

Luís Miguel Machado Dionísio

**Vacinação e Diagnóstico Laboratorial de Influenza
Equina em Portugal e em Estados Europeus**

Orientadora: Professora Doutora Ana Faustino

Coorientador: Professor Doutor Manuel Pequito

Coorientador: Major Francisco Medeiros

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Luís Miguel Machado Dionísio

Vacinação e Diagnóstico Laboratorial de Influenza Equina em Portugal e em Estados Europeus

Dissertação defendida para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 23 de julho de 2020, com o despacho reitoral nº 194/2020, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Sofia van Harten (por delegação da diretora do curso Professora Doutora Laurentina Pedroso)

Arguente: Professor Doutor Mário Cotovio

Orientadora: Professora Doutora Ana Faustino

Coorientador: Professor Doutor Manuel Pequito

Coorientador: Major Francisco Medeiros

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

DEDICATÓRIA

The world changes from year to year, our lives from day to day, but the love and memory of you, shall never pass away. – Autor desconhecido

Para a avó Maria e o avô Manel

AGRADECIMENTOS

Com o término deste trabalho, termina também mais um capítulo da minha vida. Tenho muito a agradecer a todos os que ajudaram a que este percurso se concretizasse.

À ULHT-FMV, professores, funcionários e colegas por toda a aprendizagem e conhecimento que me transmitiram ao longo destes anos, possibilitando a minha formação e desenvolvimento pessoal.

Ao Colégio Militar, professores, funcionários, amigos e família colegial, por todos os ensinamentos, vivências e amizade.

Aos meus amigos por me terem sempre apoiado e estado presentes quando era preciso. Com especial agradecimento César Temtem, Gonçalo Martins, Hugo Martins, António Eliseu, Manel Louro, Cláudia Beirão, Susana Lopes, Madalena Barbosa, Margarida Vieira, Inês Vieira, João Nuno, Nuno Nunes, Sara Fonseca, Cátia Velez, Patrícia Morais, Diogo Baptista, Nuno Martins, Francisco Silva e Francisco Franco

À minha orientadora Professora Doutora Ana Faustino, um agradecimento especial, por todo o seu tempo, conhecimento, apoio e paciência, na realização deste trabalho. Agradeço também aos coorientadores Professor Doutor Manuel Pequito e Major Francisco Medeiros pela atenção, conhecimento e ajuda.

À Professora Doutora Laurentina Pedroso por toda a disponibilidade e esforços realizados junto da DGAV para a obtenção de dados para a tese.

Ao Dr. João Pedro Duarte Silva da DGAV, departamento de medicamentos, pela rápida resposta e ajuda no tratamento de dados e pela sua disponibilidade.

Ao Dr. Nuno Alegria pela ajuda no esclarecimento de questões relacionadas com as vacinas contra a Influenza Equina.

Ao Dr. João Crespo, presidente da AMVPE, pela ajuda na divulgação do inquérito pelos membros da associação e pelo esclarecimento de dúvidas sobre os dados recolhidos.

Ao Dr. João Luís Lago, Farmacêutico e Virologista do Hospital das Forças Armadas por ter aceitado esclarecer dúvidas sobre virologia.

À Dra. Margarida Henriques do INIAV pelo seu tempo e partilha de informações.

À Dra. Paula Caceres-Soto da OIE pela partilha das informações, disponibilidade e esclarecimentos de dúvidas.

Ao Dr. David Mountford presidente da BEVA, por ter aceitado partilhar o estudo e permitir a utilização dos meios de comunicação da associação inglesa de médicos veterinários de equinos para a divulgação do estudo.

Ao Dr. Dermot Forde, líder veterinário da FEI na Irlanda, que submeteu o questionário ao comité Veterinário Irlandês.

Ao Peter Bishton, Director do quadro da *Veterinary Ireland*, um agradecimento especial pela dedicação demonstrada na partilha do estudo entre os associados da *Veterinary Ireland* através de comunicação por correio eletrónico e da revista online.

Ao Dr. Bosco Cowley, veterinário da Merck na Irlanda, pelo interesse demonstrado no estudo desenvolvido.

À Dra. Jane Nixon, diretora do quadro da BEF, pela atenção, partilha de informação e por ter aceitado reunir.

Ao Dr. Adam Rash do AHT em Newmarket, pelos dados partilhados, ainda sob estudo.

Ao Dr. José Prazeres e Dr. João Borges, pela revisão e apoio na elaboração do questionário.

À Dra. Mónica Mira, pela ajuda na divulgação dos questionários através do grupo de veterinários de equinos.

A toda a minha família, próxima e mais afastada que me apoiou durante um dos momentos marcantes que decorreu durante este trabalho.

À minha irmã Sofia, ao meu primo João, à minha tia Maria José, à minha tia Elsa e avó Delfina um obrigado pelo carinho e por me terem apoiado durante toda a minha vida, todo o meu percurso estudantil.

À minha tia avó por viver na positividade, aumentando a cada dia que passa, agradeço também por todo o muito carinho que continua a demonstrar mesmo que cada dia que passa lhe seja mais difícil lembrar do meu nome.

À minha avó Maria e avô Manel, que partiram em tempos diferentes sem me verem a terminar esta grande etapa, mas que estarão sempre presentes. Agradeço ainda todo o apoio recebido por eles e por todo o carinho.

Ao meu pai, por ver sempre o melhor das pessoas e o lado positivo das coisas, por me apoiar e apoiar a família, um agradecimento especial e à minha mãe, um agradecimento muito especial, por me ter apoiado constantemente neste trabalho, ter me apoiado em dias menos bons, pela partilha de todos os momentos e vivências, pela constante partilha de ensinamentos e pelo esforço familiar. Aos dois por me terem proporcionado a oportunidade de estudar Medicina Veterinária na FMV-ULHT.

RESUMO

A Influenza Equina (IE) é uma doença provocada pelo vírus influenza do género A, com distribuição global e em constante análise pela *World Organization for Animal Health* e pela *World Health Organization*.

A IE é altamente contagiosa e afeta não só o aparelho respiratório superior, mas também o aparelho respiratório inferior. A vacinação em cavalos é um método de prevenção adequado, porém algumas estirpes apresentam capacidade de infetar cavalos imunizados, devido às alterações mutagénicas que o vírus sofre.

Este trabalho teve como objetivo estudar a atuação Médico-Veterinária em relação à IE em Portugal nos anos de 2018 e 2019, e comparar a prática clínica em Portugal com a de outros países europeus.

Em Portugal foi possível identificar uma oportunidade de melhoria da prática clínica dos Médicos Veterinários na utilização dos testes laboratoriais para diagnóstico da doença e na vacinação. Esta atuação pode ser um reflexo do desajuste da legislação nacional aplicável. O decreto-lei que define as doenças de declaração obrigatória não está em concordância com a lista da *World Organization for Animal Health* e por isso a Direção Geral de Alimentação e Veterinária não detém as informações necessárias para fazer a adequada notificação da doença. Esta falha, contraria o código da *World Organization for Animal Health* e a obrigação por parte de Portugal para reportar os dados epidemiológicos nacionais.

A IE necessita de uma maior atenção em Portugal e existe um conjunto de medidas que podem ser adotadas para melhorar a gestão da doença a nível nacional.

Palavras-chave: Influenza Equina, veterinários, diagnóstico, doença, vacinação

ABSTRACT

Equine Influenza (EI) is a disease caused by influenza A viruses, with global spread and continuously analyzed by the World Organization for Animal Health and by the World Health Organization.

EI is highly contagious and compromises not only the upper respiratory tract, but the lower respiratory tract as well. The horses' vaccination is an adequate prevention measure, however some strains have the capacity to infect immunized horses, due to the virus mutations.

The goal of this study was to investigate the Veterinarians' clinical practice in what regards the EI in Portugal in 2018 and 2019, and to compare that clinical practice with the one in other European countries.

It was possible to identify an improvement opportunity of the use of laboratory tests to diagnose the disease and the use of vaccination by Veterinarians in their clinical practice in Portugal. This behavior might be the consequence of the existing gap in the applicable national legislation. The decree-law defining the mandatory communicable diseases is not in compliance with the World Organization for Animal Health list, therefore the Direção Geral de Alimentação e Veterinária does not have the necessary information to properly report the disease. This failure violates the code of the World Organization for Animal Health and the obligation to report national epidemiological data by Portugal.

EI requires a higher level of attention in Portugal and there are several measures that can be implemented to improve the disease management at national level.

Keywords: Equine Influenza, veterinarians, diagnosis, disease, vaccination

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓMINOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C. – antes de Cristo

AHT – Confiança na Saúde Animal, do inglês “Animal Health Trust”

d.C. – depois de Cristo

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

ESP – “Expert Surveillance Panel”

EUA – Estados Unidos da América

Fc1 – Florida clade 1

Fc2 – Florida clade 2

FEI – Federação Equestre Internacional, do francês “Fédération Equestre Internationale”

FEP – Federação Equestre Portuguesa

HA – Hemaglutinina, do inglês “Hemagglutinin”

IE – Influenza Equina

IFN – Proteína Interferão, do inglês “Interferon Protein”

Ig – Imunoglobulina

IHRB – Quadro Regulador de Corridas de Cavalos Irlandês, do inglês “Irish Horseracing Regulatory Board”

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ISCOM – Complexo Imune Estimulante, do inglês “Immune Stimulating Complexes”

M – Matriz, do inglês “Matrix”

NA – Neuraminidase

NEP – Proteína de exportação nuclear, do inglês “Nuclear Export Protein”

NP – Nucleoproteína

NS – Proteína não estrutural, do inglês “Non-structural Protein”

OIE – Organização Mundial de Saúde pelo Animal, do inglês “World Organisation for Animal Health”

PA – Proteína Polimerase Ácida, do inglês “Polymerase Acidic”

PB – Proteína de Polimerase Básica, do inglês “Polymerase Basic Protein”

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

pH – potencial de Hidrogénio, do alemão “Potenz hydrogen”

PrP's – Plasma rico em Plaquetas

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”

RT-PCR – Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction”

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês “World Health Organization”

VIA – Vírus da Influenza Aviária

VIE – Vírus da Influenza Equina

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓMINOS, SIGLAS E SÍMBOLOS	9
ÍNDICE GERAL.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE GRÁFICOS	14
ÍNDICE DE TABELAS	16
CASUÍSTICA DO ESTÁGIO CURRICULAR.....	18
I. INTRODUÇÃO	20
1.1. INFLUENZA.....	20
1.2. INFLUENZA EQUINA	22
1.2.1. ETIOLOGIA.....	23
1.2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	25
1.2.3. PATOGENIA.....	28
1.2.4. DIAGNÓSTICO	32
1.2.4.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	32
1.2.4.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	34
1.2.4.3. DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAS	36
1.2.5. TRATAMENTO	36
1.2.6. PROGNÓSTICO	36
1.2.7. PROFILAXIA.....	38
1.2.8. IMUNIDADE	42
1.2.9. IMPACTO ECONÓMICO E LEGISLAÇÃO	44
1.3. OBJETIVOS.....	45
II. MATERIAIS E MÉTODOS	46
III. RESULTADOS.....	49
3.1. DADOS RECOLHIDOS DE ENTIDADES NACIONAIS E INTERNACIONAIS	49
3.1.1. NÚMERO DE DIAGNÓSTICOS EM PORTUGAL.....	49
3.1.2. NÚMERO DE VACINAS ADMINISTRADAS EM PORTUGAL.....	49
3.1.3. NÚMERO DE CASOS NOS RESTANTES PAÍSES ESTUDADOS.....	50
3.2. ADESAO DOS PAÍSES EUROPEUS AO INQUÉRITO	51

3.3. RESPOSTAS AO INQUÉRITO NOS VÁRIOS ESTADOS MEMBROS	52
3.3.1. QUESTÃO 1.....	51
3.3.2. QUESTÃO 2.....	52
3.3.3. QUESTÃO 3.....	53
3.3.4. QUESTÃO 4.....	55
3.3.5. QUESTÃO 5.....	56
3.3.6. QUESTÃO 6.....	57
3.3.7. QUESTÃO 7.....	58
3.3.8. QUESTÃO 8.....	59
3.3.9. QUESTÃO 9.....	61
IV. DISCUSSÃO.....	62
V. CONCLUSÃO.....	67
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICE I: QUESTIONÁRIO SOBRE INFLUENZA EQUINA	II
APÊNDICE II: DADOS RECOLHIDOS PARA O ESTUDO	II
APÊNDICE III: RELATÓRIO SOBRE A IRLANDA.....	VIII

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de vírus da Influenza e hospedeiros	21
Figura 2. Representação esquemática da estrutura de um vírus Influenza	24
Figura 3. Distribuição mundial da Influenza Equina	26
Figura 4. O vírus da Influenza Equina	30
Figura 5. Ciclo do vírus Influenza	32
Figura 6. Artigo publicado na Irlanda no <i>Veterinary Ireland Journal</i>	47
Figura 7. VetAlert referente ao estudo	48
Figura 8. Representação da participação dos Estados Membros no estudo	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Procedimentos realizados durante o estágio.....	19
Gráfico 2. Número total de vacinas vendidas em Portugal, em 2018 e 2019.	49
Gráfico 3. Número de unidades de cada vacina vendidas em Portugal, em 2018 e 2019....	50
Gráfico 4. Países onde os veterinários participantes exercem a sua atividade clínica.	52
Gráfico 5. Aptidão dos equinos tratados pelos Médicos Veterinários que responderam ao inquérito em Portugal.	53
Gráfico 6. Aptidão dos equinos tratados pelos Médicos Veterinários que responderam ao inquérito na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.	53
Gráfico 7. Casos suspeitos de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019, em Portugal.....	54
Gráfico 8. Casos suspeitos de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019, na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.	54
Gráfico 9. Casos de IE diagnosticados em Portugal com recurso a testes laboratoriais.	55
Gráfico 10. Casos de IE diagnosticados na França, Irlanda, reino Unido e Suécia, com recurso a testes laboratoriais.	55
Gráfico 11. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, em Portugal.	56
Gráfico 12. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.	56
Gráfico 13. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2019, em Portugal.	57
Gráfico 14. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.	58
Gráfico 15. Protocolo vacinal contra a Influenza Equina (IE) adotados pelos Médicos Veterinários em Portugal.	59
Gráfico 16. Protocolo vacinal contra a Influenza Equina (IE) adotados pelos Médicos Veterinários na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.	59
Gráfico 17. Frequência da vacinação contra a Influenza Equina (IE) em Portugal.....	60
Gráfico 18. Frequência da vacinação contra a Influenza Equina (IE) na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.	60

Gráfico 19. Uso de testes laboratoriais para o diagnóstico de Influenza Equina (IE) em Portugal, em 2018 e 2019.	61
Gráfico 20. Uso de testes laboratoriais para o diagnóstico de Influenza Equina (IE) na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia, em 2018 e 2019.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sinais clínicos mais frequentes nos animais infetados com o VIE	321
Tabela 2. Dados sobre os países onde os veterinários participantes praticam a sua atividade clínica.	II
Tabela 3. Dados sobre a caracterização da prática clínica dos veterinários participantes no estudo referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia	II
Tabela 4. Dados sobre a suspeita de casos de Influenza Equina (IE) nos últimos dois anos em França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.....	II
Tabela 5. Dados sobre os casos diagnosticados objetivamente com o auxílio de testes laboratoriais em França, Irlanda, Reino Unido e Suécia	III
Tabela 6. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.....	III
Tabela 7. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2019 referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.....	IV
Tabela 8. Dados sobre o protocolo utilizado para a vacinação contra a Influenza Equina (IE) referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia	IV
Tabela 9. Dados sobre o tipo de protocolo usado para a vacinação referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia	IV
Tabela 10. Dados sobre o uso de testes laboratoriais para o diagnóstico de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019, referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia	IV
Tabela 11. Dados sobre a caracterização da prática clínica dos veterinários portugueses participantes no estudo	V
Tabela 12. Dados sobre a suspeita de casos de Influenza Equina (IE) nos últimos dois anos em Portugal	V
Tabela 13. Dados sobre os casos diagnosticados objetivamente com o auxílio de testes laboratoriais em Portugal.....	V
Tabela 14. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018 em Portugal.	VI
Tabela 15. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2019 em Portugal.	VI
Tabela 16. Dados sobre o protocolo utilizado para a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em Portugal	VI

Tabela 17. Dados sobre o tipo de protocolo vacinal usado pelos Médicos Veterinários portugueses que participaram no estudo	VI
Tabela 18. Dados sobre o uso de testes laboratoriais para diagnóstico de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019 em Portugal	VII

CASUÍSTICA DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu na Clínica Veterinária Militar de Equinos, destacada na Escola de Armas do Exército, em Mafra. O estágio teve a duração de três meses, entre o dia 1 de outubro a 31 de dezembro de 2018, sob orientação do Major Medeiros, do Major Matos, do Major Paixão e do Capitão Couto.

No estágio foram acompanhadas diferentes áreas da Clínica de Equinos, incluindo Medicina Interna, Medicina Reprodutiva, Medicina Desportiva e Cirurgia. O estágio teve como principal objetivo o desenvolvimento das competências do aluno e a realização de procedimentos selecionados de forma autónoma.

Durante o período de estágio foram acompanhados 110 cavalos que se encontravam nas instalações da unidade em Mafra, bem como animais externos à unidade que foram recebidos para observação e tratamento.

Os cavalos observados apresentaram maioritariamente doenças ortopédicas nos membros, no entanto também foram observados animais com doenças oculares (n=20), respiratórias (n=6), digestivas (n=5) e dermatológicas (n=20). No período do estágio tive oportunidade de administrar fármacos por via intravenosa, muscular, oral, subcutânea e intra-articular (n=90). Tive também a possibilidade de recolher amostras de sangue para análise, realizar e interpretar raios-X dos membros em várias projeções (n=70), administrar terapia à base de plasma rico em plaquetas (PrPs) (n=20), diagnosticar claudicações através da realização de diferentes testes e de bloqueios nervosos (n=70), diagnosticar lesões musculares (n=40), acompanhar uma cirurgia intra-articular (n=1), realizar a limpeza de feridas (n=25), desparasitações (n=80), diagnóstico de gestação por ecografia (n=20), monitorizar animais com cólicas (n=2) e acompanhar casos da área de odontologia (n=3). Acompanhei também a podologia de vários cavalos (n=38), em situações de cariz médico ou regular (Gráfico 1).

Para além do acompanhamento regular da atividade clínica, tive a oportunidade de acompanhar a deslocação da equipa médico-veterinária a outra unidade militar para observação dos animais e monitorização de cavalos em provas desportivas e militares durante a Semana Equestre Militar, que contou com a participação de cavalos militares e civis (n=40) (Gráfico 1).

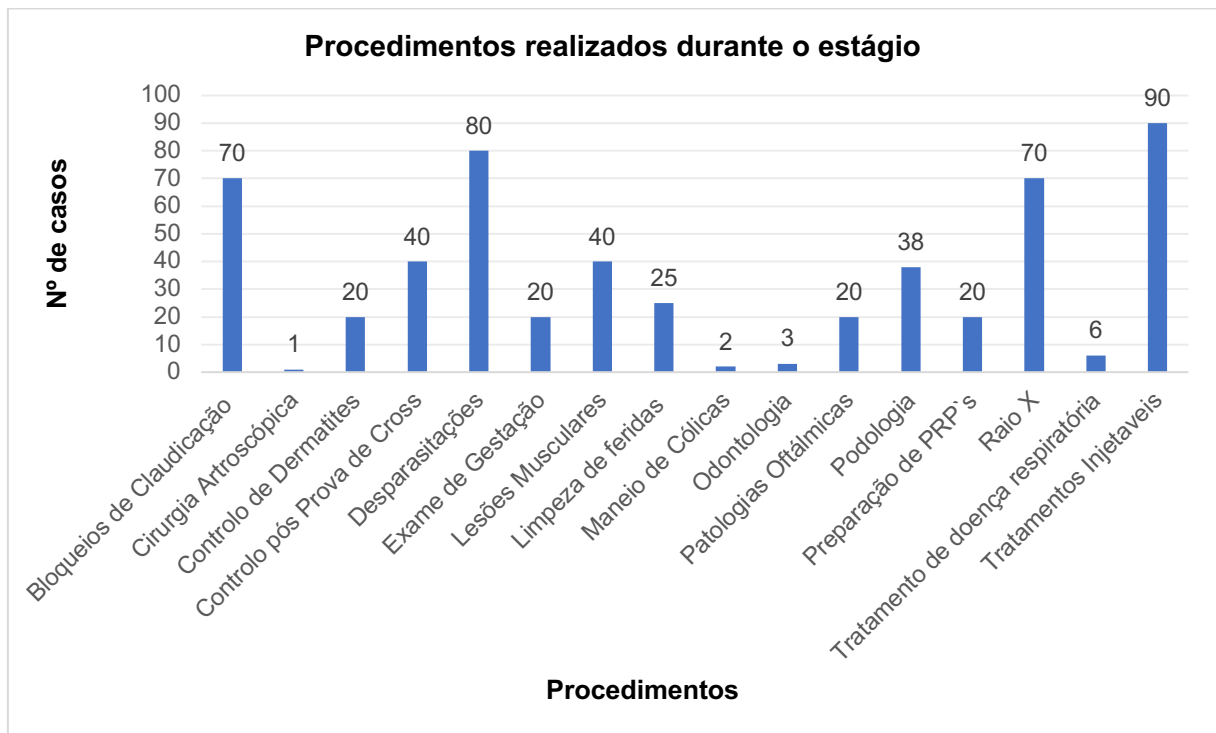


Gráfico 1. Procedimentos realizados durante o estágio

I. INTRODUÇÃO

1.1. Influenza

A Influenza, também designada como gripe, é uma doença respiratória extremamente contagiosa, provocada pelo vírus da influenza (VI). O vírus afeta predominantemente o trato respiratório superior (nariz e garganta), podendo em alguns casos afetar os pulmões. A severidade dos sinais clínicos é variável e incluem febre, tosse, dor de garganta, congestão nasal, dificuldade respiratória, dores musculares, dor de cabeça, fadiga, náusea, vômito, diarreia e falta de apetite (CDC, 2020).

Os VI capazes de infectar o Homem e provocar epidemias e pandemias são os vírus dos géneros *Influenzavirus* A, B e C, da família *Orthomyxoviridae*. Para além destes, foi identificado o *Influenzavirus* D no ano de 2011. Os VI infectam diferentes espécies, a espécie A infecta humanos e animais no geral, como por exemplo equinos, aves, porcos e cães; a espécie B infecta humanos, focas e furões; a espécie C infecta humanos, cães e porcos, e a espécie D foi identificado em cabras, ovelhas, porcos e bovinos (Figura 1). Porém já foram identificados anticorpos em equinos e humanos, pertencente ao VI da espécie D (Jakeman *et al.*, 1994; Youzbashi *et al.*, 1996; Osterhaus *et al.*, 2000; Matsuzaki *et al.*, 2002; Hause *et al.*, 2013; Ferguson *et al.*, 2016; Nedland *et al.*, 2018). Embora a patogenia deste último vírus não esteja completamente estudada, alguns autores defendem que os humanos, tal como os suínos, podem ser infectados por todos os VI (Bailey *et al.*, 2018; CDC, 2019). Os suínos e as galinhas são considerados dois reservatórios chave dos VI (Rajao *et al.*, 2018). No entanto, a classificação de reservatórios naturais pertence principalmente às aves aquáticas e aves marinhas selvagens (Yoon *et al.*, 2014).

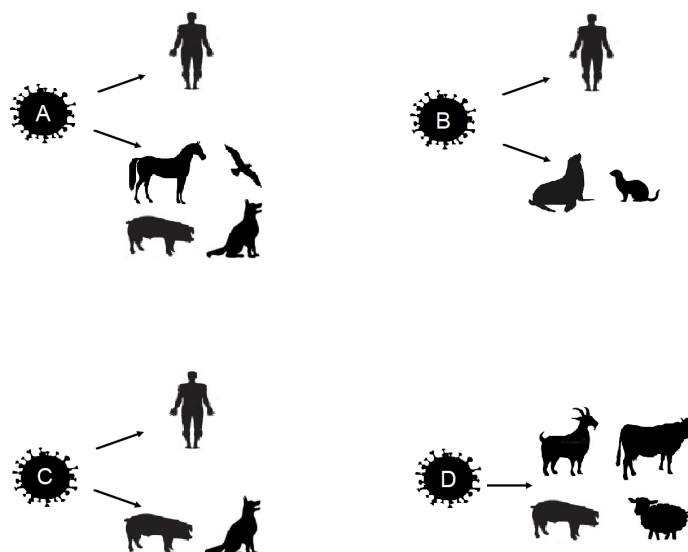


Figura 1. Representação esquemática dos tipos A, B, C e D do vírus Influenza (VI) e as respectivas espécies alvo. O VI A tem como alvo os humanos, os equinos, as aves, os porcos e os cães; o VI B afeta humanos, focas e furões; o VI C tem como alvo humanos, porcos e cães; e o VI D afeta porcos, vacas, cabras e ovelhas.

O VI do género A é considerado o vírus ancestral para todos os VI (Dayle *et al.*, 2011; Chambers, 2014). Sendo o mais frequentemente encontrado em circulação, este é o principal responsável pelo aparecimento de doença, apresenta uma maior predisposição para a ocorrência de mutações e é o género de VI geralmente associado a epidemias e pandemias (Gasparini *et al.*, 2014a; Gasparini *et al.*, 2014b). O VI A sofre alterações através da mutação, recombinação e rearranjo do seu material genético, desafiando constantemente o sistema imunitário do hospedeiro (Webster *et al.*, 1992; Mehle *et al.*, 2012). Este vírus apresenta 13 proteínas, entre estas encontram-se a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), que representam 45% da massa do vírus. Foram identificadas 18 HA e 11 NA, importantes na classificação da estirpe (Aoyama *et al.*, 1991, Hay *et al.*, 2001; Jagger & Digard, 2012; Cullinane & Newton, 2013; Lewis *et al.*, 2014). A doença provocada por este vírus afeta uma percentagem significativa da população mundial, estando descritas epidemias e pandemias de forma cronológica e geográfica desde os tempos antigos, causando um total aproximado de 10 milhões de mortes humanas (Soema *et al.*, 2015).

