAN, B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases.**Science**, v. 214, n. 4520, p. 562-564, 1981.

TELFORD, E.A.; WATSON, M.S.; PERRY, J.; CULLINANE, A.A.; DAVISON, A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-4.**Journal of General Virology**, v. 79, n. 5, p. 1197-1203, 1998.

TEXAS DEPARTMENT OF STATE HEALTH SERVICES.The Complement Fixation Test. Laboratory Services Section.2010. Disponível em: <http://www.dshs.state.tx.us/LAB/serology_cf.shtm>. Acessoem: 21jul.2011.

THEIN, P. Infection of the central nervous system of horses with equine herpesvirus serotype 1. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v. 52, p. 239-241, 1981.

TURTINEN, L.W.; ALLEN, G.P.; DARLINGTON, R.W.; BRYANS, J.T. Serological and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. American **Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 2099-2104, 1981.

Vencofarma Proteção à Saúde Animal. Herpes horse: vacina contra Rinopneumonite Equina (vírus 1 e 4). 2008. **Disponível em: <http://www.vencofarma.com.br/bra/produtos_det.php?cod=75>. Acesso em:21jul. 2011.**

VASCONCELLOS, L. A. S**. Correlação entre abortamento equino e os níveis de anticorpos séricos para Leptospirainterrogans, Leptospirabiflexa e herpesvírus equino tipo 1**. 1992. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

WHALLEY, J.M.; ROBERTSON, G.R.; DAVISON, A.J. Analysis of the genome of equine herpesvirus type 1: arrangement of cleavage sites for restriction endonucleases EcoR1, BglII and BamHI. **Journal of generalVirology**, v. 57, p. 307-323, 1981.

WHARTON, J.H.; HENRY, B.E.; O'CALLAGHAN, D.J. Equine cytomegalovirus: cultural characteristics and properties of viral DNA. **Virology**, v. 109, p. 106-119, 1981.

WOYCHIECHOWSKA, S. Sensibilité in vitro de différents types de cellules à l'infection par le virus de l'avortementinfectieux des juments (Dimock**). Annals Pasteur Paris**, v. 102, p. 353-355, 1962.

YASUNAGA, S.; MAEDA, K.; MATSUMURA, T.; KAI, K.; IWATA, H.; INOUE, T. Diagnosis and sero-epizootiology of equine herpesvirus type 1 and type 4 infections in Japan using a type-specific ELISA. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 10, p. 1133-1137, 1998.

YASUNAGA, S.; MAEDA, K.; MATSUMURA, T.; KONDO, T.; KAI, K. Application of a type-specific enzyme-linked immunosorbent assay for equine herpesvirus types 1 and 4 (EHV-1 and -4) to horse populations inoculated with inactivated EHV-1 vaccine. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 7, p. 687-691, 2000.