O primeiro relato de uma doença que se assemelha à Influenza data de 412 a.C., por Hipócrates, no seu “Livro das Epidemias” com o nome de “febre de Perinthus” ou “tosse de Perinthus”. Alguns autores defendem mesmo que esta é a primeira descrição histórica da Influenza (Kohn, 2007; Pappas *et al.*, 2008). Em 1173 e 1500 foram descritos dois surtos de Influenza, no entanto os detalhes destes episódios não são totalmente conhecidos (Kuszewski

& Brydak, 2000). O nome “Influenza” surge apenas no século XV, em Itália, devido a uma epidemia cuja origem foi atribuída à “influência das estrelas”, e o nome propagou-se pela Europa, Ásia e África (Gintrac, 1872).

Alguns autores e historiadores debatem a Influenza no continente americano, isto é, se a doença já se encontrava neste território ou se terá sido introduzida no novo mundo por porcos contaminados. Existem alguns textos de origem Azteca que descrevem um surto de “catarro pestilento” entre 1450 e 1456, na atual zona do México. No entanto, as hipóteses apresentadas parecem controversas e os manuscritos de difícil tradução para uma completa e correta interpretação (de Souza, 2008). Os primeiros documentos fidedignos datam de 1510, descrevendo uma doença muito semelhante à Influenza e um vírus que se propagou na Europa, mas com origem em África. Em 1557 ocorreu a primeira epidemia em larga escala, mas a primeira pandemia data de 1580, sem contradições. Esta pandemia teve origem na Ásia e na Rússia, disseminando-se para a Europa através da Ásia Menor e Noroeste de África, acabando mesmo por afetar o continente americano. As grandes tragédias ocorreram em Itália, onde se registaram mais de 8000 mortes, e em Espanha, onde a doença chegou mesmo a dizimar cidades inteiras (Potter, 2001).

Desde o século XV até meados do século XIX foram registadas 31 epidemias ligadas à Influenza, incluindo oito pandemias. Alguns dos surtos com maior impacto ocorreram em 1729, de 1781 a 1782, de 1830 a 1833, de 1847 a 1848, e de 1898 a 1900. Porém um dos surtos mais devastadores foi a pandemia que ocorreu entre 1918 e 1919, a que se deu o nome de Influenza “Espanhola”, causando a morte de mais de 20 milhões de pessoas. Alguns autores descrevem-na como “o grande holocausto médico da história” (Waring, 1971; Potter, 2001). Foi apenas em 1932/1933 que o vírus foi isolado pela primeira vez, através da recolha de secreções nasais de pacientes infetados (Smith *et al.*, 1933). Posteriormente, foram identificadas quatro pandemias em humanos em 1918, 1957, 1968 e 2009, relacionadas com os VI suína, tais como o H1N1, H2N2, H3N2 e H1N1, respetivamente (Scholtissek *et al.* 1978; Crosby, 2003; Krueger, 2012; Mena *et al.*, 2016) Em 2018, foram reportados mais de 10 subtipos de VI suína a circular nos Estados Unidos da América (Walia *et al.*, 2018).

1.2. Influenza Equina

A Influenza equina (IE) é uma doença altamente infecciosa que afeta o aparelho respiratório dos equinos, com elevado impacto económico (Glass *et al.*, 2002; Arthur & Suan, 2011).

1.2.1. Etiologia

A IE é provocada por dois subtipos do VI A. O vírus da Influenza Equina (VIE), pertence ao género *Influenzavirus A* e à família *Orthomyxoviridae* é considerado o agente patogénico respiratório mais importante em equinos (Timoney, 1996). Este foi identificado pela primeira vez em equinos no ano de 1956, em Praga. No entanto, a sua presença foi sugerida desde 433 d.C. pelo veterinário grego Absyrtus. No ano de 1872 foi descrito um enorme surto que afetou uma parte considerável da população de cavalos na América do Norte, afetando também toda a situação económica e de serviços comerciais prestados. O VIE é considerado um agente altamente contagioso, responsável por surtos de doença respiratória em cavalos em muitos países, com elevadas taxas de transmissão mesmo entre outras espécies (Law, 1874; Sovinova *et al.*, 1958; van Maanen & Cullinane, 2002; Myers & Wilson, 2006).

O genoma do VIE é composto por oito segmentos de RNA em sentido negativo, sendo encapsulados por uma nucleoproteína, que lhes confere assim uma simetria helicoidal. Cada um destes segmentos de RNA codifica até 10 proteínas estruturais e não estruturais. O 7º segmento é responsável pela forma do VIE. Certas estirpes mais virulentas codificam uma 11ª proteína. O diâmetro do vírus varia de 80 a 120 nm (Palese & Schulman, 1976; Ritchey *et al.*, 1976; Timoney, 1996; Burnouf *et al.*, 2004; Elton *et al.*, 2013) (Figura 2).

As proteínas codificadas pelo vírus são: HA, NA, proteína de matriz (M), nucleoproteína (NP), três proteínas polimerases (proteína básica da polimerase 1 (PB1), proteína básica de polimerase 2 (PB2) e proteína ácida da polimerase (PA)), uma proteína de exportação nuclear (NEP) e uma proteína não estrutural (NS1) (Timoney, 1996; Elton & Bryant, 2011).

A NS1 e a PB1-F2 são proteínas com função ativa na replicação viral, mas não se encontram incorporadas na estrutura viral. A PB1-F2 é uma derivação da PB1, sendo uma proteína mais pequena codificada pela fase de leitura aberta observada em algumas estirpes. A NS1 é considerada a proteína mais antagonista da resposta imunológica das células alvo, interferindo com o interferão tipo 1 e reduzindo assim a produção de IFN β . A NS1 é constituída por 230 aminoácidos, no entanto, apresenta diferente tamanho quando comparada com a presente noutras espécies, especialmente com a observada em humanos e suínos. Desempenha também função de ligação do RNA e função efetora (Suarez *et al.*, 1998; Hale *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Boukharta *et al.*, 2015).

A NEP, que era considerada como uma proteína não estrutural sendo designada por NS2, neste momento já foi demonstrada a sua ligação com a proteína M, tendo sido identificada no virião. A sua ação é essencial para que exista libertação de

ribonucleoproteínas virais da célula hospedeira, mais propriamente do núcleo (Paterson & Fodor, 2012).

A glicoproteína HA é responsável pela resposta aos anticorpos do hospedeiro e a glicoproteína NA responsável pela proliferação do vírus, através da migração pela membrana mucosa das células do trato respiratório, que posteriormente, após proliferarem, vão libertar os vírus das células afetadas. Estas glicoproteínas são responsáveis pelos espigões, do inglês “spikes”, que se projetam no exterior do envelope viral (Timoney, 1996; Matrosovich *et al.*, 2004; Elton & Bryant, 2011).

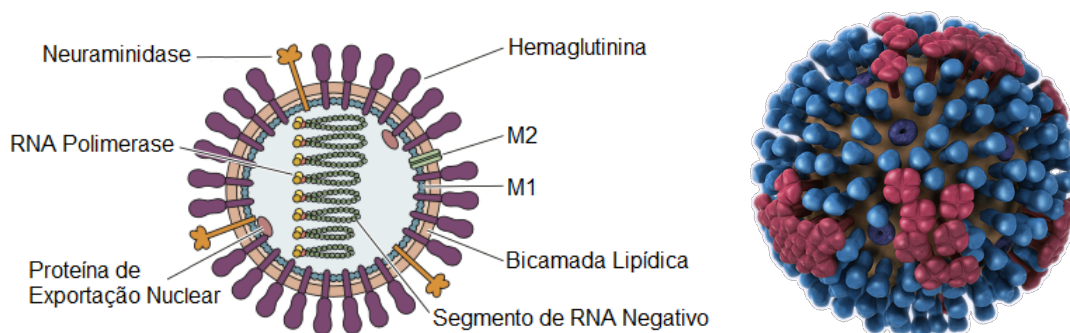


Figura 2. Representação esquemática da estrutura de um vírus Influenza (VI), onde é possível observar proteínas estruturais e não estruturais. Na imagem 3D é possível observar a neuraminidase a vermelho e a hemaglutinina a azul. Adaptado de: CDC, 2020 e Flint *et al.*, 2015.

Os dois subtipos do VI A responsáveis pela IE são H7N7 (subtipo 1) e H3N8 (subtipo 2), sendo que o H7N7 foi o primeiro a ser identificado em cavalos na Europa de Leste. Este subtipo não foi isolado em cavalos desde 1979, sendo considerado extinto (Sovinova *et al.*, 1958; Webster, 1993; Timoney, 1996). A fraca presença ou quase inexistência do subtipo H7N7 resulta das ligações fortes do codão deste vírus (sequência de três bases nitrogenadas de RNA mensageiro que codificam um aminoácido), não sofrendo alterações com base na mutação ou composição nucleotídica (Yarus *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2016).

Em 1963, o H3N8 foi isolado pela primeira vez em cavalos, como sendo inicialmente um VI aviária (VIA), o qual posteriormente divergiu em duas sublinhagens diferentes, por volta do ano de 1980, que foram denominadas como Americana e Euro-asiática (Daly *et al.*, 1996; Damiani *et al.*, 2008; Cullinane *et al.*, 2010; Saenz *et al.*, 2010). Posteriormente, a linhagem Americana divergiu em Florida, Kentucky e Argentina. Entre estas três sublinhagens existe predominância rotativa, variando de ano para ano, ao que se dá o nome de “re-cycling”. Este

processo é contínuo sendo que, ao fim de três anos voltará a repetir a predominância da linhagem que iniciou o ciclo. Acredita-se que este mecanismo permite a sobrevivência do vírus e a sua perpetuação, alterando o alvo imunológico sem evolução (Lai *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2004). Na prática, a linhagem Florida é predominante, pois devido à sequenciação de HA, foi possível identificar duas derivações desta linhagem sendo classificadas como “clade1” e “clade2”. A diferença entre cada tipo encontra-se na sequência de HA (Bryant *et al.*, 2009; Bryant *et al.*, 2011). Existem autores que defendem o desaparecimento das estirpes pré-divergentes e que estas foram ultrapassadas por vírus que evoluíram em outras linhagens e sublinhagens. Por outro lado, existem dados que comprovam a semelhança de estirpes identificadas em 2004 com estirpes que circularam antes de 1990, algumas com 99% de compatibilidade (Martella *et al.*, 2007; Boukharta *et al.*, 2015).

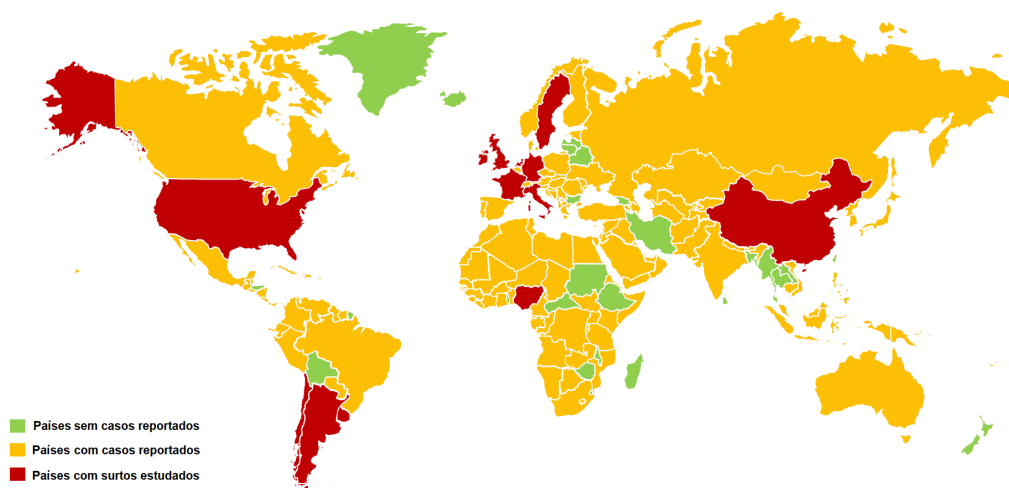
O aparecimento de novas estirpes deve-se à derrapagem de antígeno, do inglês “antigenic drift”, que consiste na acumulação de ponto mutantes no gene que codifica a superfície da proteína HA. Nesta proteína a alteração ocorre mais rápido, no entanto também as outras proteínas estão suscetíveis a este processo. Este processo é um evento marcante no genoma viral, causado por um rearranjo dos genes que pode resultar de uma coinfeção com outra estirpe, podendo mesmo ser secundário a um processo de infecção cruzada. Estas alterações são observáveis a vários níveis de aminoácidos o que leva ao aparecimento das novas estirpes e por vezes à semelhança com estirpes antigas, estas alterações afetam também o comportamento do vírus a vários níveis (Lindstrom *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2011; Rash *et al.*, 2017).

1.2.2. Epidemiologia

Os surtos de IE caracterizam-se por uma visível e rápida propagação da doença, sendo que o pico ocorrerá uma semana após a identificação do primeiro caso e deixarão de ser identificados novos casos após os 21 a 28 dias. A disseminação da IE pelo mundo deve-se, na sua maioria, ao tráfego de equinos, ocorrendo a sua reintrodução em países que já não apresentavam a doença, como foi o caso do Japão (Mumford, 1990; Powell *et al.*, 1995; Morley *et al.*, 2000; Yamanaka *et al.*, 2008a).

Segundos dados da *World Organization for Animal Health* (OIE), foram isolados e caracterizados surtos de VIE (H3N8) em diversos países tais como: Argentina, Alemanha, Chile, China, Estados Unidos, França, Holanda, Irlanda, Nigéria, Suécia, Reino Unido e Uruguai. Em 2019, a mesma organização confirmou a ocorrência de cinco novos surtos em

Itália, tendo sido o último surto registado nesse país, em 1999 (OIE, 2019a; OIE, 2019d). De acordo com a OIE, alguns países nunca reportaram casos de IE, como é o caso do Bangladesh, Bielorrússia, Bolívia, Bulgária, Etiópia, Geórgia, Gronelândia, Guiana Francesa, Honduras, Irão, Islândia, Laos, Letónia, Lituânia, Malawi, Madagáscar, Myanmar, Nova Zelândia, República Centro Africana, Sri Lanka, Suazilândia, Sudão, Togo, Tailândia, Taipé Chinês e Zimbabué (OIE, 2019b) (Figura 3).



No passado foram identificadas epidemias de IE em diversos países da Europa e da América do Norte em períodos diferentes, como são os casos de maior relevo a pandemia de 1956 devido ao subtipo H7N7, e as pandemias de 1963, 1969, 1979 e 1989 devido ao subtipo H3N8 (van Maanen & Cullinane, 2002; Radostits *et al.*, 2003). Estas pandemias têm sido associadas ao aparecimento de um novo vírus, como foi o caso em Miami em 1963, ou de mutações nas estirpes, resultando numa ineficácia vacinal (Radostits *et al.*, 2003). O vírus H7N7 foi também associado a dois surtos no continente asiático, um deles em 1977 na Malásia e o outro em 1987 na Índia (Uppal *et al.*, 1987; Uppal & Yadav, 1987). Os maiores surtos de IE foram registados na China em 1989, onde mais de um milhão de equinos foram afetados pela estirpe A/I/Jilin89, e em 1993/1994, devido à estirpe convencional do vírus H3N8 muito semelhante à estirpe isolada na Europa durante o ano de 1991 (van Maanen & Cullinane, 2002). A linhagem Florida tem sido isolada na Europa desde 2003, onde ocorreu

um surto em grande escala em Newmark, com infecção de cavalos vacinados e não vacinados (Newton *et al.*, 2006).

A maioria dos casos de IE identificados na Europa, desde 2006 a 2008, pertencem à linhagem Florida clade 2 (Fc2), visto que era a linhagem predominante, ocorrendo um grande surto na Suécia em 2007. Por outro lado, a linhagem Florida clade 1 (Fc1) tem sido identificada mais esporadicamente e poucos surtos têm sido associados a esta linhagem (Bryant *et al.*, 2009; Bryant *et al.*, 2011; Gildea *et al.*, 2012; Legrand *et al.*, 2013; Woodward *et al.*, 2014). A linhagem Fc1 é a principal responsável pela ocorrência de surtos nos EUA, enquanto que a Fc2 é mais recente no Norte da América, tendo sido apenas identificada pela primeira vez num cavalo importado da Europa, e por isso a sua presença nos EUA é mais recente (Bryant *et al.*, 2011; Pusterla, *et al.*, 2014). Entre 2007 e 2008, ocorreu um surto de Fc1 no Japão e na Austrália, e no mesmo intervalo, ocorreu um grande surto que afetou a China, a Mongólia e o Cazaquistão. Mais tarde, em 2012, voltou a repetir-se um surto nestes países provocado por estirpes derivadas da Fc2. O número de animais infetados na Austrália foi aproximadamente de 76000 (Bryant *et al.*, 2009; Cullinane & Newton, 2013; Yondon, *et al.*, 2014). Em 2011 foi isolada pela primeira vez a linhagem Fc1 na Suécia e, desde aí, têm surgido apenas casos esporádicos. Entre 2012-2014 todos os casos de IE identificados na Suécia pertenceram à Fc2. O mesmo ocorreu na Irlanda, sendo que o primeiro caso de Fc1 foi identificado em 2010 e desde 2011 apenas se têm identificado casos de Fc2. O surto que ocorreu em 2011 na Suécia demonstrou a presença de ambas as linhagens em simultâneo, no entanto com diferente origem (Gildea *et al.*, 2012; Gildea *et al.*, 2013; Back *et al.*, 2016). Em França ocorreu algo semelhante, em que a estirpe predominante era a Fc2 entre 2005-2010, ocorrendo em 2009 um surto de Fc1 atribuído a uma falha nas vacinas (Legrand *et al.*, 2013). No Reino Unido ocorreu um caso de Fc1 em 2006-2007, e de 2008 a 2009 os surtos foram associados a ambas as linhagens (Bryant *et al.*, 2009; Bryant *et al.*, 2011). Entre 2010 e 2012, apenas foram detetados casos de Fc2 na Alemanha e no Reino Unido (Woodward *et al.*, 2014). A Fc2 é considerada endémica na Europa e na Ásia, com surtos periódicos, enquanto que a Fc1 é endémica nos EUA, causando surtos esporádicos e em diferentes partes do mundo (Back *et al.*, 2016). Atualmente, o vírus circula pelo mundo, mas a América do Sul é considerada como sendo o epicentro da disseminação do vírus H3N8 (Perglione *et al.*, 2016). Estes dados permitiram concluir que a prevalência da doença na Europa estava a mudar da linhagem Euroasiática para a linhagem Florida, tendo sido observado um aumento de casos de Fc1 e Fc2. Os estudos demonstram que a Fc2 está a divergir, e as alterações dos antígenos das estirpes detetadas entre 2013-2015 foram caracterizadas num estudo realizado no Reino Unido (Gildea *et al.*, 2012; Rash *et al.*, 2017). Segundo dados do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), em 2018 e 2019, foram detetados dois

casos de IE em Portugal provocados pelo H3N8. De acordo com o *Animal Health Trust*, em 2019 foram identificados 21 casos de IE na Irlanda, 229 casos no Reino Unido e quatro casos na Suécia (Equineflunet, 2020). A realização de estudos sobre a doença e desenvolvimento de surtos nos países é de extrema importância para controlo do vírus e identificação das estirpes, de forma a que as vacinas se mantenham eficazes. A falta de monitorização pode levar à introdução de novas sublinhagens que não tinham sido identificadas nos países, despoletando uma mutação e levando à ocorrência de um surto por duas sublinhagens. A diminuição ou ausência de controlo na introdução de novos animais no país, pode levar à ocorrência de um surto, numa distância de 400Km, proporcionado pelo transporte de cavalos (Back *et al.*, 2016).

O género do animal não tem qualquer influência na predisposição para a infeção pelo VIE (Nyaga *et al.*, 1980; Gross *et al.*, 2004). Segundo alguns estudos, parece existir alguma predisposição racial para a infeção pelo VIE e o desenvolvimento da doença. Os cavalos Puro Sangue Inglês parecem ser mais resistentes à infeção pelo VIE, quando comparadas com outras raças. Os Quarto de Milha são a raça de equinos com maior risco de infeção pelo VIE (Nyaga *et al.*, 1980; Gildea *et al.*, 2010). Relativamente à idade, todos os grupos etários são suscetíveis ao desenvolvimento da doença. No entanto, o período de maior suscetibilidade acontece entre os dois e os seis meses de idade, devido à perda dos anticorpos adquiridos por via passiva a partir dos dois meses de idade. Alguns estudos consideram os animais até aos cinco anos mais vulneráveis à doença (Nyaga *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 1985; Landolt, 2014). Os cavalos mais velhos são praticamente imunes, devido à exposição natural à doença ou à vacinação (Morley *et al.*, 2000). O histórico vacinal e de exposição à doença também são considerados fatores importantes. Quanto maior a concentração de anticorpos, menor será o risco de desenvolvimento da doença (Bogdan *et al.*, 1993; Morely *et al.*, 2000).

1.2.3. Patogenia

A propagação do VIE é considerada uma das mais rápidas entre as outras doenças respiratórias que afetam os equinos. O VI é relativamente suscetível às condições ambientais, no entanto os cavalos podem ser infetados pela proximidade de outro animal doente através de aerossóis ou pelo contacto direto com equipamentos contaminados (fómites). As gotículas ou “droplet” provenientes de descargas nasais têm um papel importantíssimo na disseminação do VIE, sendo das principais causas de propagação da doença, até porque levam à criação de fómites (Timoney, 1996; Easterday *et al.*, 1997). Os aerossóis podem propagar-se até um raio de distância até 35 m desde o equino infetado, podendo ser maior,

dependendo da frequência da tosse. O tempo de vida do VIE no meio ambiente como aerossol é de 24 a 36h, mas em superfícies pode chegar até aos três dias, enquanto que o VI humana sobrevive apenas 15h, como aerossol. O tempo de incubação é de um a três dias, com um período de três a oito dias de contaminação a outros animais, podendo atingir os 10 dias (Radostits *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2004). A permanência dos animais em estábulos fechados, com pouca ventilação e elevada concentração de animais facilita a disseminação do vírus (Morley *et al.*, 2000). Nos cavalos não vacinados a taxa de infecção é de aproximadamente 100%, os animais parcialmente imunizados ficam infectados subcl clinicamente e tendem a disseminar menos a doença quando comparados com animais não imunizados (Chambers, 2014, Landolt, 2014). Cavalos com sinais clínicos apresentam uma maior taxa de disseminação da doença, quando comparados com animais assintomáticos (Cullinane & Newton, 2013). Após recuperação, o animal não apresenta o vírus e, deste modo, a doença é considerada estéril autolimitante (Cullinane & Newton, 2013).

Geneticamente o VIE e o VIA são muito semelhantes o que pode indicar a coexistência do VI tanto em equinos como em aves. A distinção entre estirpes do VIE pode ser realizada pela análise de um elemento comum visível em todas as estirpes que pertencem à linhagem Americana, que é a presença de I194V, o que não acontece nas estirpes derivadas da linhagem Euroasiática (Cullinane & Newton, 2013; Chambers, 2014; Landolt, 2014). Pode ocorrer a transmissão do vírus entre espécies, nomeadamente entre equinos e carnívoros, como já foi identificado num surto de influenza em cães. As análises laboratoriais identificaram a presença do subtipo H3N8 num surto de IE em cães de corrida (Galgos Ingleses) numa pista nos EUA e no Reino Unido. Verificou-se que a transmissão ocorreu devido à proximidade com os equinos, no entanto não existia transmissão lateral (Radostits *et al.*, 2003; Crawford *et al.*, 2005; Daly *et al.*, 2008; Gibbs & Anderson, 2010; Kirkland *et al.*, 2010; Crispe *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017).

A transmissão do VIE não se confina apenas aos caninos, existindo evidência de transmissão em humanos, camelos e zebras. Presume-se que a presença deste vírus noutras espécies, como o Homem, pode levar ao seu rearranjo com o VI humana, com consequente surgimento de novas estirpes. Quando o vírus infeta o humano pode não ser atenuado, sendo capaz de infectar cavalos saudáveis, com capacidade de infecção semelhante à que existe entre cavalos (Couch *et al.*, 1969; Yondo *et al.*, 2014; Larson *et al.*, 2015; Na *et al.*, 2016). Na China também já foram isolados VIE em dois porcos, estes não apresentavam qualquer sintomatologia, mas serviam como veículo para rearranjo viral e surgimento de uma nova estirpe (Solórzano *et al.*, 2015). Para além dos animais já referidos, foi possível demonstrar que os gatos também podem ser infectados através da transmissão experimental do VIE H3N8 (Tu *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2014) (Figura 4). Não existem dados de infecção de cavalos com o

presença do VIE já foi detetada em zebras, camelos, humanos e cães. O vírus pode infectar o humano e infectar outros cavalos sem perder a sua patogenia. No caso do gato, este pode ser infectado, mas apenas foi demonstrado a nível laboratorial.

O VIE provoca uma infeção no trato respiratório superior e inferior, sendo comum o desenvolvimento de lesões nos pulmões de cavalos adultos. Em poldros, o vírus pode causar uma pneumonia severa, que por vezes é fatal (Britton & Robinson, 2002; Gross *et al.*, 2004; Peek *et al.*, 2004).

Após a sua inalação, o vírus adere às células epiteliais através dos espigões da glicoproteína HA, que acabam por se fundir com a célula pela adesão aos recetores do ácido siálico que se encontram na superfície da célula, permitindo assim a entrada da partícula viral no citoplasma a fim de se replicar. O equino apresenta uma camada de muco na cavidade nasal que pode impedir a ligação de HA do vírus, inibindo assim a entrada do vírus na célula (Scocco & Pedini, 2008). O pH baixo no interior da célula epitelial proporciona condições para que se realize o processo de fusão entre o vírus e a membrana celular. O pH ácido permite a alteração da HA, a abertura do canal de iões, também denominada como M2 e acidificação do núcleo do vírus, levando à entrada do RNA viral no núcleo da célula alvo. A presença de uma elevada concentração do complexo molecular Neu5Gc2-3Gal essencial para a replicação viral, que se encontra presente no epitélio respiratório do cavalo e que a NA também tem grande afinidade, é essencial para a rápida libertação dos viriões resultantes da replicação. Os viriões formados pela replicação viral são libertados pela célula infectada, permitindo a infeção de novas células ou a propagação para o meio ambiente (Suzuki, 2000; Radostits *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2016) (Figura 5).

Esta primeira fase da infeção e replicação viral ocorre maioritariamente na mucosa nasofaríngea. O vírus pode ser detetado em todo o trato respiratório três a sete dias após a infeção. Após a infeção das células epiteliais ciliadas, o cavalo perde a capacidade de eliminar substâncias estranhas que entrem por esta via. Este processo viral induz a morte das células epiteliais da mucosa respiratória, inflamação, edema e perda da barreira mucociliar protetora. A morte celular ocorre como consequência da apoptose induzida pelo VIE das células respiratórias epiteliais e aumento sistémico e local do interferão tipo I (interferão- α e interferão- β) e da interleucina-6 (Suzuki, 2000; Lin *et al.*, 2002; Watrang *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2016). A síntese do interferão é ativada como mecanismo de defesa celular pela presença de RNA viral (Jiao *et al.*, 2008).

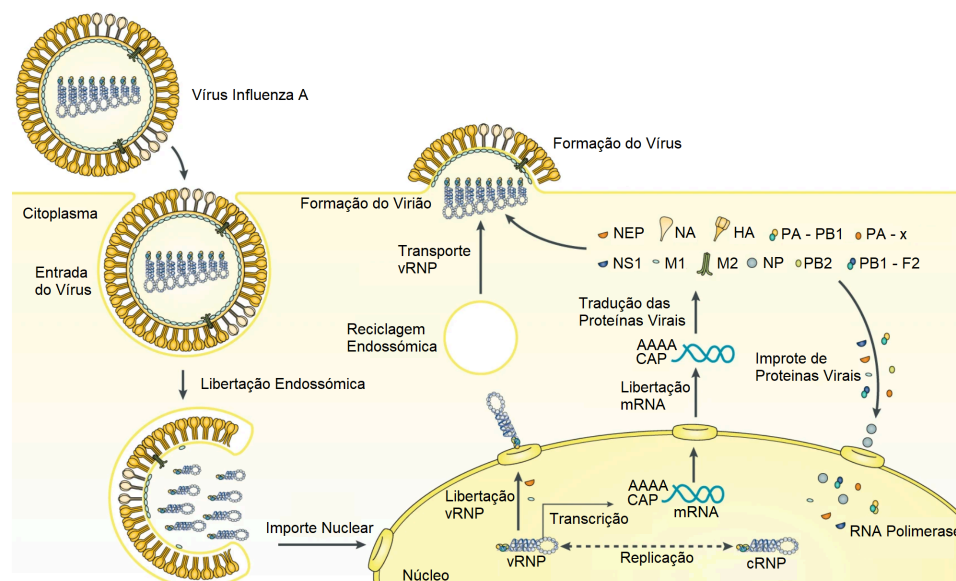


Figura 5. Ciclo do vírus Influenza (VI). Adaptado de: Krammer *et al.* (2018).

A infecção pelo VIE permite o surgimento e proliferação de bactérias oportunistas, entre as quais se destaca *Streptococcus equi var. zooepidemicus*, devido à perda de resposta regular ao controlo das mesmas. Esta infecção secundária por bactérias leva a um aumento de inflamação, que irá também causar uma broncopneumonia, podendo levar a um aumento de mortalidade (Wilson, 1993; Paillot, 2014). O VIE não foi identificado em nenhum tecido para além do trato respiratório. No entanto, quando se trata de uma estirpe resultante de uma transmissão interespecie, como foi o caso A/equine/Jilin/1/89, podem surgir sinais clínicos atípicos, tendo sido identificado o vírus em cavalos com enterites (Webster & Yuanji, 1991; Wilson, 1993; van Maanen & Cullinane, 2002).

1.2.4. Diagnóstico

1.2.4.1. Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico baseia-se nos sinais clínicos apresentados pelos animais infetados, podendo ser confirmado através de testes complementares de diagnóstico (Timoney, 1996). O diagnóstico através de meios complementares de diagnóstico por imagem, como a ultrassonografia, ainda não é frequentemente usado. A utilização da ultrassonografia para o diagnóstico de IE carece de mais estudos, enquanto a radiografia é de difícil utilização em cavalos adultos (Gross *et al.*, 2004). Entre os sinais clínicos mais

comuns destacam-se corrimento nasal mucopurulento, tosse seca, febre, depressão e inapetência. A presença destes sinais e a sua intensidade podem variar de acordo com a idade do animal e a suscetibilidade individual à doença (Timoney, 1996; Gross *et al.*, 1998; Morley *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2004; Cullinane & Newton, 2013). A ocorrência de aborto em éguas gestantes não é frequente (Radostits *et al.*, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1. Sinais clínicos mais frequentes nos animais infetados com o vírus da Influenza Equina (VIE). Adaptado de: Morley *et al.* (2000) e Radostits *et al.* (2003).

Sinais clínicos	Ocorrência
Corrimento Nasal Mucopurulento	70% - 90%
Febre	20% - 50%
Inapetência	20% - 30%
Sinais de Depressão	20% - 40%
Tosse	60%

Quando o VIE infeta animais vacinados ou anteriormente expostos ao vírus, a doença é considerada leve, porque os cavalos já se encontram imunizados e deste modo pode ser clinicamente indistinguível de uma doença respiratória superior associada a outros agentes, tais como Herpes Vírus Equino-4, Vírus da Rinite Equina e Vírus da Artrite.

Os sinais clínicos presentes num cavalo infetado com o VIE que não esteve em contacto prévio com o agente viral são: pirexia com valores compreendidos entre os 38,5°C e 41°C, que surge após o período de incubação de 24 a 72 h; depressão em alguns animais; recusa de alimento ou anorexia; relutância ao movimento; tosse seca e áspera, que é um dos sinais clínicos dominantes e surge logo após o aumento da temperatura, com duração de uma a três semanas, sendo de fácil estimulação através da compressão manual da porção cranial da traqueia; dor à palpação dos linfonodos submaxilares, em particular nos animais mais jovens; e descarga nasal mucosa. A auscultação pulmonar pode apresentar sons alterados, como aumento da intensidade da respiração, crepitações e sibilos. Estas alterações à auscultação podem estar presentes num cavalo com pneumonia bacteriana secundária (Timoney, 1996; Gross *et al.*, 1998; Morley *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2004; Cullinane & Newton, 2013)

Em poldros, a doença apresenta uma forma mais grave, com febre, dificuldade respiratória severa e pneumonia intersticial aguda (Oxburgh & Klingeborn, 1999; Britton & Robinson, 2002).

Cavalos que desenvolvam uma infecção secundária, normalmente por *Streptococcus zooepidemicus*, apresentam descargas nasais mucopurulentas, febre persistente e sons anormais mais marcados na auscultação pulmonar. Casos mais raros podem apresentar icterícia, sinais de encefalite, descoordenação e mioglobulinúria (Wilson, 1993).

1.2.4.2. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da IE no campo pode ser feito com recurso a testes rápidos de deteção de antígeno, que são também usados na deteção da Influenza humana. Esta necessidade de rápida identificação da IE prende-se com a urgência de instauração de medidas de controlo à sua propagação. Testes como o Directigen Flu A estão homologados e foram validados para a deteção do antígeno em equinos. Outros testes já foram testados, mas a sua sensibilidade e especificidade são consideradas baixas, quando comparadas com a transcrição reversa de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Chambers *et al.*, 1994; Yamanaka *et al.*, 2008b; Yamanaka *et al.*, 2016a). O PCR isotérmico isolado (iiPCR) foi desenvolvido para a deteção de HA3 do VIE, podendo ser realizado em 1 h, com recurso a um aparelho portátil, com elevada sensibilidade e especificidade (Balasuriya *et al.*, 2014; Galvin *et al.*, 2014; Brister *et al.*, 2019).

Os testes rápidos para o diagnóstico de infecção pelo VIE não devem ser considerados substitutos dos testes laboratoriais, pois a realização destes últimos leva à identificação do vírus, o que permite caracterizar o surto, realizar estudos vacinais, epidemiológicos e garante, com toda a certeza, que o animal está infetado com o VIE (Radostits *et al.*, 2003). O exame laboratorial mais usado para diagnóstico da doença e isolamento do vírus é o PCR em tempo real. A amostra analisada é recolhida por zaragatoa nasofaríngea ou pela recolha de amostras de sangue (soro) (Chambers *et al.*, 1994; Oxburg & Hagstrom, 1999; Back *et al.*, 2016; Gora *et al.*, 2017; OIE, 2019c). Esta técnica foi usada em amostras recolhidas por zaragatoa nasal na Mongólia. Os “primers” usados são específicos para uma região específica do vírus, permitindo obter resultados rápidos e com grande sensibilidade, mesmo quando a excreção do vírus era fraca. Os “primers” não são exclusivos, isto é, podem detetar estirpes ainda não estudadas (Alvarez *et al.*, 2008; Yondon *et al.*, 2013; Aeschbacher *et al.*, 2015). A deteção da presença de RNA de cadeia dupla é sinal de infecção viral (Jiao *et al.*, 2008).

Com o avanço da tecnologia e baseado no conceito “One Health” desenvolveram-se kits de diagnóstico, como por exemplo o FluChip-8G da InDevR Inc., que permitem caracterizar e identificar os subtipos de Influenza A ou B em menos de 10 horas (Borkenhagen

et al., 2019). Existem testes em constante desenvolvimento, como é o caso da imunocromatografia de fluxo lateral utilizando prata coloidal, como revelador da interação antígeno-anticorpo, que apresentam elevada sensibilidade e permitem uma detecção antecipada do vírus, e a pirosequenciação, que permite a diferenciação da estirpe em casos de surto (Yamanaka *et al.*, 2017; Bernardino *et al.*, 2016).

A medição da concentração de anticorpos contra a HA viral é importante para confirmar a exposição ao vírus, aferir a vulnerabilidade do animal à infecção e a eficácia de uma determinada vacina. O teste preferencial para esta medição é o teste da hemólise radial simples, quando comparado com o teste de inibição da hemaglutinação. O teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) também pode ser usado como teste de diagnóstico para avaliar a seroconversão. Este detecta os anticorpos contra as nucleoproteínas, permitindo uma identificação de animais vacinados e de animais infectados, devido aos anticorpos que contêm a proteína HA resultante da vacinação não serem detectados neste teste (Daly *et al.*, 2004; Gildea *et al.*, 2010; Gildea *et al.*, 2011; Kirkland & Delbridge, 2011; Galvin *et al.*, 2013; Chambers & Reedy, 2014b; OIE, 2019c). A identificação de anticorpos contra proteínas não estruturais do vírus em cavalos, permite afirmar que o animal sofreu uma infecção natural do vírus. Estes anticorpos não são identificados quando os animais são imunizados com vacina com vírus inativado (Ozaki *et al.*, 2001).

No caso de auscultação pulmonar suspeita de pneumonia, deve proceder-se à lavagem traqueal. Os animais com bronquite ou pneumonia apresentam um elevado número de granulócitos, especialmente neutrófilos nesta secreção (Gross *et al.*, 1998). A nível histológico podem ser observadas lesões de necrose nos brônquios e alvéolos, infiltração de neutrófilos, formação de membranas hialinas, metaplasia escamosa e hiperplasia do epitélio das vias aéreas (Patterson-Kane *et al.*, 2008).

A recolha de material para análise laboratorial deve ser feita com cuidado, pois a qualidade da amostra pode comprometer a fiabilidade dos resultados. Como a densidade do vírus é maior na nasofaringe do que nas fossas nasais, a recolha com zaragatoa deve ser preferencialmente efetuada ao nível da nasofaringe. É importante que o transporte das amostras seja realizado em condições de conservação apropriadas, isto é, sob refrigeração, e caso o transporte até ao laboratório seja superior a dois dias, devem ser mantidas a uma temperatura igual ou inferior a -60°C (Chambers & Reedy, 2014a; Gora *et al.*, 2017).

1.2.4.3. Diagnósticos diferenciais

Como diagnóstico diferencial para a IE devem ser consideradas as seguintes doenças: Pasteurelose, Pleuropneumonia e Adenite infecciosa equina, infecção por Rinovírus e Adenovírus Equino, Arterite viral equina, Rinopenumonia equina ou Herpesvírus equino, Hendra vírus ou Morbilivirus equino (FAO, 2019; Radostits *et al.*, 2003; Rush & Mair, 2004).

1.2.5. Tratamento

O tratamento de um cavalo com IE baseia-se no manejo da doença e repouso do animal. Apesar da Amantadina ter sido testada para o tratamento da IE, ainda não está descrita a existência de um antiviral específico disponível no mercado para tratamento desta doença. A utilização de inibidores de NA está indicada numa fase inicial, pois reduz a propagação do vírus e limita a sua transmissão a outros animais (Radostits *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2015). O tempo de repouso indicado deve ser equivalente ao número de dias que o cavalo apresentou piroxia, para que possa recuperar o epitélio respiratório. Para além dos cuidados habituais com a água, a alimentação e o local de estabulação do cavalo, é necessário ter particular atenção para que o local de repouso do animal tenha uma boa ventilação, a cama deve ser de materiais que não causem pó e a comida deve ser de boa qualidade sem pó. Posteriormente ao repouso, pode ser introduzido trabalho de forma gradual. O não cumprimento do período de repouso ou a introdução repentina de trabalhos de esforço elevado pode levar ao desenvolvimento de uma doença pulmonar crónica obstrutiva e miocardite (Chambers *et al.*, 1995).

Nos cavalos com sinais de infeção secundária é recomendada a realização de antibioterapia com antibióticos de largo espectro, tais como: sulfonamidas potenciadas (ex: Equibactin vet[®]), Ceftiofur (ex: Cftiomax[®]), Penicilina G Procaína (ex: Combiótico suspensão injetável para bovinos, ovinos, suínos e equinos[®]), com ou sem Gentamicina. A penicilina também poderá ser usada nos animais com infeção secundária (Ensink *et al.*, 1996; Ensink *et al.*, 2003). Apesar da sua eficácia não ser totalmente conhecida, podem ser administrados mucolíticos aos animais com IE. A administração de corticosteroides e utilização de antitússicos é contraindicada, enquanto que a utilização de anti-inflamatórios não esteroides deve ser ponderada, devido aos seus efeitos secundários e à possibilidade de mascarar complicações (Kastner *et al.*, 1999). A utilização de antipiréticos com ação anti-inflamatória não esteroide não está contra indicada, podendo ser usados os seguintes fármacos: fenilbutazona, flunixin meglumina ou dipirona (Wilson, 1993).

1.2.6. Prognóstico

O prognóstico de um cavalo com IE depende muito do estado vacinal do animal, da estirpe do vírus responsável pela infecção, da idade do animal e do tratamento implementado. Em poldros é reportada uma forma mais severa da doença, que normalmente é fatal quando surge pneumonia intersticial aguda (Britton & Robinson, 2002)

De um modo geral, a taxa de mortalidade é baixa, sendo considerada abaixo de 1%. No entanto, devido à quebra da imunidade, após a infecção viral pode ocorrer uma infecção bacteriana e normalmente esta infecção secundária é responsável pela mortalidade. Em 1989, a epidemia originária de uma estirpe aviária na China, apresentou uma elevada taxa de morbidade (80%) e de mortalidade (20 a 35%), devido a complicações como pneumonias e enterites. Considera-se também que o prognóstico é reservado quando a estirpe viral responsável pela infecção é resultado de uma infecção cruzada (Webster & Yuanji, 1991; Oxburgh & Klingeborn, 1999; Britton & Robinson, 2002).

A maioria dos cavalos que sejam protegidos das condições ambientais menos favoráveis que possam causar uma depressão do sistema imunitário, que não tenham complicações, infecções secundárias ou esforços antes do tempo aconselhado, recupera totalmente em sete a 14 dias. No entanto, a tosse pode persistir durante algumas semanas e os cavalos com uma doença mais severa podem levar um mês a recuperar (Morley *et al.*, 2000; Cullinane & Newton, 2013) Os cavalos em recuperação que sejam transportados, pratiquem exercício ou estejam expostos a condições climáticas adversas, podem apresentar tosse, bronquite severa, pneumonia e podem desenvolver edema dos membros (Wilson, 1993).

Antes da existência das vacinas, os surtos de IE na Mongólia apresentavam uma taxa de mortalidade de 20%, tendo sido reduzida para 5% com a introdução da vacinação (Yin *et al.*, 2013; Yondon *et al.*, 2013). Equinos que estejam vacinados ou tenham sido anteriormente expostos ao vírus são associados a uma baixa morbidade, mortalidade e velocidade de propagação da doença. Num surto ocorrido em 1992 em Hong Kong entre cavalos vacinados, 75% dos animais apresentavam testes serológicos positivos, 37% apresentavam sinais clínicos e a taxa de mortalidade foi de apenas 0,2%. Cavalos provenientes de zonas em que a doença não ocorreu, como é o caso da Nova Zelândia, apresentaram uma taxa de morbidade de 52%. Porém, os cavalos provenientes do hemisfério Norte apresentaram uma taxa de morbidade de 20%, demonstrando uma exposição prévia ao VIE ou à vacinação (Powell *et al.*, 1995).

1.2.7. Profilaxia

Os programas de vigilância e atualização de vacinas continuam a ser a melhor forma de prevenção e controlo da IE (Gildea *et al.* 2012). A prevenção da doença deve ser feita através do uso de vacinas eficazes, sendo assim mais eficiente na limitação da severidade dos sinais clínicos e na sua morbilidade durante os surtos. As vacinas têm assim um papel importante para o controlo da sua propagação, mas não eliminam a hipótese de os equinos serem infetados, sendo assim importante realizar o reforço vacinal (Powell *et al.*, 1995; Daly *et al.*, 2004; Minke *et al.*, 2004; Elton & Cullinane, 2013). No caso de ocorrência de surtos pode realizar-se uma vacinação estratégica, a fim de controlar a propagação da doença (Daly *et al.*, 2013).

Existem quatros tipos de vacinas: inativada, sub-unitária, atenuada e vetor viral. No entanto, existem outras em desenvolvimento ou em estudo, como o caso da vacina baseada na genética reversa e outras que não demonstraram benefícios em relação às existentes como é o caso da vacina de DNA (Daly *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2018; Landolt *et al.*, 2010). A primeira vacina contra a IE surgiu na década de 60, sendo uma vacina de vírus inativado (Daly *et al.*, 2013). A escolha da vacina mais indicada deve obedecer a vários requisitos, tais como: induzir uma resposta imune capaz de ser detetada, demonstrar proteção contra a infeção natural ou induzida, conter estirpes virais significativas e atualizadas, ser segura e fácil de administrar (Radostits *et al.*, 2003).

As vacinas inativadas conferem proteção aos cavalos sem libertação do vírus, necessitando de reforços para ter uma melhor eficácia. Estas vacinas são as mais adequadas para a vacinação de égua gestantes. As vacinas inativadas podem ser apresentadas com um adjuvante ISCOM-matriz, que permite aumentar o tempo de imunidade (Bengtsson, 2013; Paillot *et al.*, 2013a). Os adjuvantes promovem respostas celulares e humorais. As vacinas com complexos estimulantes da imunidade (ISCOM) demonstraram redução dos sinais clínicos em equinos, a prevenção de libertação do vírus e a indução da produção de IFN- γ específicos. A produção deste IFN é possível pela ativação das células Th1. A utilização do adjuvante gel hidróxido de alumínio demonstrou ser seguro em vacinas inativadas, promovendo uma boa imunidade. A administração da vacina combinada com a vacina inativada do herpes equino demonstrou uma melhoria da resposta imunitária contra o VIE (Paillot *et al.*, 2006; Paillot *et al.*, 2008; Horspool & King, 2013; Gildea *et al.*, 2016).

As vacinas sub-unitárias são compostas por antígenos purificados, e também podem ser apresentadas com ISCOM. Neste caso, são partículas derivadas da combinação da proteína viral com colesterol, fosfolípidos, saponinas quilaia, antígeno hidrofóbico e proteínas

membranares. A resposta conseguida com o ISCOM neste tipo de vacinas é mais proeminente, observando-se a indução de uma forte resposta de anticorpos com elevados níveis de IFN- γ . Caso estas sejam administradas por via intranasal, em reforço vacinal, o animal apresenta altos níveis de IgA específicos para o vírus. Este tipo de vacinas apresentam uma resposta de maior duração quando administradas num protocolo combinando com vacinas de administração intramuscular (Sjolander *et al.*, 1998; Crouch *et al.*, 2005; Paillot *et al.*, 2008; Elton & Bryant, 2011; Dilai *et al.*, 2018).

As vacinas atenuadas têm como objetivo simular uma infeção natural, sendo capazes de gerar respostas imunitárias locais e sistémicas. Devido à capacidade da estirpe se conseguir replicar apenas no trato respiratório superior, é evitado o desenvolvimento de sinais clínicos mais graves (Paillot, 2014; Townsend *et al.*, 2001).

As vacinas de vetor viral são vacinas intranasais, com um protocolo vacinal semestral. Estas são capazes de promover a produção de uma boa quantidade de anticorpos e são indicadas para a vacinação de éguas gestantes, mais especificamente no último período da gestação, levando à presença de níveis consideráveis de anticorpos no colostro. O vetor canarypox permite que os anticorpos atuem apenas na HA, permitindo a distinção entre os animais vacinados e os animais naturalmente infetados nos testes laboratoriais. Este tipo de vacina demonstrou um desenvolvimento rápido da imunidade, com uma duração prolongada contra a linhagem Americana, permitindo assim reforço vacinal ao fim de um ano (Daly *et al.*, 2004; Minke *et al.*, 2007; Daly *et al.*, 2011; Paillot & El-Hage, 2016; Soboll *et al.*, 2010).

Na América do Norte é usada uma vacina de vírus vivo modificado que já demonstrou eficácia experimental na prevenção da doença em relação aos vírus heterólogos. Neste tipo de vacina, o vírus mantém a sua capacidade de infeção da célula hospedeira, estimulando uma imunidade mais duradoura. No entanto, a sua utilização gera preocupação devido à possibilidade de reversão à virulência normal, com consequente comprometimento da saúde de fêmeas gestantes e de animais imunodeprimidos (Townsend *et al.*, 2001; Paillot *et al.*, 2014).

A maior dificuldade de combate à IE reside no controlo do vírus através da vacinação e a existência de vários reservatórios animais que permitem o seu reaparecimento. A mutação do vírus também desempenha um papel relevante, sendo uma constante ameaça para o sistema imunitário e, por isso, para as vacinas que tentam predispor o organismo a ter resposta na presença do vírus e limitar a sua propagação (Daly *et al.*, 2013; Elton & Cullinane, 2013). Estudos previamente realizados demonstram que a eficácia vacinal pode ser comprometida pela troca de um único aminoácido (Legrand *et al.*, 2013).

Para uma boa prevenção da doença é recomendada uma vigilância ativa, que inclua uma caracterização genética e antigénica do vírus detetado, conjuntamente com a informação clínica e epidemiológica fornecida por associações de veterinários, assim como a informação de possíveis falhas das vacinas, que pode culminar com um surto da doença (Back *et al.*, 2016; Daly & Murcia, 2018). As estirpes usadas nas vacinas estão homologadas pela OIE. Todos os anos a sequenciação e análise da HA das estirpes que surgem permitem avaliar a proteção cruzada conferida pelas vacinas em vigor. Os dados que surgem desta análise são avaliados e revistos pelo *Expert Surveillance Panel* (ESP), que é constituído por membros representantes da *World Health Organization* (WHO) e da OIE, permitindo tomar uma decisão caso seja necessário atualizar a estirpe a utilizar nas vacinas. A atualização das estirpes apenas é feita, caso a que esteja em vigor não seja capaz de fornecer uma imunização adequada (Cullinane *et al.*, 2010). A vacina tem de ser administrada de forma estratégica e de forma a que esta proporcione a melhor resposta imunológica possível. Quando mais recente for a estirpe, melhor será a proteção adquirida (Radostits *et al.*, 2003; Barbic *et al.*, 2009; Daly & Murcia, 2018).

A vacinação das éguas gestantes irá proteger o poldro neonatal contra a doença através da transferência passiva de anticorpos. No entanto, esta transferência de anticorpos poderá ser um fator de comprometimento da eficácia vacinal (van Maanen, *et al.*, 1992; Cullinane *et al.*, 2001). Assim, os planos vacinais começam aos seis meses de idade para permitir que o nível dos anticorpos maternos diminua, podendo, no entanto, ocorrer uma lacuna na imunidade. A imunidade passiva tem uma curta duração e alguns poldros com mães recentemente vacinadas são seronegativos às quatro semanas de idade (Nelson *et al.*, 1998). Concluiu-se também que esta lacuna pode ser diminuída iniciando o protocolo vacinal aos três meses de idade. (Perkins & Wagner, 2015)

Neste momento, as autoridades no Reino Unido, França e Irlanda recomendam a administração das primeiras doses entre 21 e 92 dias de diferença, e a terceira dose com uma diferença entre os 150 a 215 dias da segunda dose (Cullinane *et al.*, 2014). Estes intervalos permitem que a resposta imunitária seja aumentada imediatamente antes de um aumento de risco de exposição ao vírus. Intervalos de tempo mais longos aumentam o período de possível lacuna no sistema imunitário (Daly *et al.*, 2013). Com a vacinação, os cavalos jovens aumentam a contagem de anticorpos, mas apenas 75% da população atinge valores considerados protetores (Newton *et al.*, 2000a). A utilização de um plano vacinal semestral, em vez de anual, reduz o risco de surgimento de infeções pelo vírus e, por sua vez, o aparecimento de surtos (Ryan *et al.*, 2015). A vacinação acelerada, isto é, a redução do intervalo entre as doses vacinais, foi realizada com sucesso em situações de pré-surto na África do Sul e na Austrália, em 2007. Nesta situação, a administração da segunda dose foi

dada 14 dias após a primovacinação e a terceira com um intervalo 91 dias após a segunda, apresentando níveis de anticorpos idênticos aquando da utilização do tempo regulamentado e uma resposta imunitária protetora mais rapidamente. Caso o animal seja infetado após a primeira dose, os sinais clínicos são mais leves em relação aos animais não vacinados, tendo a primeira administração a capacidade para conferir um certo grau de imunidade (Arthur & Suann, 2011; El-Hage *et al.*, 2013)

Os cavalos de corrida, devido à sua idade, devem ser alvo de maior atenção. Quando estes animais chegam aos estábulos de corrida, normalmente apresentam anticorpos anteriores à vacinação, no entanto não são considerados suficientes para a sua proteção (Newton *et al.*, 2000a). Estudos realizados em equinos Puro-sangue Inglês demonstraram que 95% dos animais no mesmo centro de treinos já tinham recebido mais de que uma vacina de laboratórios diferentes após a primeira imunização, tendo sido associado a um elevado número de anticorpos presentes nesses animais em comparação com os restantes. No entanto, com o aumento das vacinações, os níveis médios dos anticorpos começaram a diminuir e a sobrevacinação poderá levar a problemas, tais como a perda de anticorpos pré-existentes (Ryan *et al.*, 2015).

As recomendações da OIE passam pela utilização de vacinas que contenham vírus da linhagem Fc1 e Fc2, visto que não têm sido reportados casos de Influenza resultantes do H7N7 e da linha Euroasiática. Para a Fc1 deve ser administrada a A/eq/South Africa/04/2003-like ou A/eq/Ohio/2003-like, e para a Fc2 deve ser administrada a A/eq/Richmond/1/2007-like, estando disponíveis estirpes mais recentes nos laboratórios de referência da OIE. As vacinas devem ser adaptadas às estirpes existentes em cada país de forma a melhorar a resposta imunitária à doença. Algumas estirpes não são incluídas nas vacinas, apesar de serem mais recentes, devido à sua vulnerabilidade a mutações, o que poderia comprometer a resposta pretendida com a vacinação (Gamoh & Nakamura, 2017; OIE, 2019b).

Em Portugal são comercializadas cinco vacinas contra a IE, aprovadas pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV): Equilis Prequenza, Equilis Prequenza Te, Equip FT, ProteqFlu e ProteqFlu-Te. As vacinas disponíveis e aprovadas pela DGAV encontram-se homologadas pelo Comité de Produtos Médicos de Uso Veterinário (CVMP) (DGAV, 2019; EMA, 2020a).

A Equilis Prequenza Te é composta por unidades antigénicas das estirpes A/Equine/2/South Africa/4/03 e A/Equine/2/Newmarket/2/93, apresentando também na sua composição toxoide de tétano e adjuvantes. Os adjuvantes que podemos encontrar nesta vacina são saponina purificada, colesterol e fosfatidilcolina. Apenas diferenciando-se da Equilis Prequenza por ter na sua composição toxoide de tétano (EMA, 2020b; EMA, 2020c).

A Equip FT contém antigénios inativados da estirpe A/Equine/1/Newmarket/77, vírus da estirpe A/Equine/2/Borlange/91 e da estirpe A/Equine/2/Kentucky/98 na sua composição, assim como toxoide imunopurificado do tétano e adjuvantes. Os adjuvantes são o Quil A e fosfato de alumínio (DGAV, 2020b). A ProteqFlu-Te contém genes da estirpe A/Equine/Ohio/03 e da estirpe A/Equine/Richmond/1/07, que foram inseridos no vetor canarypox, assim como Anatoxina *Clostridium tetani*. O adjuvante nesta vacina é o carbómero. Esta diferencia-se da ProteqFlu por ter anatoxina *Clostridium tetani* na sua composição (EMA, 2020d; EMA, 2020e).

O controlo de surtos deve ser planeado com um programa de vacinação precoce e rápido, sendo necessária a criação de estruturas para quarentena dos cavalos infetados. Assim, é necessário definir uma data limite para a vacinação de todos os cavalos. A área de quarentena deve ter acesso restrito e todos os elementos responsáveis devem receber formação na área da biossegurança, e as entradas e saídas devem ser cuidadosamente controladas, a fim de evitar a propagação da doença (Arthur & Suann, 2011). Para além das vacinas, existem outros métodos de prevenção, no entanto estão mais direcionados a conter a propagação da doença ou impedir a sua entrada num estábulo (Wilson, 1993; Daly *et al.*, 2004).

1.2.8. Imunidade

A imunidade é conseguida de duas maneiras diferentes, isto é, por infeção pelo vírus ou através da vacinação. A imunidade adquirida pela exposição ao agente depende do tipo de contacto com o vírus, da estirpe e do tempo de exposição. É importante reter que a resistência/imunidade que o animal apresenta, derivada da doença ou da vacinação, é maior para vírus homólogos em relação ao vírus heterólogo (Yales & Mumford, 2000). Assim, animais com concentrações de anticorpos dentro do padrão de proteção contra o vírus homólogo são suscetíveis à doença provocada por vírus heterólogos (Newton *et al.*, 2000b; van Maanen *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2004). Após o último contacto com o leite materno, os anticorpos podem permanecer até um ano e em alguns casos pode mesmo atingir os dois anos, com uma baixa incidência da doença em poldros. Os animais parcialmente imunizados tendem a ficar infetados subclínicamente (Morley *et al.*, 1999; Landolt, 2014).

A imunidade por contacto com o agente e pela vacinação caracteriza-se pela produção de diferentes imunoglobulinas (Ig). No caso de infeção natural existe a produção de IgA, IgG_A e IgG_B. A IgA está presente nas secreções nasais e as outras Igs no soro. Quando ocorre imunização por ação vacinal, o soro apresenta apenas IgG(T) e os anticorpos têm a

duração de três a quatro meses (Hannant *et al.*, 1988; Hannant *et al.*, 1989; Wilson, 1993; Nelson *et al.*, 1998). A determinação da concentração de anticorpos permite avaliar a suscetibilidade do animal à infecção, sendo um indicador da necessidade de reestruturação e/ou aplicação de um plano vacinal. O teste da hemólise radial permite analisar a imunidade a uma única estirpe e é preditivo da resistência da doença quer a nível de campo, quer a nível experimental (Newton *et al.*, 2000b; van Maanen *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2004).

A maioria das vacinas é composta por vírus inativado ou subunidades do vírus combinados com um adjuvante. Esta combinação visa maximizar a resposta imunitária conseguida através da vacinação, sendo assim o adjuvante um importante fator na composição da vacina. É importante referir que o fator predominante de uma vacina é a inclusão de quantidades suficiente de antigénio das estirpes virais que tem valor imunológico. A concentração de antigénios incluídos na vacina tem uma relação direta com a magnitude e duração da resposta do anticorpo. Uma vez que não é detetado, o vírus H7N7 não deve ser incluído na vacina (Daly *et al.*, 2004; Minke *et al.*, 2004). Para uma imunização preventiva, devem ser incluídos na vacina antigénios das linhagens Americana e Euroasiática do vírus H3N8, sendo necessário uma constante atualização da vacina com as estirpes que circulam na população equina (Yates & Mumford, 2000; Daly *et al.*, 2004; Elton & Cullinane, 2013). Uma simples alteração na posição 144 do antigénio A do gene da HA pode incapacitar uma vacina, isto é, levar a uma falha vacinal. Quando isto acontece, não existe proteção cruzada entre a estirpe existente e a vacina que foi administrada (Yamanaka *et al.*, 2015).

A utilização de vacinas de vírus vivo modificado apresenta uma imunidade que dura até seis meses. Num estudo realizado com o objetivo de determinar este intervalo, os pôneis apresentaram sinais clínicos mais leves, em comparação com o grupo controlo não vacinado, quando expostos a um vírus altamente patogénico seis meses após a vacinação. Passados 12 meses após o início do estudo, realizou-se uma nova recolha de dados, em que os animais vacinados apresentavam uma redução da temperatura, da concentração e da duração do vírus em relação aos animais não vacinados. Segundo o estudo, o uso desta vacina pode levar a uma redução acentuada da frequência, severidade e duração dos surtos da IE na América do Norte (Chamers *et al.*, 2001).

A vacina viva recombinante com vetor varíola canária foi introduzida na Europa, onde teve uma grande adesão por parte dos Veterinários e proprietários de equinos (Minke *et al.*, 2004). Esta vacina usa o vetor viral para introduzir os genes HA do VI na célula do hospedeiro. O vírus recombinante expressa o gene HA da linhagem Americana e da Europeia (Toulemonde *et al.*, 2005). A infecção da célula com o Canarypox é abortiva, isto é não existe produção ou expressão do mesmo, no entanto o gene do VIE é expresso e é demonstrado

através do complexo principal de histocompatibilidade classe 1 pela célula, originando uma resposta imunológica (Daly *et al.*, 2004).

Considera-se que existe falha numa vacina multivalente com vírus inativado quando esta não produz uma concentração suficiente de anticorpos, indicando uma falta de proteção contra uma infeção por um VI heterólogo (Newton *et al.*, 2000b; van Maanen *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2004). As falhas de imunização através da vacina podem ocorrer devido a fatores como o incorreto armazenamento da vacina, a incorreta administração ou a resposta individual de cada animal, variando de acordo com fatores genéticos, idade, presença de infeções, tratamentos em curso, presença de anticorpos maternos, estado nutricional e stress (NOAH, 2020).

1.2.9. Impacto económico e legislação

A IE encontra-se associada a poucas perdas económicas, devido à baixa mortalidade dos cavalos. No entanto, quando ocorrem surtos nos estábulos de cavalos de corrida, os animais afetados têm de parar o treino, o que pode levar à suspensão dos eventos de corrida durante meses num determinado país, com perdas económicas associadas (Powell *et al.*, 1995).

O surto que ocorreu na Austrália, no ano de 2007, obrigou à implementação de um plano de contingência que custou ao governo deste país cerca de mil milhões de dólares australianos. No entanto, alguns autores defendem que o custo associado a este surto pode ter sido ainda maior (Cowled *et al.*, 2009; Smyth *et al.*, 2011). A restrição de movimento dos animais causou grande perturbação e perda económica para todo o sector equino australiano. Com o intuito de reduzir o impacto económico, New South Wales instituiu aulas de biossegurança nas áreas mais afetadas. Foram também criados protocolos de biossegurança e programas de vacinação para o controlo da doença (Arthur e Suann, 2011).

No mesmo ano, na Suécia, a vacinação era considerada obrigatória apenas para cavalos em competição, com exceção dos que participavam em corridas de trote e cavalos jovens. Após o surto, a legislação foi alterada e a vacinação passou a ser obrigatória para todos os equinos envolvidos na indústria das corridas de trote, com consequente diminuição da frequência de casos entre 2008 e 2010 (Anon, 2010).

Segundo a lista de doenças de declaração obrigatória publicadas pelo Ministério da Agricultura e do Mar, a declaração da IE não é de cariz obrigatório (DGAV, 2020a). No entanto,

a OIE considera que a declaração desta doença, tal como as restantes que constam na lista de doenças, infeções e infestações atualizada em 2005, é de cariz obrigatório para os 182 estados membros desta organização, incluindo Portugal. Esta obrigação consta do Capítulo 1.1 do “OIE Terrestrial and Aquatic Animal Health Codes” (OIE, 2020a; OIE, 2020b).

1.3. Objetivos

Dada a relevância sanitária e económica da IE e a sua possível prevenção através da implementação de protocolos vacinais, considerou-se pertinente estudar a prática médico-veterinária em Portugal em relação à vacinação contra a IE e ao diagnóstico da mesma com recurso a testes laboratoriais, nos anos 2018 e 2019.

De forma a permitir uma análise comparativa de Portugal face ao contexto europeu, foram incluídos neste estudo alguns Estados Membros Europeus, tais como: Alemanha, França, Irlanda, Itália, Países Baixos, Portugal, Reino Unido e Suécia.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo baseou-se na elaboração de um questionário (Apêndice I) constituído por nove questões sobre:

- 1) área geográfica da prática clínica;
- 2) aptidão dos equinos avaliados (desporto, lazer ou reprodução);
- 3) número de casos suspeitos de IE nos últimos dois anos;
- 4) número de casos de IE diagnosticados com o apoio de testes laboratoriais nos últimos dois anos;
- 5) número de vacinações contra a IE no ano de 2018;
- 6) número de vacinações contra a IE no ano de 2019;
- 7) o protocolo vacinal utilizado segue as normas da FEI/FEP;
- 8) o protocolo vacinal é anual ou semestral;
- 9) utilização de testes laboratoriais de IE nos últimos dois anos.

Os inquéritos foram difundidos via *online* para resposta anónima pelos Médicos Veterinários que se dedicam à clínica de Equinos, de modo a proteger a identidade dos profissionais e dos seus pacientes.

Com o objetivo de realizar um estudo mais abrangente e comparar a prática clínica de Portugal com a de outros países europeus, o inquérito foi difundido nos seguintes países: Alemanha, França, Irlanda, Itália, Países Baixos, Portugal, Reino Unido e Suécia. Para além de Portugal, os restantes países europeus foram selecionados com base na ocorrência de surtos de IE nos anos de 2018 e/ou 2019 reportados pela OIE.

O estudo foi realizado em fases temporais distintas, entre 1 de setembro de 2019 e 16 de março de 2020. Este foi primeiramente realizado em Portugal, e mais tarde estendido aos Estados Membros selecionados. Os questionários foram disponibilizados em língua portuguesa em Portugal e em inglês nos restantes países.

Em Portugal, os inquéritos foram difundidos pela Associação Portuguesa de Médicos Veterinários de Equinos e partilhados num grupo de *facebook* de Médicos Veterinários de Equinos. O inquérito foi divulgado pela *British Equine Veterinary Association* no Reino Unido. Na Irlanda foi divulgado pela *Equine Interest Group of Veterinary Ireland* e pela publicação de um artigo no *Veterinary Ireland Journal* (Figura 6), tendo sido também enviada uma

mensagem eletrónica (*Vetalert*) aos Médicos Veterinários de Equinos, como incentivo à participação no estudo (Figura 7). Foi também contactada a *Deutschen Reiterlichen Vereinigung* da Alemanha, a *Koninklijke Nederlandse Hippische Sportfederatie* dos Países Baixos, a *Association Vétérinaire Equine Française* de França, a *Società Italiana Veterinari per Equini* de Itália e a *Sveriges Veterinarförbund* da Suécia.

Neste estudo foram consideradas as respostas submetidas e cuja divulgação foi autorizada. Para fundamentar o estudo foram recolhidos dados junto de várias entidades nacionais e internacionais, incluindo: *Animal Health Trust*, DGAV, *Equine Interest Group of Veterinary Ireland*, FEP, INIAV, *Irish Equine Centre* e OIE. A análise estatística descritiva dos dados realizada com recurso ao programa Microsoft Excel (Microsoft, EUA).

NEWS | INDUSTRY

Equine influenza survey

The Equine Interest Group of Veterinary Ireland is supporting the research of Luís Dionísio on equine influenza in Ireland, through an online survey of veterinary practitioners. Luís is a senior veterinary medicine student at Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, in Lisbon, Portugal, and the subject matter of his research is equine influenza. This research includes a clinical practice survey designed to collect data about equine influenza vaccination practice in selected European countries, including Ireland. This survey is open to Irish veterinary practitioners between February 20-March 16. The findings of the Irish research will be shared with the Equine Interest Group. Veterinary Ireland members are encouraged to assist Luís in completing his research. Please contact Veterinary Ireland headquarters (HQ@vireland.ie) for an email link to the survey; or alternatively, it can be accessed here: https://docs.google.com/forms/d/1yWdhjFH6wkhkIBZISxHYNLZdZFYW3UPJ7zmVm-_oY/edit

Proposed vet-ownership bill welcomed by Veterinary Ireland

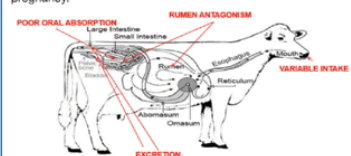
The recent announcement by Fianna Fáil TD, Deputy Jackie Cahill, that he is to bring forward a bill that would confine ownership of veterinary practices to registered veterinary practitioners, has been welcomed by Veterinary Ireland. The Fianna Fáil-backed bill aims to amend the Veterinary Practice Act 2005-2012 to ensure that the registered veterinary practitioner in charge is an integral part of the ownership structure of a veterinary practice. In support, Veterinary Ireland has said that this course of action has been necessitated by the recent 'encroachment' by lay corporate entities into the ownership and operation of veterinary practices in Ireland. It added that it is 'extremely disappointed that the Veterinary Council of Ireland has failed to take measures to stop the purchase and operation of veterinary practices in Ireland by lay corporate bodies, in contravention of the Veterinary Practice Act 2005. President of the Veterinary Council of Ireland, Peadar Ó Scanail insists that: "The veterinary practitioner is the service provider and any non-registered owner, part owner or investor must not influence nor seek to influence the service provision to the public at and from that premises." However, Veterinary Ireland president, Conor Geraghty pointed to the recent closure of a veterinary practice in Donegal by its lay corporate owner as a serious health and welfare risk, and reason why intervention is necessary. "This clearly demonstrates that the registered veterinary practitioner in charge was powerless to prevent this closure. This resulted in serious animal health and welfare issues and in critically important and dangerous drugs being under the control of non-vets. To ensure that this sequence of events can never be repeated, it is necessary to amend the Veterinary Practice Act, to ensure that the veterinary practitioner in charge must be an integral part of the ownership structure and have total control of the operation of the veterinary practice." Veterinary Ireland has acknowledged the overwhelming support of the Joint Oireachtas Committee on Agriculture, Food and the Marine in addressing this issue of critical importance to the future delivery of veterinary services in Ireland and says it looks forward to their support of this proposed legislation.

Avoid Subclinical Mineral Deficiency Pre Breeding

Teagasc estimate that a cow calving in May will generate €400 less profit than a cow calving in February, due to higher feed costs and reduced yield and for every 100 cows, compact calving is worth on average €10,000 – €12,000 (€100 – €120 per cow/year). Subclinical mineral deficiency may be adversely affecting reproductive performance in Irish herds. It has been reported that within Irish grass silages: 63% are low in copper, 69% are very low in selenium and 29% are low in zinc. This means a lot of cattle could be on the threshold of subclinical deficiency.

According to NRC¹, oral minerals are relatively poorly absorbed by cattle. Only 1-5% of oral copper is absorbed by adult cattle, for zinc 10-20% and Manganese about 1%. Rumen antagonists further hamper this poor oral absorption, meaning that diets with "adequate" trace minerals included may not be effective in maintaining cows' mineral levels.

Even cattle fed on grass silage that meet trace mineral requirements simply may not eat an adequate amount to maintain mineral levels. During the pre-calving period dry matter intake falls by 30-35%. This coincides with a massive increase in demand for minerals. In the weeks coming up to calving, the unborn calf will be growing rapidly and its only supply of minerals will be across the placenta from the dam. After calving, the cow will be lactating, recovering from calving and trying to get back in calf, all processes that draw on cows' mineral reserves. Thus, even seemingly well-fed cows and herds can fall into subclinical mineral deficiency and fail to achieve or maintain pregnancy.



MULTIMIN™ is a combination trace mineral injection which is a fast and effective way for farmers to enhance their cows' mineral status in the pre breeding window. Injectable trace mineral bypass the harsh rumen environment and antagonists, raising circulating trace minerals within 8-10 hours, liver levels within 24 hours and enhance cows' key antioxidant enzyme levels². Several studies have researched the potential benefits of **MULTIMIN™** in cows in the pre breeding period, with improvements in overall pregnancy rates and improved calving distribution³. Pre-breeding supplementation could help get cows and heifers back in calf in a tighter-calving pattern.

References

1. Teagasc Breeding Management <https://www.teagasc.ie/animals/dairy/breeding-genetics/breeding-management/>
2. Dry and transition cow nutrition for the grazing Irish dairy herd, Dr Finbar Mulligan and Catherine Carthy MVB <https://ifra.ie/wp-content/uploads/2016/04/Grassland-Association-paper-Jan-2016-Finbar-Mulligan.pdf>
3. NRC Nutrient requirements of dairy cattle: 7th revised edition, 2001
4. Pogge, D. & Richter, E. Mineral concentrations of plasma and liver following injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. *J. Anim. Sci.* 90, 2692-2696 (2012).
5. Effects of prepartum and postpartum bolus injections of trace minerals on performance of beef cows and calves grazing native range 2012 L. R. Mundell, J. R. Jaeger, J. W. Waggoner, J. S. Stevenson, D. M. Greger, L. A. Pacheco, J. W. Bolte, N. A. Aubel, G. J. Eckert, M. J. Maciek, S. M. Enslin, L. J. Havenga, and K. C. Olson

Multimin solution for Injection for Cattle contains Zn (60mg/ml) Mn (10mg/ml) Cu (15mg/ml) Se (6mg/ml) POM. For the Supply of trace minerals to correct concurrent clinical or subclinical deficiencies of Se, Cu, Mn and Zn which can arise during critical phases of the production or breeding life cycle. Further information available from the SPC and Virbac Ltd. Unit 16 Woolpit Business Park, Windmill Avenue, Woolpit, Bury St. Edmunds, Suffolk IP30 9LP. Tel: +44 (0) 1509 243243. Use medicines responsibly.

THE VIRBAC TEAM IN IRELAND

- Oliver Dillon - 086 821 0418 • Peter Gannon - 086 772 5514
- Joanna Mc Nally +44 7867 422 565 (Northern Ireland)
- Eugene Smyth - 086 821 0912



Figura 6. Artigo publicado na Irlanda no Veterinary Ireland Journal para divulgação do estudo.

From: HQ
Sent: 20 February 2020 11:07
To: HQ
Subject: VetALERT 08/20 - EQUINE - Survey of Veterinary Practitioners on Equine Influenza - 20th February - 16th March 2020

Dear Veterinary Ireland Member,

The Equine Interest Group of Veterinary Ireland is supporting the research of **Luís Dionísio** on **Equine Influenza in Ireland**, through an **online Survey of Veterinary Practitioners** available at:

<https://docs.google.com/forms/d/1ywDhjFH6wkhkIBZ1SxIHYNLtZdZFYW3UPjTzmVm-oY/edit>.

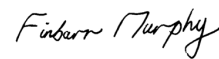
Luís is a senior student at the college of Veterinary Medicine, at Universidade Lusofona de Humanidades e Tecnologias, in Lisbon, Portugal, and the subject matter of his research is **Equine Influenza**.

This research includes a clinical practice survey designed to collect data about Equine Influenza vaccination practice in selected European countries, including Ireland.

This survey is open to Irish Veterinary Practitioners between **20th February and 16th March 2020**, and Luís has indicated that he will be able to share the findings of his Irish research with the Equine Interest Group.

Any assistance that Veterinary Ireland members can provide in completing Luís' Survey by 16th March 2020 would be appreciated.

Yours sincerely



Finbarr Murphy
Chief Executive



Veterinary Ireland, 13 The Courtyard, Kilcarbery Park, Nangor Road, Dublin 22, D22 XH05.
Tel: (01) 4577976 Fax: (01) 4577998 E mail: HQ@vetireland.ie Web: www.veterinaryireland.ie



This e-mail is for intended recipients only - If you are not the intended recipient, you may not copy, distribute, or act on any information or instruction contained therein. If you receive this e-mail in error, please notify the sender immediately, delete the file and destroy any hard copies. Any views or opinions presented are solely those of the author and do not necessarily represent those of Veterinary Ireland unless otherwise specifically stated.

Veterinary Ireland accepts no responsibility or liability for information used or action taken thereon due to incorrect receipt.

 Please respect the environment and do not print this email unless you really must.

Figura 7. Mensagem eletrónica (Vetalert) a incentivar a participação dos Médicos Veterinários de equinos no estudo.

III. RESULTADOS

3.1. Dados recolhidos de entidades nacionais e internacionais

3.1.1. Número de diagnósticos em Portugal

A OIE reportou a inexistência de casos de IE em Portugal desde 1996. No entanto, segundo dados do INIAV, entre 2018 e 2019, foram detetados dois casos positivos de IE e no mesmo período foram requeridas 13 análises laboratoriais para despiste da doença.

3.1.2. Número de vacinas administradas em Portugal

Nos anos de 2018 e 2019 foi vendido um total de 3013 vacinas para a IE em Portugal. Observou-se um decréscimo de 4% na venda de vacinas no ano de 2019, quando comparado com o ano anterior (1457 vs 1556), dados recolhidos junto da DGAV (Gráfico 2).

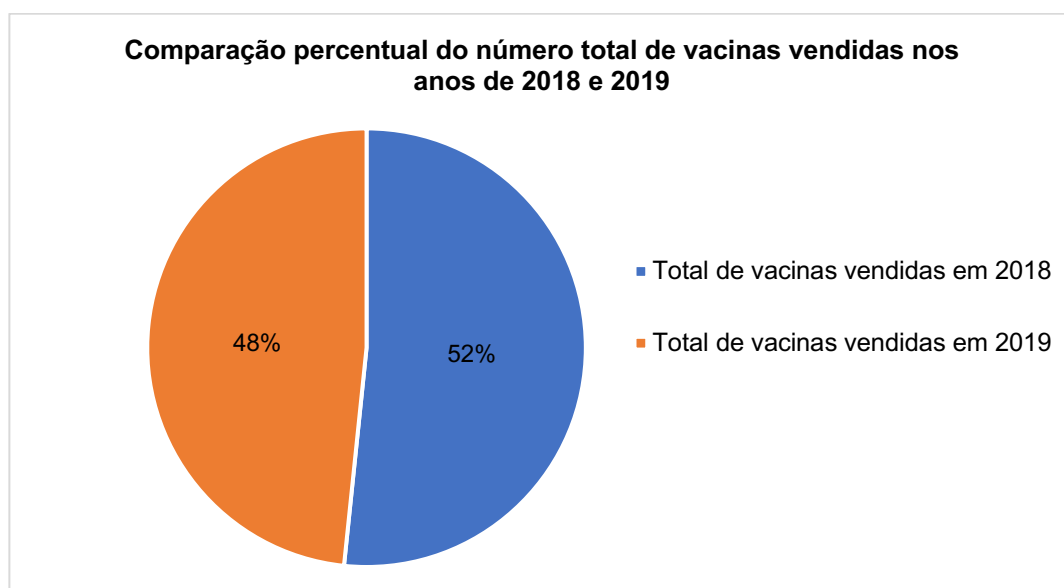


Gráfico 2. Número total de vacinas vendidas em Portugal, em 2018 e 2019.

Nos anos 2018 e 2019, a preferência da vacina a utilizar contra a IE recaiu sobre a ProteqFlu-Te. No entanto, observou-se uma redução de aproximadamente 27% no número de unidades vendidas no ano de 2019, quando comparado com o ano anterior. Inversamente, as vacinas ProteqFlu, a Equilis Prequenza TE e a Equip FT registaram um aumento no número

de unidades vendidas em 2019, sendo mais acentuado para a Equip FT. A vacina Equilis Prequenza não registou qualquer venda em ambos os anos (Gráfico 3).

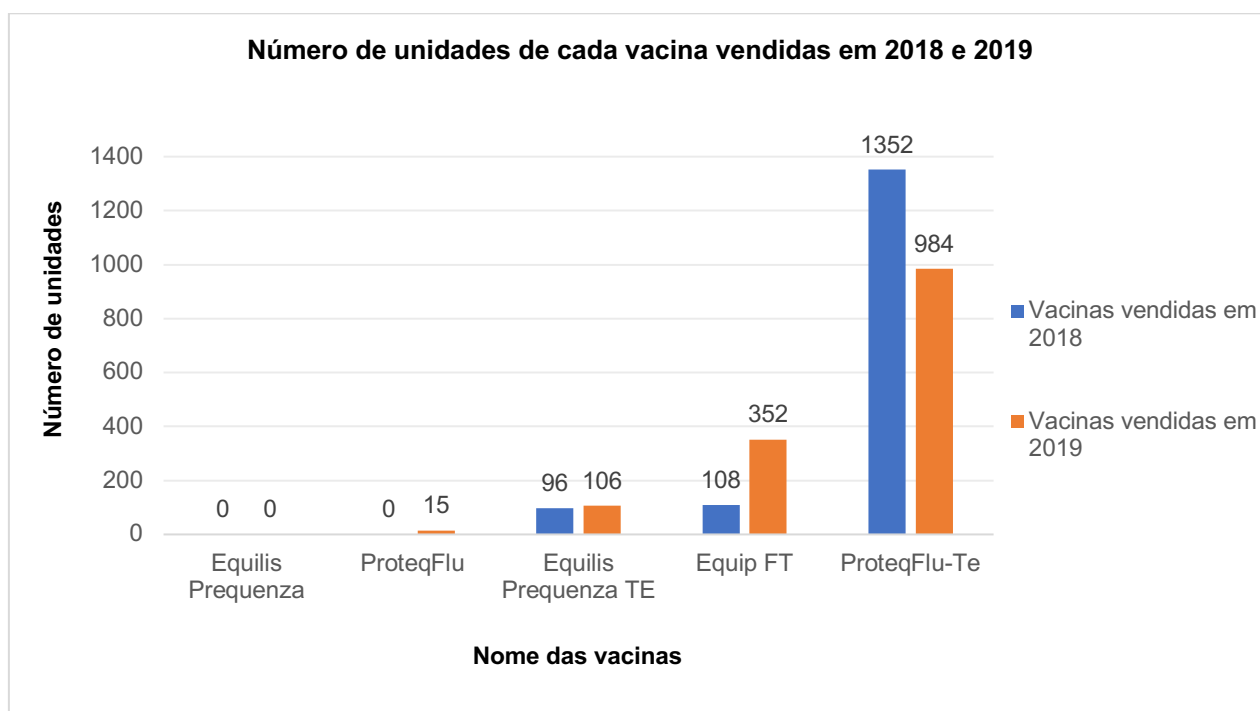


Gráfico 3. Número de unidades de cada vacina vendidas em Portugal, em 2018 e 2019.

3.1.3. Número de casos nos restantes países estudados

De acordo com o *Equine Interest Group of Veterinary Ireland*, no ano de 2018 não foram identificados casos de IE na Irlanda. No entanto, no ano de 2019 foram identificadas 80 instalações com casos de IE.

De acordo com os dados fornecidos pela Presidente da *Sveriges Veterinarförbund*, nos anos de 2018 e 2019 foram registados 10 casos de IE na Suécia. A realização de testes laboratoriais é frequente quando são detetados sinais respiratórios e a taxa de vacinação contra a IE neste país encontra-se entre os 70-75%. As associações presentes na Suécia alinharam as suas diretrizes para vacinação contra a IE, recomendando que a primovacinação deverá ser composta por três vacinas, sendo que a segunda vacina deverá ser dada entre os 21 a 92 dias após a primeira, e a terceira 150 a 215 dias após a segunda, com reforço anual. Existem também recomendações que são apresentadas por alguns veterinários para a vacinação de poldros, cavalos com idades abaixo dos quatro anos, e vacinação a cada seis meses nos cavalos de competição.

3.2. Adesão dos países europeus ao inquérito

Para além de Portugal, foi solicitado a adesão e divulgação *online* do inquérito em vários Estados Membros: Alemanha, França, Irlanda, Itália, Países Baixos, Reino Unido e Suécia. No entanto, nem todos aceitaram o convite para a participação no estudo, não tendo sido obtida resposta aos contactos enviados por mensagem eletrónica ou aos inquéritos por parte da *Deutschen Reiterlichen Vereinigung* (Alemanha), da *Società Italiana Veterinari per Equini* (Itália) e da *Koninklijke Nederlandse Hippische Sportfederatie* (Países Baixos).

A *Association Vétérinaire Equine Française* (França) não respondeu ao convite por correio eletrónico, mas foram obtidas duas respostas. A *Sveriges Veterinarförbund* (Suécia) respondeu ao convite enviado por correio eletrónico recusando a partilha do inquérito, no entanto foram obtidas duas respostas ao mesmo.

Os países que participaram ativamente no estudo e divulgaram o inquérito foram Portugal, a Irlanda e o Reino Unido (Figura 8).

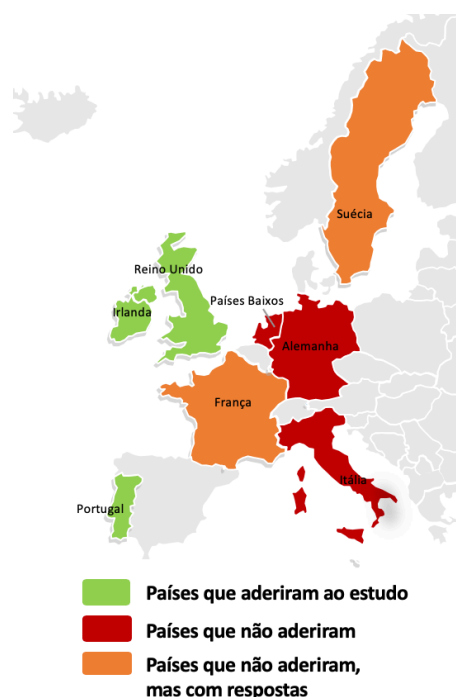


Figura 8. Participação dos Estados Membros no estudo. A verde estão representados os países que aceitaram participar no estudo e na divulgação do inquérito. A laranja encontram-se os países que rejeitaram a divulgação dos inquéritos, mas de onde foram obtidas respostas. A vermelho surgem os países dos quais não foi obtida qualquer resposta ao contato eletrónico ou ao inquérito.

3.3. Respostas ao inquérito nos vários Estados Membros

3.3.1. Questão 1 - Área geográfica da prática clínica

Foram obtidas 87 respostas ao inquérito com diferente proveniência. A maioria das respostas foram obtidas de Médicos Veterinários com prática clínica a nível nacional (57,5%) e as restantes foram obtidas de profissionais com atividade no Reino Unido (19,5%), na Irlanda (18,4%), na Suécia (2,3%) e em França (2,3%) (Gráfico 4).

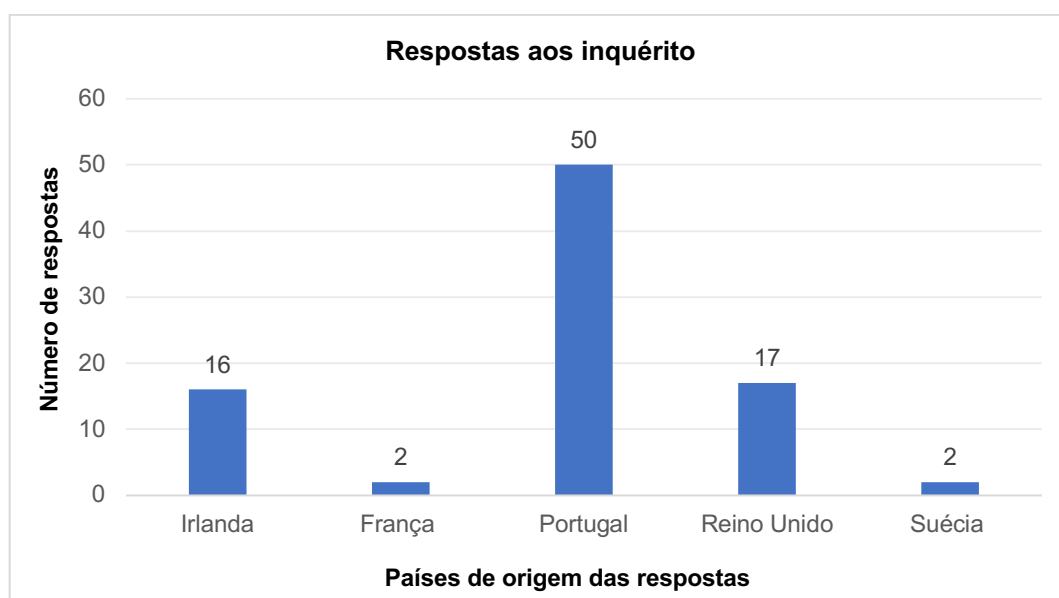


Gráfico 4. Países onde os veterinários participantes exercem a sua atividade clínica.

3.3.2. Questão 2 - Aptidão dos equinos avaliados

Os Médicos Veterinários portugueses que participaram no estudo exercem a sua atividade clínica maioritariamente em equinos de desporto (24/50) (Gráfico 5).

A prática veterinária dos profissionais de outros países que responderam ao inquérito incide maioritariamente sobre equinos de desporto (14/37) e lazer (17/37) (Gráfico 5). Apenas 12 dos profissionais que responderam ao inquérito dedicam a sua atividade a animais de corrida (4/37) e reprodução (2/37) (Gráfico 6).

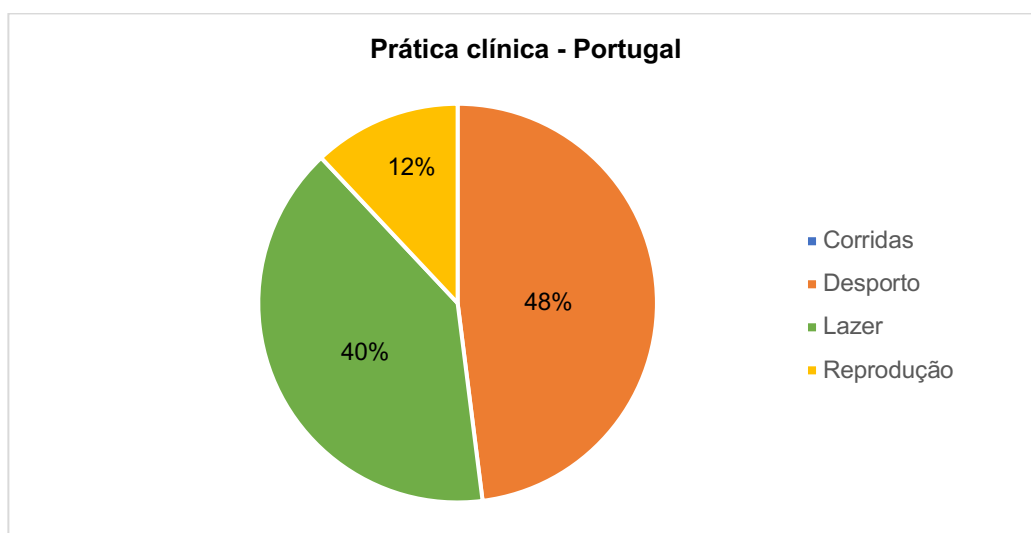


Gráfico 5. Aptidão dos equinos tratados pelos Médicos Veterinários que responderam ao inquérito em Portugal.

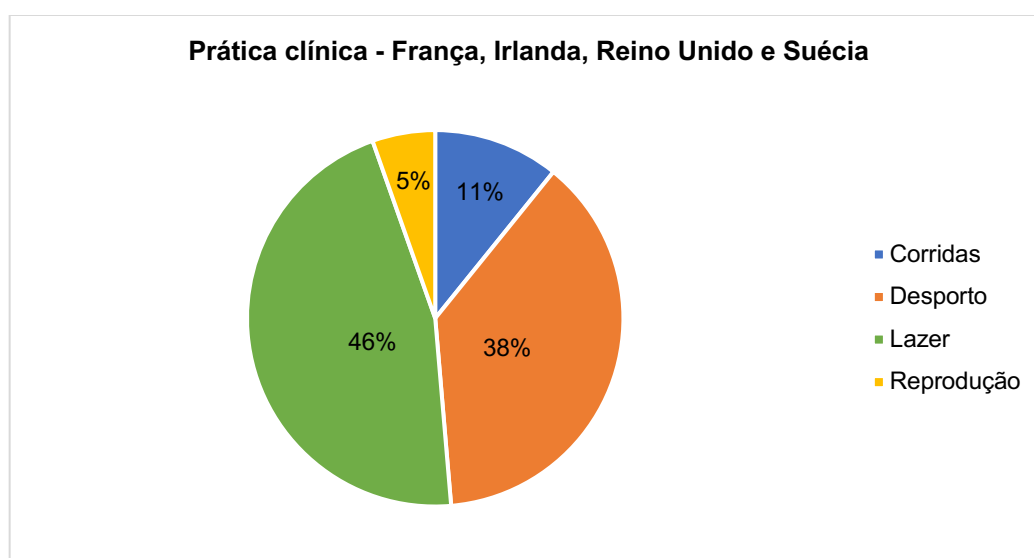


Gráfico 6. Aptidão dos equinos tratados pelos Médicos Veterinários que responderam ao inquérito na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

3.3.3. Questão 3 - Número de casos suspeitos de IE nos últimos dois anos

Os Médicos Veterinários com atividade em Portugal reportaram a existência de casos suspeitos de IE em 2018 e 2019. Entre estes, 12 profissionais reportaram a suspeita de 6 a 20 casos, e apenas um clínico reportou a suspeita de um número elevado de casos (>50 casos) (Gráfico 7).

Dos 37 profissionais com atividade em outros países europeus, 13 afirmam ter suspeitas de casos de IE em 2018 e 2019. Destes, quatro profissionais tiveram um elevado

número de casos suspeitos de doença (>20 casos). Nos restantes 24 participantes não foi possível afirmar a existência de casos suspeitos (Gráfico 8).

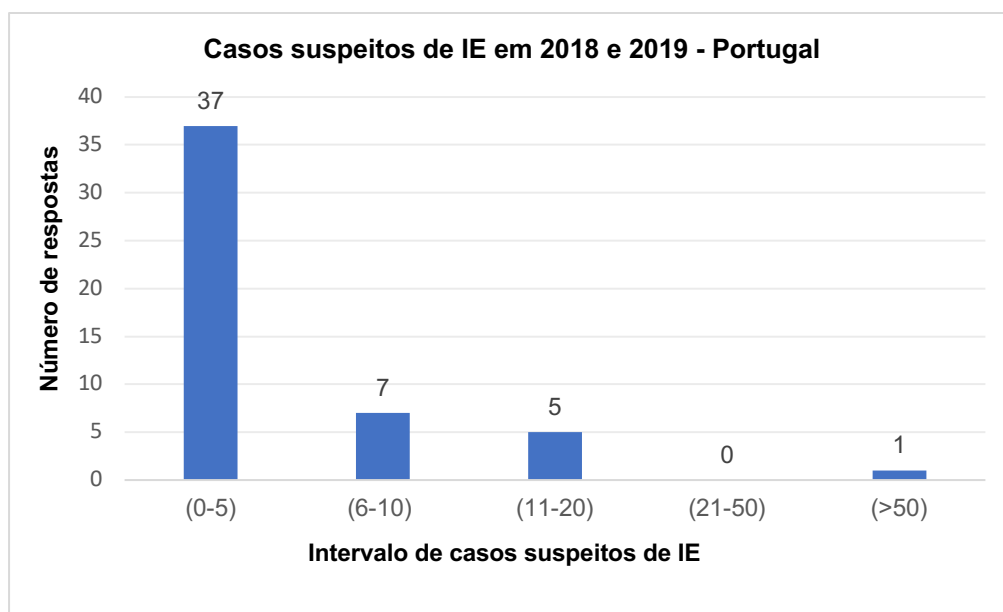


Gráfico 7. Caos suspeitos de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019, em Portugal.

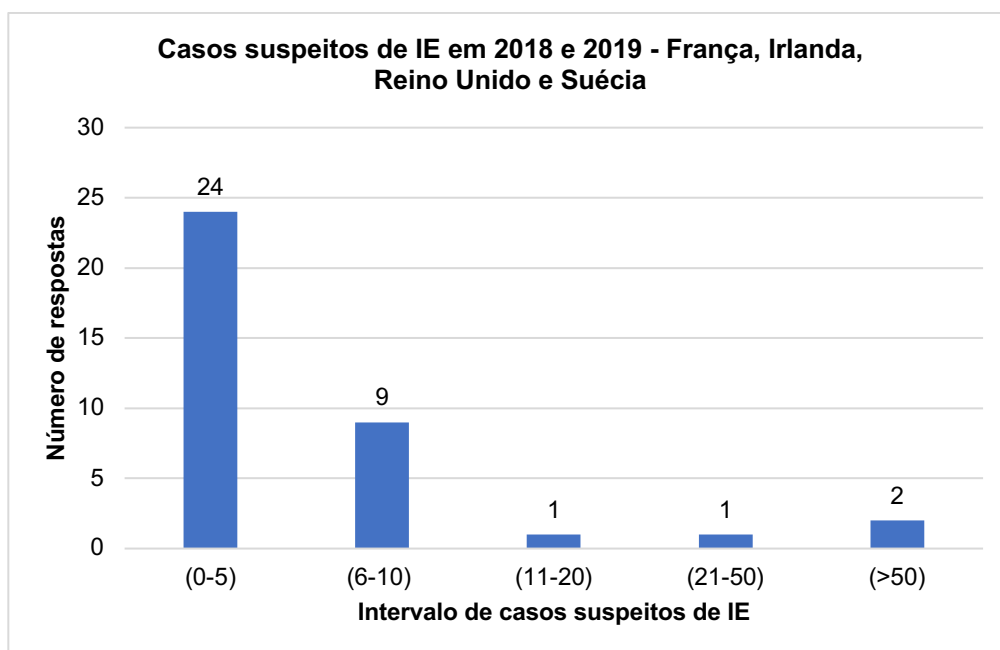


Gráfico 8. Caos suspeitos de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019, na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

3.3.4. Questão 4 - Número de casos de IE diagnosticados com apoio de testes laboratoriais nos últimos dois anos

Dos 50 casos suspeitos de IE em Portugal, o diagnóstico foi confirmado com recurso a testes laboratoriais em apenas quatro casos (Gráfico 9).

Nos outros países onde o estudo decorreu, foram confirmados 60 casos de IE de entre as suspeitas dos 37 profissionais (Gráfico 10).

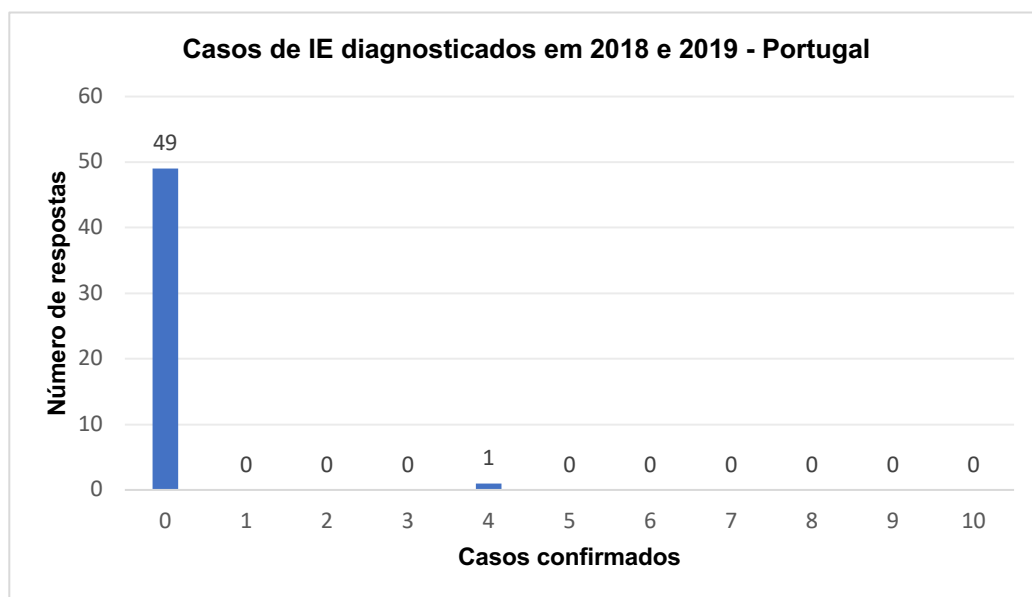


Gráfico 9. Casos de IE diagnosticados em Portugal com recurso a testes laboratoriais.

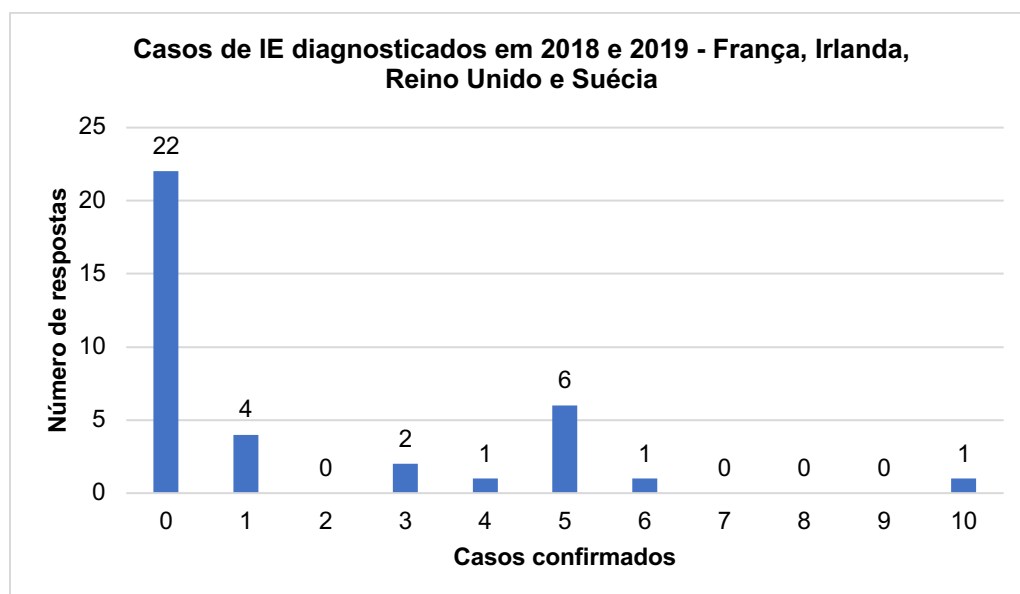


Gráfico 10. Casos de IE diagnosticados na França, Irlanda, reino Unido e Suécia, com recurso a testes laboratoriais.

3.3.5. Questão 5 - Número de vacinações contra a IE no ano de 2018

Os Médicos Veterinários que participaram no estudo em Portugal revelaram vacinar equinos contra IE no ano de 2018, sendo que 22 dos profissionais aplicaram mais de 100 vacinas (Gráfico 11).

As respostas referentes aos outros países revelaram que 21 dos profissionais aplicaram mais de 100 vacinas e apenas seis profissionais administraram menos de 51 vacinas em 2018 (Gráfico 12).

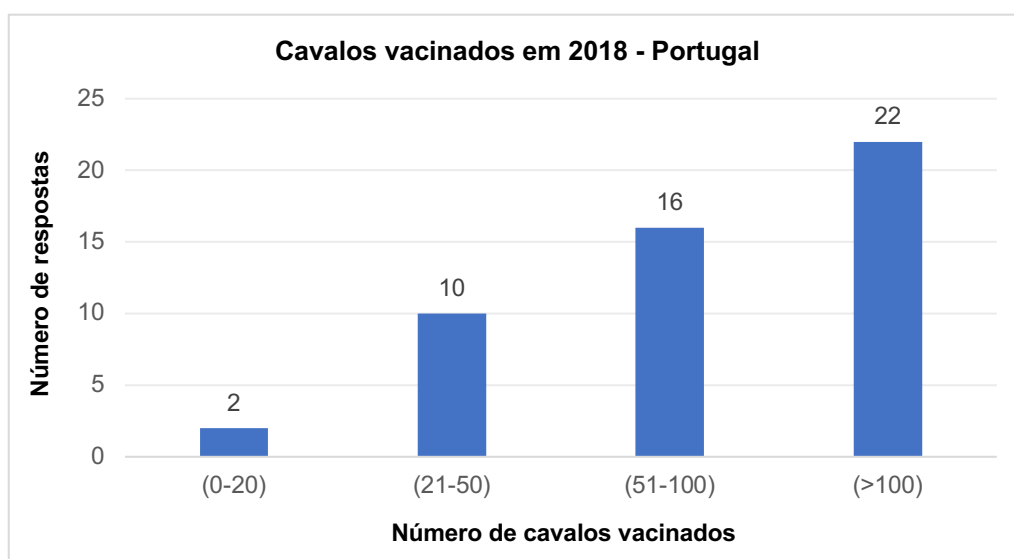


Gráfico 11. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, em Portugal.

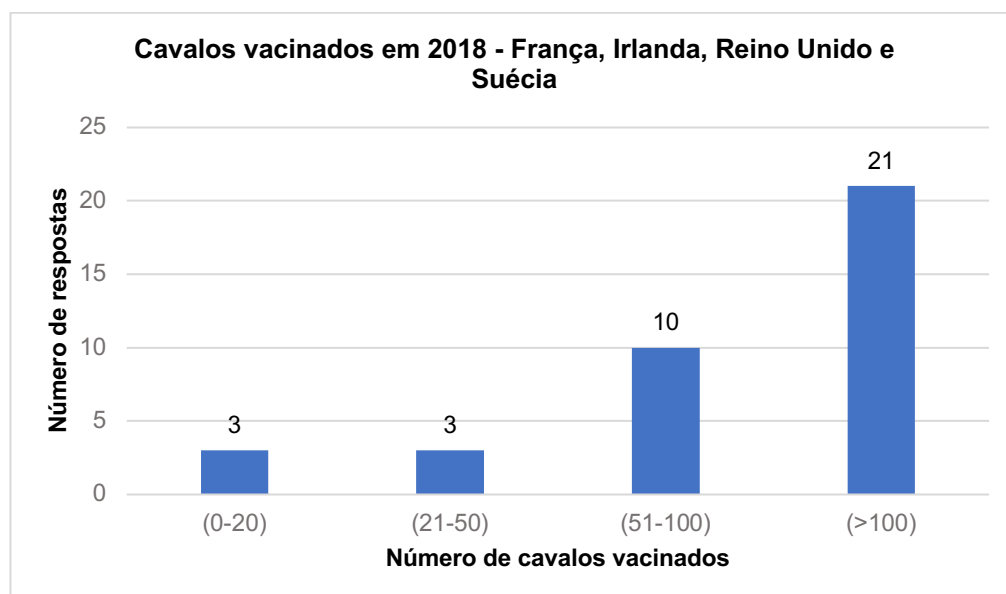


Gráfico 12. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

3.3.6. Questão 6 - Número de vacinações contra a IE no ano de 2019

Os dados relativos à vacinação contra a IE em Portugal no ano de 2019 foram semelhantes aos observados no ano de 2018. No entanto, foi registada uma diminuição no número de profissionais que administraram mais de 100 vacinas e um aumento no número de profissionais que administraram 0-20 vacinas ou 51-100 vacinas (Gráfico 13).

Relativamente aos dados dos outros profissionais referentes à vacinação contra a IE no ano 2019, os valores são muito semelhantes aos observados no ano de 2018, tal como os dados referentes a Portugal. Pode observar-se uma subida no número de profissionais que administrou mais de 100 vacinas e uma diminuição dos que administraram 0-20 vacinas (Gráfico 14).

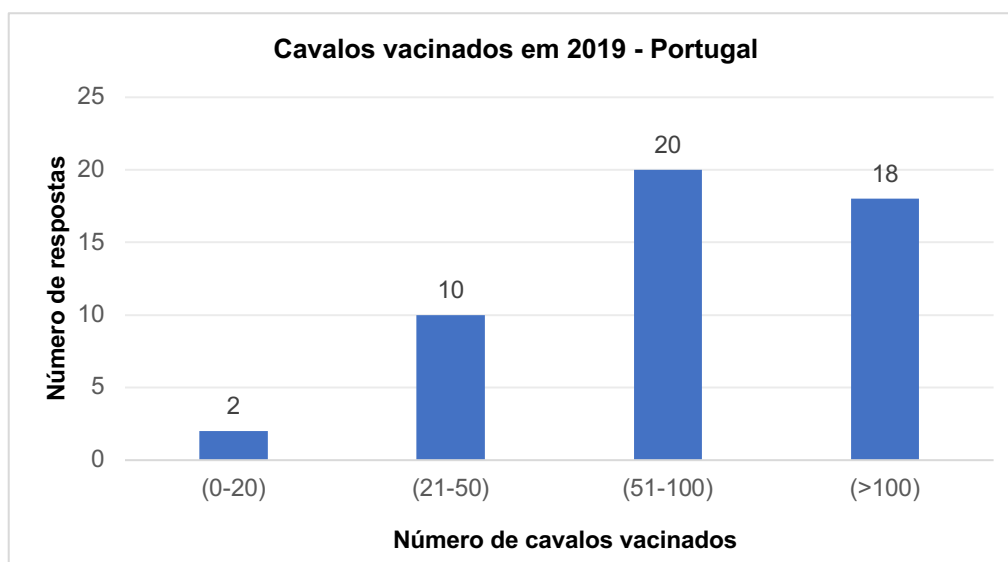


Gráfico 13. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2019, em Portugal.

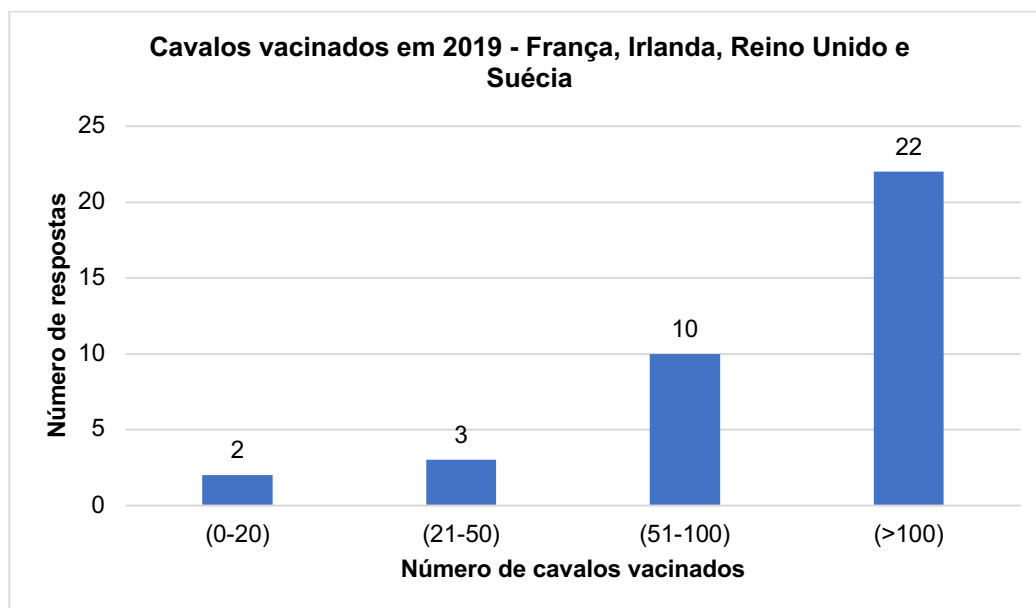


Gráfico 14. Vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

3.3.7. Questão 7 - O protocolo vacinal segue as normas da FEI/FEP

A maioria dos Médicos Veterinários em Portugal (90%) aplica o protocolo vacinal recomendado pela FEI. Nenhum dos profissionais revelou seguir as indicações da Federação Equestre Portuguesa (Gráfico 15).

A maioria dos profissionais de outros países (73%) aplica o protocolo vacinal recomendado pela FEI, sendo que alguns profissionais (24%) seguem os protocolos recomendados por federações ou entidades reguladoras do país. Apenas um Médico Veterinário revelou não seguir qualquer recomendação (Gráfico 16).

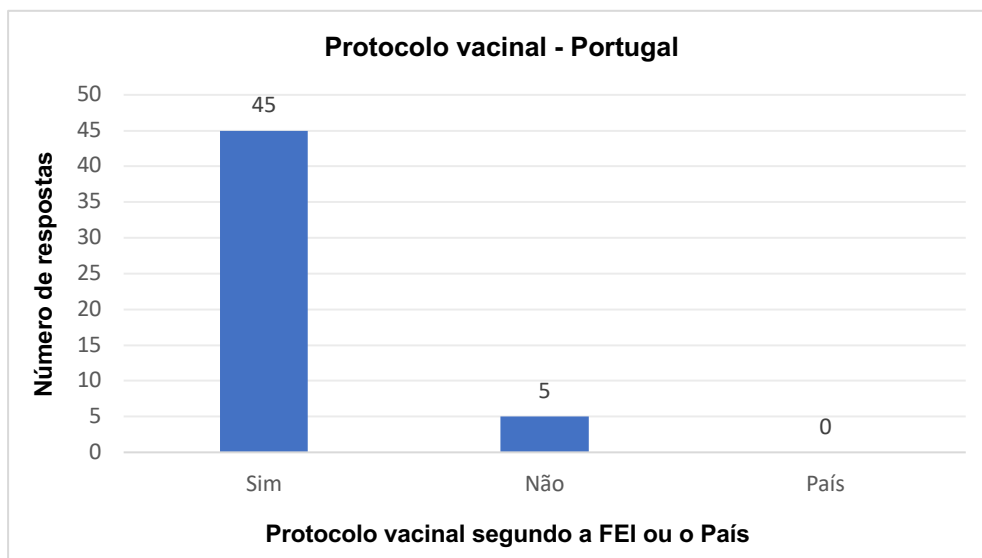


Gráfico 15. Protocolo vacinal contra a Influenza Equina (IE) adotados pelos Médicos Veterinários em Portugal.

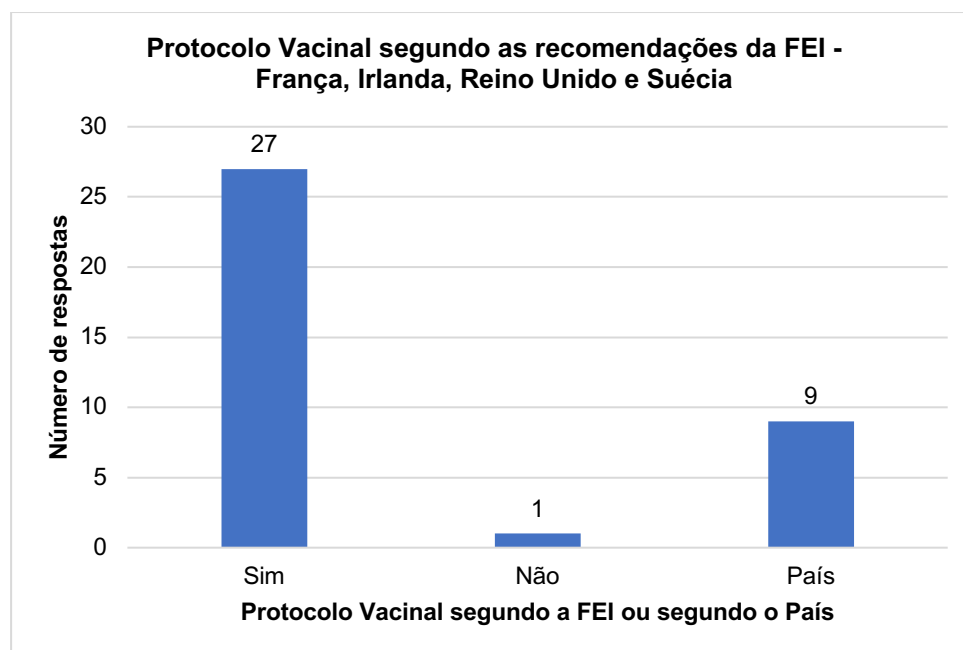


Gráfico 16. Protocolo vacinal contra a Influenza Equina (IE) adotados pelos Médicos Veterinários na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

3.3.8. Questão 8 - O protocolo vacinal é anual ou semestral

De acordo com a FEI, o Médico Veterinário pode adotar dois tipos de protocolo vacinal: semestral ou anual, considerando a atividade ou mobilidade do cavalo. Os

profissionais em Portugal não revelaram preferência pela vacinação semestral ou anual (Gráfico 17).

Os profissionais de outros países europeus (73%) apresentaram preferência pela utilização de protocolos de vacinação anual (Gráfico 18).

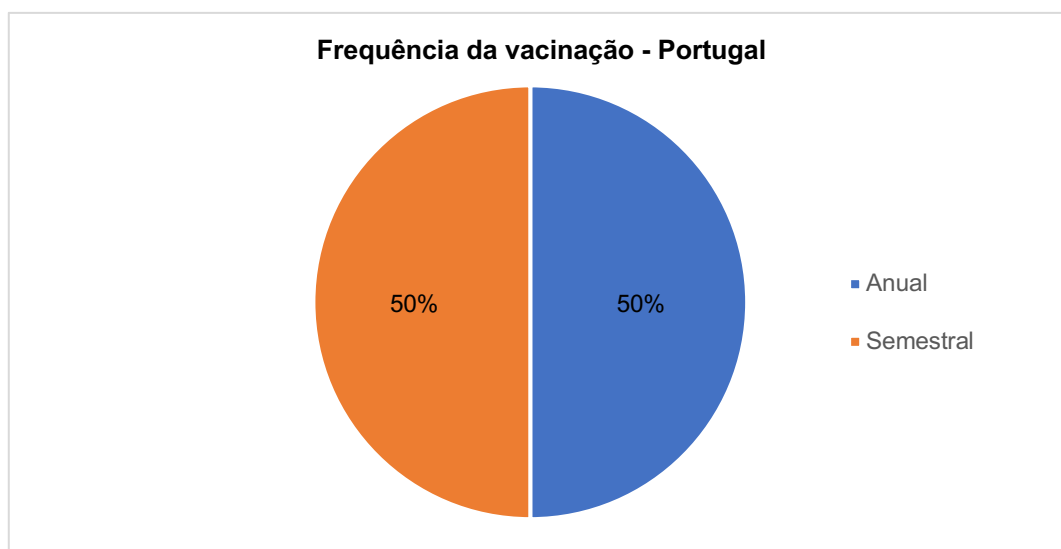


Gráfico 17. Frequência da vacinação contra a Influenza Equina (IE) em Portugal.

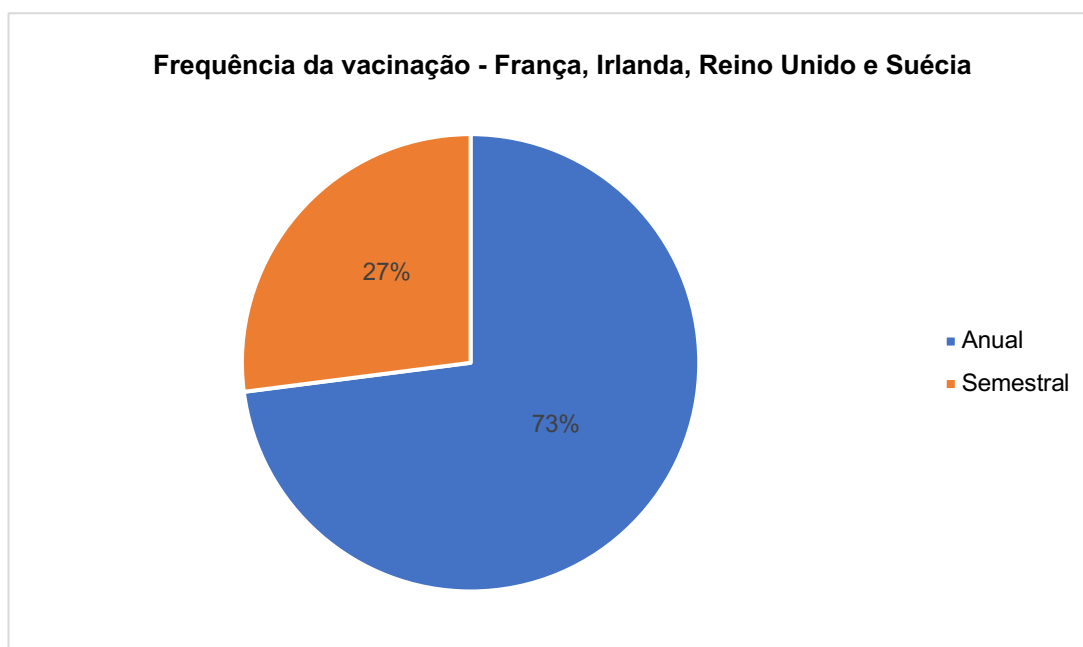


Gráfico 18. Frequência da vacinação contra a Influenza Equina (IE) na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

3.3.9. Questão 9 - Utilização de testes laboratoriais de IE nos últimos dois anos

A maioria dos Médicos Veterinários em Portugal (47/50) declarou que não utilizou testes de laboratório para despiste ou confirmação das suas suspeitas de IE nos anos de 2018 e 2019 (Gráfico 19).

Relativamente aos profissionais de outros países, a maioria (24/37) declarou que utilizou testes laboratoriais para despiste ou confirmação das suas suspeitas de IE em 2018 e 2019 (Gráfico 20).

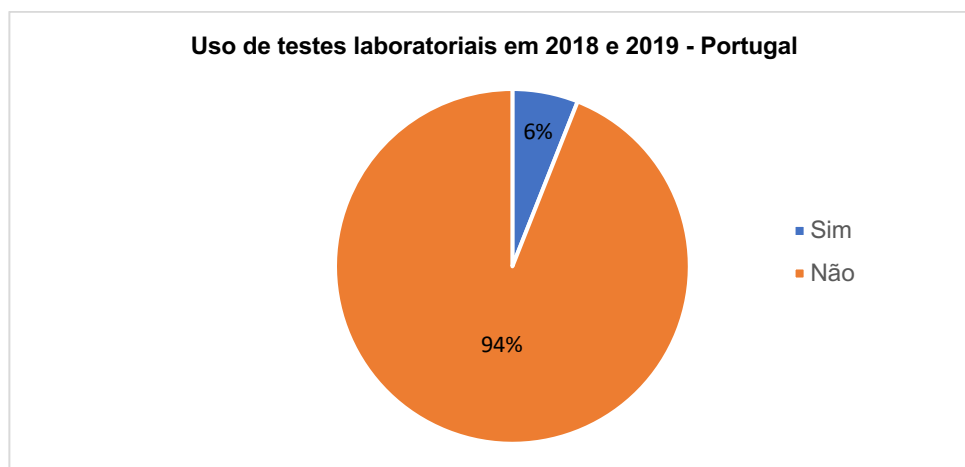


Gráfico 19. Uso de testes laboratoriais para o diagnóstico de Influenza Equina (IE) em Portugal, em 2018 e 2019.

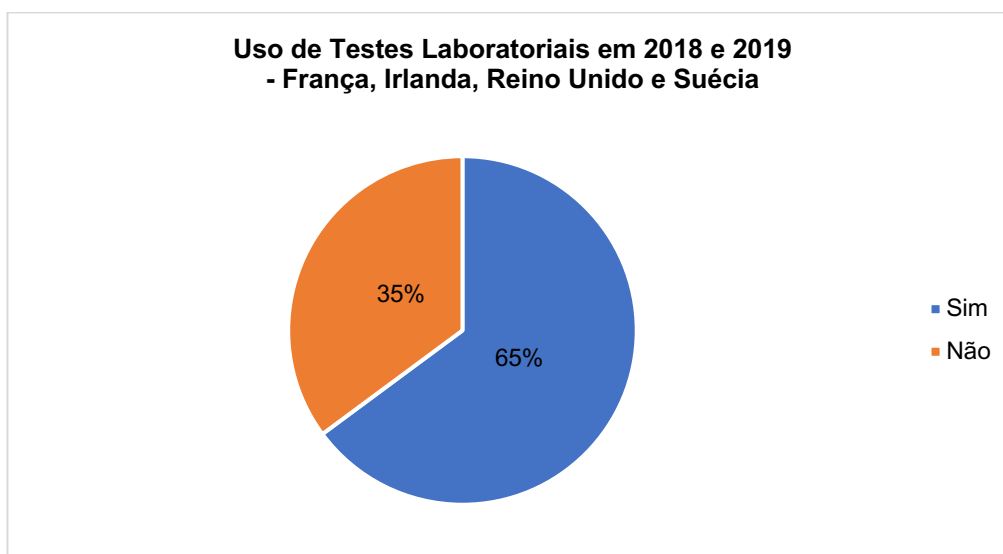


Gráfico 20. Uso de testes laboratoriais para o diagnóstico de Influenza Equina (IE) na França, Irlanda, Reino Unido e Suécia, em 2018 e 2019.

IV. DISCUSSÃO

A IE é uma doença altamente infecciosa que afeta o aparelho respiratório dos equinos, com elevado impacto económico (Glass *et al.*, 2002; Arthur & Suan, 2011). O constante contacto do Homem com os animais, e entre animais, é um fator predisponente para a disseminação da doença, sendo considerada um importante problema de Saúde Pública. Este estudo pretendeu dar a conhecer as práticas dos Médicos Veterinários em Portugal relativamente à IE e compará-las com as de outros Estados Membros, dando a conhecer alternativas que poderão ser uma mais valia no futuro.

Embora tenham sido solicitados dados à DGAV sobre o número de equinos registados em Portugal, o número de vacinas vendidas para a IE e o número de casos de IE registados em Portugal nos anos de 2018 e 2019, apenas foram cedidos dados relativos às vacinas autorizadas e comercializadas. A falha no fornecimento dos dados solicitados para a realização deste estudo por parte da DGAV, sugere a inexistência de uma base de dados com o historial epidemiológico da doença em Portugal ou a evolução do vírus desde 1996, aquando da última informação transmitida à OIE. A falha de transmissão de informação entre entidades é visível em diversos países e associações, como são exemplos os casos declarados pela Suécia quando comparados com os dados provenientes da AHT, e a ausência de contabilização de casos na Irlanda, contando apenas as instalações onde ocorreram os casos e não o número de animais infetados. Esta falha na transmissão da informação poderá ocorrer devido a questões políticas, não demonstrando falta de interesse na análise da doença.

O estudo teve uma boa aceitação por parte dos Médicos Veterinários e Associações de Médicos Veterinários de equinos em Portugal, no Reino Unido e na Irlanda. Na Irlanda, o *Equine Interest Group of Veterinary Ireland* demonstrou um especial interesse no estudo, tendo apoiado e promovido a divulgação do inquérito através do *VetAlert* e do *Veterinary Ireland Journal*. Este interesse foi ainda manifestado através do pedido de realização de um relatório individual específico com os resultados obtidos no estudo relativos à Irlanda, o qual pode ser encontrado no Anexo III. As entidades contactadas na Alemanha, França, Itália e Países Baixos não responderam ao convite para participação no estudo, enquanto a *Sveriges Veterinarförbund* (Suécia) rejeitou a divulgação dos inquéritos. Os dados fornecidos por esta instituição não responderam às questões colocadas, o que impediu a inclusão da Suécia na análise comparativa. Apesar da ausência de resposta ao convite, foram obtidas respostas ao questionário de França e da Suécia.

Os Médicos Veterinários em que responderam ao questionário em Portugal consultam maioritariamente equinos com aptidão de desporto, enquanto que os profissionais

dos outros países consultam principalmente equinos de lazer. Em Portugal e nos restantes estados membros incluídos no estudo, os Veterinários com atividade mais direcionada para equinos de reprodução encontravam-se em menor percentagem. Porém, quando observados os valores correspondentes a cavalos de corrida, nenhum Médico Veterinário em Portugal indicou que a sua atividade clínica recaísse sobre animais com esta aptidão, em contrapartida 11% dos profissionais dos restantes estados membros indicaram que a sua atividade profissional recaía sobre estes animais. Esta situação era previsível, visto que as corridas de cavalos noutros países apresentam uma maior visibilidade, existindo associações e entidades que se destinam a regular esta atividade, com elevada importância económica.

Avaliando os casos suspeitos, podemos afirmar que os Médicos Veterinários em Portugal suspeitaram de menos casos, quando comparados com os profissionais dos restantes países europeus incluídos no estudo. Observou-se que apenas um Médico Veterinário português suspeitou de mais de 50 casos nos últimos dois anos, enquanto que dois profissionais dos restantes países suspeitaram de mais de 50 casos e 1 profissional suspeitou de 21 a 50 casos.

Em Portugal, apenas um Médico Veterinário identificou quatro casos de IE com recurso a testes laboratoriais nos últimos dois anos. Relativamente aos outros países, onde a declaração da doença é obrigatória, foram identificados 60 casos de IE com recurso a testes laboratoriais. Os dados fornecidos pelo INIAV, laboratório de referência, indicaram que neste laboratório apenas foram diagnosticados dois casos de IE nos últimos anos, de entre os 13 testes que foram realizados entre 2018 e 2019. Analisando a situação em Portugal, podemos observar que o enquadramento regulamentar nacional permite que os casos de IE passem despercebidos, já que muitos dos casos suspeitos não são investigados através da realização de testes laboratoriais que permitem a confirmação da doença e a caracterização do vírus. Apesar da clara definição por parte da OIE da IE como uma doença de declaração obrigatória, esta obrigatoriedade não foi transposta para o sistema regulamentar português. O decreto-lei onde constam as doenças de declaração obrigatória nacional está incompleto e este facto deverá também contribuir para que os Médicos Veterinários em Portugal realizem menos testes de confirmação de diagnóstico da doença, quando comparados com os Médicos Veterinários dos outros países incluídos no estudo. Não sendo uma doença de declaração obrigatória segundo a lei portuguesa e o INIAV, a informação relativa aos casos positivos é apenas transmitida aos veterinários que solicitaram as análises (DGAV, 2019; INIAV, 2019; OIE, 2020a; OIE, 2020b). Os testes de diagnóstico para o despiste da IE na Irlanda são gratuitos, sendo suportados pelo Departamento da Agricultura, Alimentação e Marinha (IEC, 2020).

O estudo aprofundado da prática vacinal contra a IE e a utilização dos testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico da doença representam uma mais valia para cada um dos países considerados. A proteção dos animais através da prática vacinal, para além de ter como objetivo aumentar o rendimento, diminuir o número de mortes dos animais e melhorar o seu bem-estar, é fundamental para evitar que no futuro ocorra uma pandemia causada pelo VI que afete equinos, humanos e outras espécies. Como foi descrito anteriormente as mutações e alterações que o vírus sofre são constantes e a virulência da nova estirpe é imprevisível (Radostits *et al.*, 2003; Legrand *et al.*, 2013). Os dados recolhidos em Portugal indicaram que os Médicos Veterinários administraram menos vacinas em 2019 quando comparado com o ano de 2018. Estes dados estão de acordo com os dados fornecidos pela DGAV, que demonstram a existência de um decréscimo na venda de vacinas no ano de 2019, face ao ano anterior. Nos restantes estados membros, o número de vacinas administradas em 2019 aumentou, comparativamente ao ano de 2018.

A nível de utilização do protocolo vacinal, observou-se que as associações em França, Irlanda, Reino Unido e Suécia tendem a seguir normas semelhantes para um melhor controlo e prevenção da doença, preparando com antecedência as mudanças anuais, como é o caso da publicação feita pela IHRB onde são descritas as alterações a implementar (IHRB, 2020). Na Irlanda existem diversos protocolos vacinais para a IE, como o da FEI, Thoroughbred Sales, Tattersalls e a Irish Horseracing Regulatory Board (IHRB). Apesar de apresentarem algumas diferenças, os protocolos vacinais recomendados por estas entidades são muito semelhantes. No site da IHRB podem ser encontradas as recomendações para o ano de 2021, relativamente à alteração dos intervalos de primovacinação (IHRB, 2020; Tattersalls, 2020; Thoroughbred Sales, 2020). Considera-se relevante referir que a Alemanha, França, Irlanda, Itália, Países Nórdicos e Reino Unido pertencem ao Comité Europeu de Ligação Científica de Corrida de Cavalos, que tem como objetivo assegurar a concordância dos protocolos para a vacinação contra a IE nos diferentes países (IHRB, 2020).

A utilização de protocolos anuais ou semestrais não implica um maior risco, devendo ser utilizado consoante as atividades dos equinos e as suas deslocações. De um modo geral, recomenda-se a vacinação a cada seis meses para que os anticorpos desenvolvidos pelas vacinas se encontrem em valores considerados protetores. A vacinação anual é melhor quando comparada com a não vacinação ou a utilização de apenas primovacinação, quando esta é usada. Observando os dados podemos afirmar que 10% dos Médicos Veterinários portugueses não seguem o protocolo vacinal recomendado pela FEP/FEI, sendo um dos aspetos a melhorar a nível nacional e que deve ser analisado pelas entidades competentes. Nos restantes países, apenas 3% dos profissionais não usa o protocolo vacinal recomendado pela FEI ou entidade reguladora do país.

Os Médicos Veterinários portugueses que participaram no estudo não demonstraram preferência entre a utilização de protocolos vacinais anuais ou semestrais. Em contrapartida, os profissionais dos restantes países apresentaram preferência pela utilização de protocolos vacinais anuais.

Analisando os dados do estudo em detalhe, observámos que o número de Médicos Veterinários que recorreu ao uso dos testes laboratoriais não corresponde ao mesmo número de profissionais com suspeita de mais de cinco casos de doença nos dois últimos anos. Apenas três dos 50 profissionais (6%) que participaram no estudo em Portugal recorreram ao uso de testes laboratoriais. Este valor foi mais elevado nos outros Estados Membros (França, Irlanda, Reino Unido e Suécia), sendo que 65% dos profissionais recorreram ao uso de testes laboratoriais. Esta diferença pode ser justificada pelo facto da declaração da doença ser obrigatória nestes países, o que está de acordo com as diretrizes da OIE.

Na reunião anual entre a ESP e a OIE no âmbito do conceito *One Health*, são analisadas as alterações no código genético do VIE, são registadas as transmissões entre espécies, e são escolhidas as melhores estirpes a serem usadas nas vacinas para combater o vírus. Com este intuito, existe uma constante caracterização do vírus em alguns países, como por exemplo a Irlanda e o Reino Unido. No entanto, noutros países não existe uma prática tão robusta na caracterização das estirpes. Poder-se-á considerar que Portugal está inserido neste último grupo (Cullinane *et al.*, 2010). Uma vez que os programas de vigilância continuam a ser a melhor forma para manter as vacinas atualizadas e são o método mais eficaz de prevenção e controlo da doença, devem ser disponibilizados fundos suficientes para o controlo e identificação do vírus, a fim de permitir a obtenção de vacinas mais atualizadas, contando também com a participação ativa dos veterinários (Elton & Cullinane, 2013; Gildea *et al.*, 2012). Alguns autores apontam a existência de falhas no programa anual de vigilância da WHO e OIE aplicado nos diferentes países membros, este apresenta falhas devido à discrepância com que os médicos veterinários o aplicam na sua atividade (Cullinane *et al.*, 2010).

O estudo desenvolvido pode ser melhorado, nomeadamente no que se refere à sua divulgação a nível internacional. A atitude dos Médicos Veterinários em Portugal face ao estudo realizado merece ser elogiada, devido à disponibilidade demonstrada para a partilha de dados relativos à sua prática clínica. Os Médicos Veterinários na Irlanda, por seu lado, merecem também uma referência de apreço, já que apesar de o pedido para divulgação do estudo ter sido feito muito antes da data de lançamento do mesmo na Irlanda, a sua divulgação coincidiu com a rápida progressão da COVID-19 a nível internacional e no espaço Europeu em particular. Apesar deste facto e de os Médicos Veterinários na Irlanda terem um

papel fundamental nas comunidades locais em situações de crise de saúde pública, estes dispuseram do seu tempo para participarem no estudo no momento em que a Irlanda se encontrava no meio de uma pandemia. O estudo podia ser melhorado se o prazo de resposta fosse prolongado com o objetivo de aumentar a taxa de resposta, permitindo uma análise mais robusta. Esperava-se uma resposta mais assertiva por parte da DGAV, principalmente tendo em conta os inúmeros contatos feitos a nível institucional entre a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia e a DGAV.

V. CONCLUSÃO

A IE é uma doença respiratória infecciosa aguda, provocada pelo VI do género A. O VIE habitualmente causa uma inflamação no trato respiratório superior e inferior, sendo comum causar lesões nos pulmões de cavalos adultos e em poldros pode mesmo causar uma pneumonia grave, que por vezes é fatal (Britton & Robinson, 2002; Gross *et al.*, 2004; Peek *et al.*, 2004).

O VI é considerado um agente altamente contagioso, responsável por surtos de doença respiratória em cavalos em muitos países, com altas taxas de transmissão também entre outras espécies (Law, 1874; Sovinova *et al.*, 1958; van Maanen & Cullinane, 2002; Myers & Wilson, 2006). Os VI género A sofrem alterações através da mutação, recombinação e rearranjo do seu material genético, desafiando constantemente o sistema imunitário do hospedeiro (Webster *et al.*, 1992; Mehle *et al.*, 2012).

A OIE inclui a IE na lista internacional de doenças de declaração obrigatória. A prática vacinal contra a IE constitui um importante instrumento de prevenção e controlo da doença. As estirpes recomendadas para o uso nas vacinas são previamente homologadas pela OIE, com base na avaliação e revisão pelo ESP dos dados disponibilizados através do estudo das estirpes virais que surgem. Este trabalho de vigilância permite decidir sobre a necessidade de atualização da estirpe a utilizar, no caso de a estirpe em vigor não conferir uma imunização adequada (Cullinane *et al.*, 2010). A falha de transmissão de informações entre instituições representa um risco para o conceito *One Health*.

A utilização de testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico tem uma importância primordial no estudo das estirpes virais circulantes num determinado período de tempo, influenciando a OIE sobre as estirpes a homologar para a prática vacinal. Os dados do estudo qualitativo comparativo realizado levam a concluir que em Portugal existe alguma adesão à vacinação e à utilização de testes laboratoriais para o diagnóstico da IE, embora esta seja baixa quando comparada com outros países europeus.

Pelo estudo da regulamentação nacional aplicável conclui-se que a obrigatoriedade de declaração internacional da doença não foi transposta para a legislação nacional. Esta doença merece uma maior atenção por parte das autoridades de saúde e por parte dos Médicos Veterinários, existindo uma franca oportunidade para melhorar a prevenção e o combate da doença, como por exemplo através do aumento do número de casos suspeitos da doença, do uso de testes laboratoriais para confirmação do diagnóstico da IE, da utilização de protocolos vacinais segundo as entidades reguladoras e da declaração da doença junto da OIE.

Existe assim um conjunto de medidas a tomar em Portugal para a melhor gestão da doença.

Organizações governamentais e autoridades de saúde

- Transposição para a legislação nacional do estipulado pela OIE no que se refere à declaração obrigatória internacional da IE.
- Criação de um programa de vigilância e de recolha de dados da IE em constante atualização. Este método de vigilância deve ser realizado em formato digital e disponibilizado *online* para que Investigadores e Médicos Veterinários possam aceder aos dados e fornecer informações relativas à sua prática clínica (de forma anónima para garantir a proteção de dados). Este programa deverá permitir a análise do impacto económico direto e/ou indireto da IE.
- Criação de um fundo de suporte para a doença e a sua investigação ou estudo.

Organizações profissionais

- Elaboração de um guia de atuação por parte da Ordem dos Médicos Veterinários com linhas de orientação para a implementação de boas práticas no estudo dos casos, confirmação do diagnóstico através de testes laboratoriais, tratamento e protocolo de vacinação.
- Desenvolvimento de um programa de sensibilização e formação de profissionais de saúde para a efetiva implementação do guia de atuação com reforço positivo e reconhecimento de todos aqueles que cumpram o programa de formação e evidenciem a adoção das boas práticas na sua atividade clínica.
- Desenvolvimento de um programa de aconselhamento a proprietários de cavalos, e proprietários e gestores de explorações de cavalos e centros hípicas, de forma a promover a prática vacinal para o controlo preventivo da doença, aconselhar no desenho das instalações para a melhor gestão da doença em caso da sua ocorrência e na divulgação das normas de atuação por parte de todos os intervenientes habituais nas instalações. Incluir o reforço positivo e reconhecimento de todos os que adotarem as recomendações.

Médicos Veterinários

- Implementar a prática vacinal contra a IE na sua atividade clínica.
- Confirmar a suspeita de IE através da realização de testes laboratoriais, com estudo da estirpe infetante.

Como consideração final, será relevante referir que o controlo da IE tem uma importância acrescida em caso de risco de saúde pública, como o que se vive atualmente, relativo à pandemia por infeção por SARS-COV-2, COVID-19, já que a possível transmissão interespécies do VIE ao Homem poderá resultar no subsequente desenvolvimento de infeção respiratória viral, aumentando o risco de desenvolvimento de doença grave concomitante. Esta poderá ser matéria de estudo para o futuro, caso seja possível a recolha dos dados necessários.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aeschbacher, S., Santschi, E., Gerber, V., Stalder, H.P., & Zanoni, R.G. (2015). Development of a real-time RT-PCR for detection of equine influenza virus. *Schweiz Arch Tierheilkd* 157:191-201.
- Alvarez, A.C., Brunck, M.E., Boyd, V., Lai, R., Virtue, E., Chen, W., & *et al.* (2008). A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus. *Viol J* 5:77.
- Anon, (2010). Expert Surveillance Panel of Equine Influenza Vaccines-Conclusions and Recommendations. *OIE Bulletin* 44-45.
- Aoyama, T., Nobusawa, E., & Kato, H. (1991). Comparison of complete amino acid sequences among 13 serotypes of Hemagglutinins and receptor-binding properties of influenza A viruses indirect immunofluorescence. *Virology* 182.
- Arthur, R.J., & Suann, C.J. (2011). Biosecurity and vaccination strategies to minimise the effect of an equine influenza outbreak on racing and breeding. *Australian Vet J.* 89:109-112.
- Back, H., Berndtsson, L.T., Gröndahl, G., Ståhl, K., Pringle, J. & Zohari, S. (2016). The first reported Florida clade 1 virus in the Nordic countries, isolated from a Swedish outbreak of equine influenza in 2011. *Vet Microbiol.* 184, 1-6.
- Bailey, E.S., Choi, J.Y., Fieldhouse, J.K., Borkenhagen, L.K., Zemke, J., Zhang, D., & *et al.* (2018). The continual threat of influenza virus infections at the human-animal interface. *Evol Med Pub Health* 192-198.
- Balasuriya, U.B., Lee, P.Y., Tiwari, A., Skillman, A., Nam, B., Chambers, T.M., & *et al.* (2014). Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POCKITTM nucleic acid analyzer. *J Virol Methods* 207:66-72.
- Barbic, L., Madic, J., Turk, N., & Daly, J. (2009). Vaccine failure caused an outbreak of equine in Croatia. *Vet Microbiol* 133:164-171.
- Bengtsson, K.L. (2013). Matrix M adjuvant technology, in *Novel Immune Potentiators and Delivery Technologies for Next Generation Vaccines*. Boston, 309-320.
- Bernardino, P.N., Mapes, S.M., Corbin, R. & Pusterla, N. (2016). Pyrosequencing as a fast and reliable tool to determine clade affiliation for equine influenza A virus. *J Vet Diagn Invest* 28:323-326.

- Bogdan, J.R., Morley, P.S, Townsend, H.G.G & Haines, D.M. (1993). Effect of Influenza A/equine/H3N8 Virus Isolate Variation on the Measurement of Equine Antibody Responses. *Can J Vet Res* 57:126-130.
- Borkenhagen L.K., Salman, M.D., Mai-Juan, M., & Gray, G.C. (2019). Animal Influenza Virus Infections in Humans: A Commentary. *International Journal of Infectious Diseases* p.13.
- Boukharta, M., Azlmat, S., Elharrak, M., & Ennaji, M.M. (2015). Multiple alignment comparison of the non-structural genes of three strains of equine influenza viruses (H3N8) isolated in Morocco. *BMC Res Notes* 8:471.
- Brister, H., Barnum, S.M., Reedy, S., Chambers, T.M., & Pusterla, N. (2019). Validation of two multiplex real-time PCR assays based on single nucleotide polymorphisms of the HA1 gene of equine influenza A virus in order to differentiate between clade 1 and clade 2 Florida sublineage isolates. *J Vet Diagn Invest* 31:137-141.
- Britton, A.P., & Robinson, J.H. (2002) Isolation of influenza A virus from a 7-day-old foal with bronchointerstitial pneumonia. *Can Vet J* 43:55-56
- Bryant, N.A., Rash, A.S., Russell, C.A., Ross, J., Cooke, A., Bowman, S., & *et al.* (2009). Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet Microbiol* 138:41-52.
- Bryant, N.A., Rash, A.S., Woodward, A.L., Medcalf, E., Helwegen, M., Wohlfender, F., & *et al.* (2011). Isolation and characterization of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009. *Vet Microbiol* 147:19-27.
- Burnouf, T., Griffiths, E., Padilla, A., Seddik, S., Stephano, M.A., & Gutierrez, J.M. (2004). Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals* 32:115-128.
- Centers for Diseases Control and Prevention (2019). About Flu. Acedido a 18 de Dezembro 2019 <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
- Centers for Diseases Control and Prevention (2020) Images of Influenza Viruses. Acedido a 10 de Janeiro 2020 em <https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/images.htm>.
- Centers for Diseases Control and Prevention (2020). Seasonal Influenza (Flu). Acedido em 18 de Janeiro 2020 em <https://www.cdc.gov/flu/about/keyfacts.htm>.
- Chambers, T.M. (2014). A brief introduction to equine influenza and equine influenzas viruses, in *Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology*. New York, pp 365-370.

- Chambers, T.M., Holland, R.E., & Lai, A.C.K. (1995). Equine influenza-current veterinary perspectives, part 2. *Equine Pract.* 17, 26-30.
- Chambers, T.M., Holland, R.E., Tudor, L.R., Townsend, H.G.G., Cook, A., Bogdan, J., & *et al.* (2001). A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge. *Equine Vet J* 33:630-636.
- Chambers, T.M., & Reedy, S.E. (2014a). Equine influenza diagnosis: sample collection and transport. *Methods Mol Biol* 1161:371-377.
- Chambers, T.M., & Reedy, S.E. (2014b). Equine Influenza serological methods. *Methods Mol Biol* 1161:411-422.
- Chambers, T.M., Shortridge, K.F., Li, P.H., Powell, D.G., & Watkins, K.L. (1994). Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen Flu-A enzyme immunoassay. *Vet Rec.* 135:275-279.
- Collins, P.J., Vachieri, S.G., Haire, L.F., Ogrodowicz, R.W., Martin, S.R., Walker, P.A., *et al.* (2014). Recent evolution of equine influenza and the origin of canine influenza. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 111:11175-11180.
- Couch, R.B., Douglas, R.G., Rossen, R., & Kasel, J. (1969). Role of secretory antibody in influenza, in *The Secretory Immune System*. Washington 93-112.
- Cowled, B., Ward, M.P., Hamilton, S., and Garner, G. (2009). The equine influenza epidemic in Australia: Spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic. *Prev. Vet. Med.* 92, 60–70.
- Crawford, P.C., Dubovi, E.J., Castleman, W.L., Stephenson, I., Gibbs, E.P.J., Chen, L., *et al.* (2005) Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs. *Science* 310, 482. DOI: 10.1126/science.1117950.
- Crispe, E., Finlaison, D.S., Hurt, A.C., & Kirkland, P.D. (2011). Infection of dogs with equine influenza virus: evidence for transmission from horses during the Australian outbreak. *Aust Vet J* 89:27-28.
- Crosby, A.W. (2003). America's forgotten pandemic: the influenza of 1918. *Cambridge University Press*.
- Crouch, C.F., Daly, J., Henley, W., Hannant, D., Wilkins, J., & Francis, M.J. (2005). The use of a systemic prime/mucosal boost strategy with an equine influenza ISCOM vaccine to induce protective immunity in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 108:345-355.

- Cullinane, A., Elton, D., & Mumford, J. (2010). Equine influenza surveillance and control. *Influenza Other Respir Viruses* 4:339-344.
- Cullinane, A., Gildea, S. And Weldon (2014). Comparison of primary vaccination regimes for equine influenza: working towards an evidence-based regime. *Equine Vet. J.* 46.
- Cullinane, A., & Newton, J.R. (2013). Equine influenza-a global perspective. *Vet Microbiol* 167:205-214.
- Cullinane, A., Weld, J., Osborne, M., Nelly, M., McBride, C., & Walsh, C. (2001). Field Studies on Equine Influenza Vaccination Regimes in Thoroughbred Foals and Yearlings. *Vet J* 161:174-185. DOI: 10.1053/tvjl.2000.0546.
- Daly, J.M., Blunden, A.S., Macrae, S., Miller, J., Bowman, S.J., Kolodziejek, J., & et al. (2008). Transmission of equine influenza virus to English foxhounds. *Emerg Infect Dis* 14:461-464.
- Daly, J.M., Lai, A.C., Binns, M.M., Chambers, T.M., Barrandeguy, M., & Mumford, J.A. (1996). Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J Gen Virol* 77:661-671.
- Daly, J.M., MacRae, S., Newton, J.R., Watrang, E., & Elton, D.M. (2011). Equine influenza: a review of an unpredictable virus. *Vet J* 189:7-14.
- Daly, J.M., & Murcia, P.R., (2018). Strategic implementation of vaccines for control of equine influenza. *Equine Vet J* 50.
- Daly, J.M., Newton, J.R., & Mumford, J.A. (2004). Current perspectives on control of equine influenza. *Vet Res* 35:411-423.
- Daly, J.M., Newton, J.R., Wood, J.L.N., & Park, A.W. (2013). What can mathematical models bring to the control of equine influenza? *Equine Vet J* 45.
- Damiani, A.M., Scicluna, M.T., Ciabatti, I., Cardeti, G., Sala, M., Vulcano, G., & et al. (2008). Genetic characterization of equine influenza viruses isolated in Italy between 1999 and 2005. *Virus Res* 131:100-105.
- de Souza, C.M. (2008). The Spanish flu epidemic: a challenge to Bahian medicine. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 15:945-972.
- Dilali, M., Piro, M., Harrak, M.E., Fourgerolle, S., Dehhaoui, M., Dikrallah, A., & et al. (2018). Impact of Mixed Equine Influenza Vaccination on Correlate of Protection in Horses. *Vaccines* 6:71.
- Direção Geral de Agricultura e Veterinária (2019). Dados cedidos a 04 de Outubro 2019 por o Dr. João Pedro Silva, através de e-mail.

Direção Geral de Agricultura e Veterinária (2020a). Lista de Doenças Declaração Obrigatória (DDO). Acedido em 18 de Janeiro 2020 em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=19316&cboui=19316>.

Direção Geral de Agricultura e Veterinária (2020b). Resumo das características do medicamento. Acedido a 23 de Fevereiro 2020 em <http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/2732>.

Easterday, B.C., Hinshaw, V.S., & Halvorson, D.A. (1997). Influenza, in *Diseases of Poultry*, 10th. London, 583-605.

El-Hage, C.M., Savage, C.J., Minke, J.M., Ficorilli, N.P., Watson, J., & Gilkerson, J.R. (2013). Accelerated vaccination schedule provides protective levels of antibody and complete herd immunity to equine influenza. *Equine Vet. J.* 45.

Elton, D., & Bryant, N. (2011). Facing the threat of equine influenza. *Equine Vet J* 43:250-258.

Elton, D., Bruce, E.A., Bryant, N., Wise, H.M., MacRae, S., Rash, A., & *et al.* (2013). The genetics of virus particle shape in equine influenza A virus. *Influenza Other Resp Virus* 7:81-89.

Elton, D., & Cullinane, A. (2013). Equine influenza: antigenic drift and implications for vaccines. *Equine Vet J* 45:768-769.

EMA (2020a). Equilis Prequenza Te. Acedido em 23 de Fevereiro 2020 em <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/equilis-prequenza-te#overview-section>.

EMA (2020b). Anexo I: Resumo das características do medicamento. Acedido a 23 de Fevereiro 2020 em https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/equilis-prequenza-epar-product-information_pt.pdf.

EMA (2020c). Anexo I: Resumo das características do medicamento. Acedido em 23 de Fevereiro 2020 em https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/equilis-prequenza-te-epar-product-information_en.pdf.

EMA (2020d). Anexo I: Resumo das características do medicamento. Acedido em 23 de Fevereiro 2020 em https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/proteqflu-te-epar-product-information_pt.pdf.

EMA (2020e). Proteq-Flu, in *How does ProteqFlu work?* Acedido em 23 de Fevereiro 2020 em <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/proteqflu>.

- Ensink, J.M., Klein, W.R., Barneveld, A., Vulto, A.G., & van Miert, A.S.J.P.A.M. (1996). Clinical efficacy of ampicillin, pivampicillin and procaine penicillin G in a soft tissue infection model in ponies. *J Vet Pharmacol Therap.* 19:445-453.
- Ensink, J.M., Smit, J.A.H., & van Duijkeren, E. (2003). Clinical efficacy of trimethoprim/sulfadiazine and procaine penicillin G in a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection model in ponies. *J Vet Pharmacol Therap* 26:247-252.
- Equineflunet (2020). Analysis-Global. Acedido a 20 de Abril 2020 em <https://app.jshiny.com/jdata/equiflunet/equiflunet/>.
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations Secretariat of the Pacific. Community. AHP Disease Manual. Acedido em 14 de Dezembro de 2019 em http://lrd.spc.int/ext/Disease_Manual_Final/b206__equine_influenza.html.
- Feng, K.H., Gonzalez, G., Deng, L., Yu, H., Tse, V.L., Huang, L., & et al. (2015). Equine and canine influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence. *J Virol* 89:6860-6873.
- Feng, K.H., Sun, M., Iketani, S., Holmes, E.C., & Parrish, C.R. (2016). Comparing the functions of equine and canine influenza H3N8 virus PA-X proteins: suppression of reporter gene expression and modulation of global host gene expression. *Virology* 496:138-146.
- Ferguson, L., Olivier, A.K., Genova, S., Epperson, W., Simth, D.R., Scheider, L., & et al. (2016). Pathogenesis of influenza D virus in cattle. *J Virol* 90:5636-5642.
- Flint, J., Racaniello, V.R., Rall, G.F., Skalka, A.M., & Enquist, L.W. (2015). Structure, Genome Organization and Infectious Cycles. In ASM Press (Ed.), *Principles of Virology* (4thEd., Volume I) Washington, DC.
- Galvin, P., Gildea, S., Arkins, S., Wash, C., & Cullinane, A. (2013). The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). *Influenza Other Resp Viruses* 7:73-80.
- Galvin, P., Gildea, S., Nelly, M., Quinlivan, M., Arkins, S., Walsh, C., & et al. (2014). The evaluation of three diagnostic tests for detection of equine influenza nucleoprotein in nasal swabs. *Influenza Other Respir Viruses* 8:376-383.
- Gamoh, K., & Nakamura, S. (2017). Update of inactivated equine influenza vaccine strain in Japan. *J Vet Med Sci* 79:649-653.
- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P.L., Bragazzi, N.L., & Panatto, D. (2014a). Compounds with anti-influenza activity: present past and future of strategies for optimal treatment and

management of influenza. Part I: Influenza life-cycle and currently available drugs. *J Prev Med Hyg* 55:69-85.

Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P.L., Bragazzi, N.L., & Panatto, D. (2014b). Compounds with anti-influenza activity: present past and future of strategies for optimal treatment and management of influenza. Part II: Future compounds against influenza virus. *J Prev Med Hyg* 55:109-129.

Gibbs, E.P., & Anderson, T.C. (2010). Equine and canine influenza: a review of current events. *Anim Health Res Rev* 11:43-51.

Gildea, S., Arkins, S., & Cullinane, A. (2010). A comparative antibody study of the potential susceptibility of thoroughbred and non-thoroughbred horse populations in Ireland to equine influenza virus. *Influenza Other Respir Viruses* 4:363-372.

Gildea, S., Arkins, S., & Cullinane, A. (2011). Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007-2010. *Equine Vet J* 43:608-617.

Gildea, S., Fitzpatrick, D.A., & Cullinane, A. (2013). Epidemiological and virologic investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010-2012). *Influenza Other Respir Viruses* 4:61-72.

Gildea, S., Quinlivan, M., Arkins, S., & Cullinane, A. (2012). The molecular epidemiology of equine influenza in Ireland from 2007 to 2010 and its international significance. *Equine Vet J* 44:387-392.

Gildea, S., Higgins, M.J.S., Johnson, G., Walsh, C., & Cullinane, A. (2016). Concurrent vaccination against equine influenza and equine herpes virus-a practical approach. *Influenza Other Respir Viruses* 10:433-437.

Gintrac, H. (1872). "Grippe", in *Nouveau dictionnaire de médecine et de chirurgie pratiques*. Tome 16, 728-753.

Glass, K., Wood, J.L.N., Mumford, J.A., Jessett, D., & Grenfell, B.T. (2002). Modelling equine influenza 1: a stochastic model of within-yard epidemics. *Epidemiol Infect* 128:491-502.

Gora, I.M., Kwasnik, M., Zmudzinski, J.F., & Rozek, W. (2017). Chorioallantoic membranes of embryonated chicken eggs as an alternative system for isolation of equine influenza virus. *Virology* 14:120.

Gross, D.K., Hinchcliff, K.W., French, P.S., Goclan, S.A., Lahmers, K.K., Lauderdale, M., & et al. (1998). Effect of moderate exercise on the severity of clinical signs associated with influenza virus infection in horses. *Eq Vet J* 30:489-497.

- Gross, D.K., Morley, P.S., Hinchcliff, K.W., Reichle, J.K., & Slemons, R. D. (2004). Pulmonary Ultrasonographic Abnormalities Associated with Naturally Occurring Equine Influenza Virus Infection in Standardbred Racehorses. *J Vet Intern Med* 18:718-727.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, G., & Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89:2359-2376.
- Hannant, D., Jessett, D.M., O'Neil, T., & Mumford, J.A. (1989). Antibody isotype responses in the serum and respiratory tract to primary and secondary infections with equine influenza virus (H3N8). *Vet Microbiol.* 19:293-303.
- Hannant, D., Mumford, J.A., & Jessett D.M. (1988). Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus. *Vet Rec* 122:125-128.
- Hause, B.M., Ducatez, M., Collin, E.A., & *et al.* (2013). Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathogens* 9:1-11.
- Hay, A.J, Gregory, V., Douglas, A.R., & Lin, Y.P. (2001). The evolution of human influenza viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356.
- Heldens, J. G. M., Kersten, A. J., Weststrate, M. W., & van den Hoven, R. (2001). Vaccinology: Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpesvirus 1 and 4 combination vaccine. *Vet Quarterly* 23:210–217.
- Horspool, L.J., & King, A. (2013). Equine influenza vaccines in Europe: a view from the animal health industry. *Equine Vet J* 45:774-775.
- IEC (2020). Equine Influenza Alert. Acedido em 22 de Abril de 2020 em <http://www.irishequinecentre.ie/Content/pdf/18th%20Jan%202019%20Equine%20Influenza%20Alert1.pdf>.
- IHRB (2020). IHRB announce updated equine influenza vaccination requirements for 2020 and thereafter. Acedido em 22 de Abril de 2020 em <http://www.ihrb.ie/general-press-releases/ihrb-announce-updated-equine-influenza-vaccination-requirements-for-2020-and-thereafter>.
- Ito, T., & Kawaoka, Y. (2000). Host-range barrier of Influenza A viruses. *Vet Microbiol* 74:71-75.
- Jagger, B.W., & Digard, P. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337.

- Jakeman, K.J., Tisdale, M., Russell, S., Leone, A., & Sweet, C. (1994). Efficacy of 2'-deoxy-2'-fluororibosides against influenza A and B viruses in ferrets. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1864-1867.
- Jiao, P., Tian, G., Deng, G., Jiang, Y., Liu, C., Liu, W., & *et al.* (2008). A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol* 82:1146-1154.
- Kastner, S.B.R., Haines, D.M., Archer, J., & Townsend, H.G.G. (1999). Investigations on the ability of clenbuterol hydrochloride to reduce clinical signs and inflammation associated with equine influenza A infection. *Equine Vet J* 31:160-168.
- Kirkland, P.D., & Delbridge, G. (2011). Use of a blocking ELISA for antibodies to equine influenza virus as a test to distinguish between naturally infected and vaccinated horses: proof of concept studies. *Aust Vet J* 89:45-46.
- Kirkland, P.D., Finlaison, D.S., Crispe, E., & Hurt, A.C. (2010). Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis* 16:699-702.
- Kohn, G.C. (2007). Encyclopedia of Plague and Pestilence: From Ancient Times to the Present. *Infobase Publishing* 2007.
- Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., & *et al.*, (2018). Influenza. *Nature Reviews* 4. Acedido em 23 de Janeiro 2020 em <https://www.nature.com/articles/s41572-018-0002-y>.
- Krueger, W.S., & Gray, G.C. (2012). Swine influenza virus infections in man. *Curr Top Microbiol Immunol*. 370:201-225.
- Kumar, N., Bera, B.C., Greenbaum, B.D., Bhatia, S., Sood, R., Selvaraj, P., & *et al.* (2016). Revelation of influencing factors in overall codon usage bias of equine influenza viruses. *PLoS ONE* 11.
- Kuszevski, K., & Brydak, L. (2000). The epidemiology and history of influenza. *Biomed Pharmacoter* 54:188-195.
- Lai, A.C.K, Chambers, T.M., Holland, R.E., Morley, P.S., Haines, D.M., Townsend, H.G., & *et al.* (2001). Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in Western Hemisphere. *Arch Virol* 146:1063-1074.
- Lai, A.C.K, Rogers, K.M., Glaser, A., Tudor, L., & Chambers, T. (2004) Alternate circulation of recent equine-2 influenza viruses (H3N8) from two distinct lineages in the United States. *Virus Research* 100:159.

- Landolt, G.A. (2014). Equine influenza virus. *Vet Clin N Am Equine Pract* 30:507-522.
- Landolt, G.A., Hussey, S.B., Kreutzer, K., Quintana, A., & Lunn, D.P. (2010). Low-dose DNA vaccination into the submandibular lymph nodes in ponies. *Vet Rec* 167:302-303.
- Larson, K.R., Heil, G.L., Chambers, T.M., Capuanod, A., White, S.K., & Gray, G.C. (2015). Serological evidence of equine influenza infections among persons with horse exposure, Iowa. *J Clin Virol* 67:78-83.
- Law, J. (1874). Influenza in horses in *Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1872*, ed Commission of Agriculture. Washington DC, pp. 203-248.
- Legrand, L.J., Pitel, P.H.Y., Marcillaud-Pitel, C.J., Cuillinane, A.A., Courouc  , A.M., Fortier, G.D., & *et al.* (2013). Surveillance of equine influenza viruses through the RESPE network in France from November 2005 to October 2010. *Equine Vet J* 45:776-783.
- Lewis, N.S., Anderson, T.K., Kitikoon, P., Skepner, E., Burke, D.F., & Vicent, A.L. (2014). Substitutions near hemagglutinin receptor-binding site determine the antigenic evolution of influenza A H3N2 viruses in U.S. swine. *J Virol* 88:4752-4763.
- Lewis, N.S., Daly, J.M., Russell, C.A., Horton, D.L., Skepner, E., Bryant, N.A., & *et al.* (2011). Antigenic and genetic evolution of equine influenza A (H3N8) virus from 1968 to 2007. *J Virol* 85:12742-12749.
- Lin, C., Holland Jr, R.E., Donofrio, J.C., McCoy, M.H., Tudor, L.R., & Chambers, T.M. (2002). Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Vet Micro* 84:357-365.
- Lindstrom, S., Endo, A., Sugita, S., Pecoraro, M., Hiromoto, Y., Kamada, M., & *et al.* (1998). Phylogenetic analyses of the matrix and non-structural genes of influenza viruses. *Arch Virol* 143: 1585-1598.
- Liu, I.K., Pascoe, D.R., Chang, L.W., & Zee, Y.C. (1985). Duration of maternally derived antibodies against equine influenza in newborn foals. *Am J Vet Res* 46: 2078-2080.
- MacLachlan, N.J., & Dubovi, E.J. (2011). Orthomyxoviridae in *Fenner's Veterinary Virology* 4th ed, San Diego.
- Martella, V., Elia, G., Decaro, N., Di Trani, L., Lorusso, E., Campolo, M., & *et al.* (2007). An outbreak of equine influenza virus in vaccinated horses in Italy is due to an H3N8 strain closely related to recent North American representatives of the Florida sub-lineage. *Vet Microbiol* 121:56-63.

- Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., & Klenk, H. (2004). Neuraminidase is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J Virol* 22:12665-12667.
- Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Mizuta, K., Tsuchiya, E., Muraki, Y., Hongo, S., & *et al.* (2002). Antigenic and Genetic Characterization of Influenza C Viruses Which Caused Two Outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998. *J Clin Microbiol* 40:422-429.
- Mehle, A., Dugan, V.G., Taubenberger, J.K., Doudna, J.A. (2012). Reassortment and mutation of the avian influenza virus polymerase PA Subunit overcome species barriers. *J Virol* 86.
- Mena, I., Nelson, M.I., Quezada-Monroy, F., Dutta, J., Cortes-Fernández, R., Lara-Puente, & *et al.* (2016). Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *Elife* 5.
- Minke, J.M., Audonnet, J.C., & Fischer, L. (2004). Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res* 35:435-443 DOI: 10.1051/vetres:2004019.
- Minke, J.M., Toulemonde, C.E., Coupier, H., Guigal, P.M., Dinic, S., Sindler, T., & *et al.* (2007). Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the hemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge. *AM J Vet Res* 68:213-219.
- Morley, P.S., Townsend, H.G.G., Bogdan, J.R., & Haines, D.M. (1999). Efficacy of a commercial vaccine for preventing disease caused by influenza virus infection in horses. *J Am Vet Med Assoc* 215:61-66.
- Morley, P.S., Townsend, H.G.G., Bogdan, J.R., & Haines, D.M. (2000). Risk factors for disease associated with influenza virus infections during three epidemics in horses. *J Am Vet Med Assoc* 216: 545-550.
- Mumford, J.A. (1990). The diagnosis and control of equine influenza. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* 36:377.
- Mumford, J., Jessett, D., Rollinson, E., Hannant, D., & Draper, M. (1994). Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet Rec* 134:158-162.
- Myers, C., & Wilson, D. (2006). Equine Influenza Virus. *Clin Tech Equine Pract* 5:187-196.
- Na, W., Yeom, M., Yuk, H., Moon, H., Kang, B., & Song, D. (2016). Influenza virus vaccine for neglected hosts: Horses and dogs. *Clin Exp Vaccine Res* 5:117-124.

- Nedland, H., Wollman, J., Sreenivasan, C., Quast, M., Singrey, A., Fawcett, L., & et al. (2018). Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses Public Health* 65.
- Nelson, K.M., Schram, B.R., & McGregor, M.W. (1998). Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16:1306-1313.
- Newton, J.R., Daly, J.M., Spencer, L., & Mumford, J.A. (2006). Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. *Vet Rec* 158:185-192.
- Newton, J.R., Lakhani, K.H., Wood, J.L.N., & Baker, D.J. (2000a) Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Prev Vet Med* 46:129-141.
- Newton, J.R., Townsend, H.G.G., Wood, J.L.N., Sinclair, R., Hannant, D., & Mumford, J.A. (2000b). Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Vet J* 32:65-74.
- NOAH (2020). NOAH Compendium. Acedido em 6 de Janeiro 2020 em <http://www.noahcompendium.co.uk/?id=-457328>.
- Nyaga, P.N., Wiggins, A.D., & Priester, W.A. (1980). Epidemiology of equine influenza, risk by age, breed and sex. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 3: 67-73.
- Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Martina, B.E., Bestebroer, T.M., & Fouchier, R.A. (2000). Influenza B virus in seals. *Science* 288:1051-1053.
- Oxburgh, L., & Hagstrom, A. (1999). A PCR based method for identification of equine influenza virus from clinical samples. *Vet Microbiol* 67:161-174.
- Oxburgh, L., & Klingeborn, B. (1999). Cocirculation of Two Distinct Lineages of Equine Influenza Virus Subtype H3N8. *J Clin Micro* 37:3005-3009.
- Ozaki, H., Sugiura, T., Sugita, S., Imagawa, H., & Kida, H. (2001) Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet Micro* 82:111-119.
- Paillot, R. (2014). A systematic review of recent advances in equine influenza vaccination. *Vaccines* 2:797-831.

- Paillot, R., & El-Hage, C.M. (2016). The use of a recombinant canarypox-based equine influenza vaccine during the 2007 Australian outbreak: systematic review and summary. *Pathogens* 5:42.
- Paillot, R., Grimmett, H., Elton, D., & Daly, J.M. (2008). Protection, systemic IFN γ , and antibody responses induced by an ISCOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host. *Vet Res* 39:1.
- Paillot, R., Kydd, J.H., Sindle, T., Hannant, D., Toulemonde, C.E., Audonnet, J.C., & *et al.* (2006). Antibody and IFN-gamma responses induced by a recombinant canarypox vaccine and challenge infection with equine influenza virus. *Vet Immunol Immunopathol* 112:225-233.
- Paillot, R., Lemaitre, L., Dancer, A., Thibault, J.C., & Minke, J. (2014). Development and efficacy of the recombinant canarypox-based equine influenza (EI) vaccine updated according to the last OIE expert surveillance panel recommendations. *Equine Vet J* 46:14.
- Paillot, R., Prowse, L., Montesso, F., Huang, C.M., Barnes, H., & Escala, J. (2013). Whole inactivated equine influenza vaccine: efficacy against a representative clade 2 equine influenza virus, IFNgamma synthesis and duration of humoral immunity. *Vet Microbiol* 162:396-407.
- Palese, P., & Schulman, J.L. (1976). Mapping of the influenza virus genome: Identification of the hemagglutinin and the neuraminidase genes. *Proc Natl Acad Sci* 6:2142-2146.
- Pappas, G., Kiriaze, I.J., & Falagas, M.E. (2008). Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *Int J Infect Dis* 12:347-350.
- Paterson, D., & Fodor, E. (2012). Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathog* 8:1-8.
- Patterson-Kane, J.C., Carrick, J.B., Axon, J.E., Wilkie, I., & Beegg, A.P. (2008). Three pathology of bronchointerstitial pneumonia in young foals associated with the first outbreak of equine influenza in Australia. *Equine Vet J* 40:199-203.
- Peel, S.F., Landolt, G., Karasin, A.I., Slack, J.A., Steinberg, H., Semrad, S.D., & *et al.* (2004). Acute Respiratory Distress Syndrome and Fatal Interstitial Pneumonia Associated with Equine Influenza in a Neonatal Foal. *J Vet Intern Med* 18:132-134.
- Peek, S.F., Landolt, G., Karasin, A.I., Slack, J.A., Steinberg, H., Semrad, S.D., & *et al.* (2004). Acute Respiratory Distress Syndrome and Fatal Interstitial Pneumonia Associated with Equine Influenza in a Neonatal Foal. *J Vet Intern Med* 18:132-134.
- Perglione, C.O., Golemba, M.D., Torres, C., & Barrandeguy, M. (2016). Molecular epidemiology and spatio-temporal dynamics of the equine influenza virus in South America. *Pathogens* 5:61.

- Perkins, G.A. & Wagner, B. (2015). The development of equine immunity: current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Vet J* 47.
- Potter, C.W. (2001). A history of influenza. *J Appl Microbiol* 91:572-579.
- Powell, D.G., Watkins, K.L., Li, P.H. & Shortridge, K.F. (1995). Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992. *Vet Rec* 136:531-6.
- Presti, R.M., Zhao, G., Beatty, W.L., Mihindukulasuriya, K.A., da Rosa, A.P.A.T., Popov, V.L., & et al. (2009). Quaramfil, Johnston Atoll, and Lake Chad Viruses Are Novel Members of the *Orthomyxoviridae*. *J Virol* 22:11599-11606.
- Pusterla, N.E., Mapes, K.S., & Wademan, C. (2014). Detection of clade 2 equine influenza virus in an adult horse recently imported to the U.S.A. *Equine Vet Educ* 26:453-455.
- Radostits, O.M., Gray, C.C., Blood, D.C., & Hinchcliff, K.W. (2003). "Equine influenza" in *Veterinary Medicine, A Text Book of Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 10th Ed (New York, NY: Elsevier Saunders), 1322-1328.
- Rajao, D., Perez, D., & Vicent, A., (2018). Adaptation of human influenza viruses to swine. *Frontiers in Vet Science* 2018.
- Rash, A., Morton, R., Woodward, A., Maes, O., McCauley, J., Bryant, N., & et al. (2017). Evolution and divergence of H3N8 equine influenza viruses circulating in the United Kingdom from 2013 to 2015. *Pathogens* 6:1-16.
- Ritchey, M.B., Palese, P., & Schulman, J.L. (1976). Mapping of the Influenza Virus Genome III. Identification of Genes Coding for Nucleoprotein, Membrane Protein, and Nonstructural Protein. *J Virol* 1:307-313.
- Rivailler, P., Perry, I.A., Jang, Y., Davis, C.T., Chen, L.M., Dubovi, E.J., & et al. (2010). Evolution of canine and equine influenza (H3N8) viruses co-circulating between 2005 and 2008. *Virology* 408:71-79.
- Rodriguez, L., Reedy, S., Nogales, A., Murcia, P.R., Chambers, T.M., & Martinez-Sobrido, L. (2018). Development of a novel equine influenza virus live-attenuated vaccine. *Virology* 516:76-85.
- Rush, B., & Mair, T. (2004). "Equine Influenza" in *Equine Respiratory Diseases*, 1st Ed (Oxford, OX: Blackwell Science Ltd), 178.
- Ryan, M., Gildea, S., Walsh, C., & Cullinane, A. (2015). The impact of different equine influenza vaccine products and other factors on equine influenza antibody levels in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet. J.* 47.

- Saenz, R.A., Quinlivan, M., Elton, D., Macrae, S., Blunden, A.S., Mumford, J.A., & *et al.* (2010). Dynamics of influenza virus infection and pathology. *J Virol* 84:3974-3983.
- Scholtissek, C., Rohde, W.V., von Hoyningen, V., & Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87.
- Scocco, P., & Pedini, V. (2008). Localization of influenza virus sialoreceptors in equine respiratory tract. *Histol Histopathol* 23:973-978.
- Sjolander, A., Cox, J.C., Barr, I.G. (1998). ISCOMs: An adjuvant with multiple functions. *J Leukoc* 64:713-723.
- Smith, W., Andrewes, C.H., & Laidlaw, P.P. (1933). A virus obtained from Influenza Patients. *The Lancet* 66-68.
- Smyth, G.B., Dagley, K., & Tainsh, J. (2011). Insights into the economic consequences of the 2007 equine influenza outbreak in Australia. *Aus Vet J* 89:151-158.
- Soboll, G., Hussey, S.B., Minke, J.L., Landolt, G.A., Hunter, J.S., Jagannatha, S., & *et al.* (2010). Onset and duration of immunity to equine influenza virus resulting from canarypox-vectored (ALVAC) vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 135:100-107.
- Soema, P.C., Kompier, R., Amorij, J.P., & Kersten, G.F. (2015). Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharma Biopharm* 94:251-263.
- Solórzano, A., Foni, E., Córdoba, L., Baratelli, M., Razzuoli, E., Bilato, D., & *et al.* (2015). Cross-species infectivity of H3N8 influenza virus in an experimental infection in Swine. *J Virol* 89:11190-111202.
- Sovinova, O., Tomova, B., Pouska, F., & Nemec, J. (1958). Isolation of virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 2:52-61.
- Su, S., Wang, L., Fu, X., He, S., Hong, M., Zhou, P., & *et al.* (2014). Equine influenza A (H3N8) virus infection in cats. *Emerg Infect Dis* 20:2096-2099.
- Suarez, D.L., & Perdue, M.L. (1998). Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res* 54:59-69.
- Suzuki, Y. (2000). Receptor sialylsugar chains as determinants of host range of influenza viruses. *Nippon Rinsho* 58:2206-2210.
- Tattersalls (2020). Tattersalls Ireland September Yearling Sale 2016. Acedido a 22 de Abril 2020 em <https://www.tattersalls.ie/uploads/general/vendorinformationpack219.pdf>.

- Takahashi, T., Unuma, S., Kawagishi, S., Kurebayashi, Y., Takano, M., Yoshino, H., & et al. (2016). Substrate specificity of equine and human influenza A virus sialidase to molecular species of sialic acid. *Biol Pharm Bull* 39:1728-1733.
- Thoroughbred Sales (2020). Health Certificate. Acedido a 22 de Abril 2020 em https://www.goffs.com/GoffsCMS/MMGallery/Health_Cert.pdf.
- Timoney, P.J. (1996). Equine Influenza. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 19:205-211.
- Toulemonde, C.E., Daly, J., Sindle, T., Guigal, P.M., Audonnet, J.C., & Minke, J.M. (2005) Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 2003 outbreak in the United Kingdom. *Vet Rec* 156:367-371.
- Townsend, H.G.G., Penner, S.J., Watts, T.C., Cook, A., Bogdan, J., Haines, D.M., & et al. (2001). Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials. *Equine Vet J*. 33:637-643.
- Tu, J., Zhou, H., Jiang, T., Li, C., Zhang, A., Guo, X., & et al. (2009). Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol* 154:887-890
- Uppal, P.K., & Yadav, M.P. (1987). Outbreak of equine influenza in India. *Vet Rec* 121:569-570.
- Uppal, P.K., Yadav, M.P., & Sharma, S.N. (1987). Occurrence of equine influenza outbreaks in Indian. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 8:91-94.
- van Maanen, C., Bruin, G., de Boer-Luijtz, E., Smolders, G., & de Boer, G.F. (1992). Immune Response of Foals after vaccination against equine influenza. *Vet Quart* 14:13-17.
- van Maanen, C., & Cullinane, A. (2002). Equine influenza virus infections: An update. *Veterinary Quartely* 24:79-94. DOI: 10.1080/01652176.2002.9695127.
- van Maanen, C., van Essen, G.J., Minke, J., Daly, J.M., & Yates, P.J. (2003). Diagnostic methods applied to analysis of an outbreak of equine influenza in a riding school in which vaccine failure occurred. *Vet Microbiol* 93:291-306.
- Walia, P.R., Anderson, T.K. & Vincent, A.L. (2018). Regional patterns of genetic diversity in swine influenza A viruses in the United States from 2010 to 2016.
- Wang, L., Suarez, D.L., Patin-Jackwood, M., Mibayashi, M., García-Sastre, A., Saif, Y.M., & et al. (2008). Characterization of influenza virus variants with different sizes of the Non-structural (NS) genes and their potential as a live influenza vaccine in poultry. *Vaccine* 26:3580-3586.

- Wang, C., Wang, Q., Hu, J., Sun, H., Pu, J., Liu, J., & et al. (2017). A multiplex RT-PCR assay for detection and differentiation of avian-origin canine H3N2, equine-origin H3N8, Human-origin H3N2, and H1N1/2009 canine influenza viruses. *PLoS ONE* 12.
- Waring, J.L. (1971). A History of Medicine in South Carolina 1900-70. *South Carolina Med Ass* p.33
- Wattrang, E., Jessett, D.M., Yates, P., Fuxler, L., & Hannant, D. (2003). Experimental Infection of Ponies with Equine Influenza A2 (H3N8) Virus Strains of Different Pathogenicity Elicits Varying Interferon and Interleukin-6 Responses. *Viral Immunol* 1:57-67.
- Webster, R.G. (1993). Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet J* 25:537-538.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T, Chambers, T.M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 56.
- Webster, R.G., & Yuanji, G. (1991) New influenza virus in horses. *Nature* 351:527.
- Wilson, W.D. (1993). Equine Influenza. *Vet Clin North Am Equine Pract* 9:257-278.
- Woodward, A.L., Rash, A.S., Blinman, D., Bowman, S., Chambers, T.M., Daly, J.M., & et al. (2014). Development of a surveillance scheme for equine influenza in UK and characterisation of viruses isolated in Europe, Dubai and the U.S.A. from 2010 to 2012. *Vet Microbiol* 169:113-127.
- World Organization for Animal Health (OIE) (2019a). Acedido em 26 de Setembro 2019 em https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryreports.
- World Organization for Animal Health (OIE) (2019b). Acedido em 26 de Setembro 2019 em <https://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/equine-influenza/>.
- World Organization for Animal Health (OIE) (2019c). Chapter 3.5.7. Equine Influenza (Infection with Equine Influenza virus). Acedido em 26 de Setembro 2019 em https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.07_EQ_INF.pdf.
- World Organization for Animal Health (OIE) (2019d). Equine Influenza, Italy. Acedido em 26 de Setembro 2019 em https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=30397.
- World Organization for Animal Health (OIE) (2020a). Acedido em 17 de Janeiro 2020 em <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>.

World Organization for Animal Health (OIE) (2020b). Chapter 1.1 Notification of diseases, infections and infestations, and provision of epidemiological information in Terrestrial Animal Health Code. Acedido a 22 de Janeiro 2020 em https://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_notification.htm.

Yamanaka, T., Cullinane, A., Gildea, S., Bannai, H., Nemoto, M., Tsujimura, K., & et al. (2015). The potential impact of a single amino-acid substitution on the efficacy of equine influenza vaccines. *Equine Vet J* 47:456-462.

Yamanaka, T., Nemoto, M., Bannai, H., Tsujimura, K., Kondo, T., Matsumura, T., & et al. (2017). Rapid diagnosis of equine influenza by highly sensitive silver amplification immunochromatography system. *J Vet Med Sci* 79:1061-1063.

Yamanaka, T., Niwa, H., Tsujimura, K., Kondo, T., & Matsumura, T. (2008a). Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007. *J Vet Med Sci* 70:623-625.

Yamanaka, T., Tsujimura, K., Kondo, T., & Matsumura, T. (2008b). Evaluation of antigen detection kits for diagnosis of equine influenza. *J Vet Med Sci* 70:189-192.

Yarus, M., Widmann, J.J., & Knight, R. (2009). RNA-Amino Acid Binding: A Stereochemical Era for the Genetic Code. *J Mol Evol* 69:406-429.

Yates, P., & Mumford, J.A. (2000). Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation. *Vet Micro* 74:173-177.

Yin, X., Lu, G., Guo, W., Qi, T., Ma, J., & Zhu, C., et al. (2013). Identification of equine influenza virus infection in Asian wild horses (*Equus przewalskii*). *Arch Virol* DOI:10.1007/s00705-013-1908-z.

Yondo, M., Zayat, B., Nelson, M.I., Heil, G.L., Anderson, B.D., Lin, X., & et al. (2014). Equine influenza a (H3N8) virus isolated from Bactrian camel, Mongolia. *Emerging Infec Dis* 20:2144-2147.

Yondon, M., Heil, G.L., Burks, J.P., Zayat, B., Waltzek, T.B., Jamiyan, B.O. & et al. (2013). Isolation and characterization of H3N8 equine influenza A virus associated with the 2011 epizootic in Mongolia. *Influenza and Other Resp Viruses* DOI: 10.1111/irv.12069.

Yondon, M., Zayat, B., Nelson, M.I., Heil, G.L., Anderson, B.D., Lin, X., & et al. (2014). Equine Influenza A (H3N8) virus isolated from Bactrian camel, Mongolia. *Emerg Infect Dis* 20:2144-2147.

Yoon, S.W., Webby, R.J., & Webster, R.G. (2014). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 385.

Youzbashi, E., Marschall, M., Chaloupka, I., & Meier-Ewert, H. (1996). Distribution of influenza C virus infection in dogs and pigs in Bavaria. *Tierarztl Prax* 24:337-342.

Apêndice I - Questionário sobre Influenza equina

O estudo da influenza em cavalos insere-se num programa de mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Neste inquérito considera-se a Influenza como a doença primária ou secundária.

(Questionário anónimo a fim de proteger as informações dos cavalos que apresentaram esta doença, dirigido a médicos veterinários)

1. Qual a sua área geográfica de prática clínica?
2. A sua prática clínica é maioritariamente de cavalos de desporto federado, ou de lazer, ou de reprodução, ou de corridas de cavalos?
3. De quantos casos de influenza suspeitou nos últimos 2 anos (0-5; 6-10; 11-20; 21-50; >50)?
4. Quantos casos de influenza diagnosticou objetivamente nos últimos 2 anos, com apoio de testes laboratoriais?
5. Quantas vacinações contra a influenza administrou em 2018 (0-20; 21-50; 51-100; >100)?
6. Quantas vacinações contra a influenza administrou em 2019 (0-20; 21-50; 51-100; >100)?
7. O seu protocolo vacinal é segundo as normas FEI / FEP?
8. O seu protocolo vacinal é maioritariamente anual ou semestral?
9. Nos últimos 2 anos recorreu a testes laboratoriais de despiste de influenza?

Apêndice II: Dados Recolhidos para o estudo

Tabela 2. Dados sobre os países onde os veterinários participantes praticam a sua atividade clínica.

Pergunta 1	Área Geográfica (Países)	Nº
	Irlanda	16
	França	2
	Portugal	50
	Reino Unido	17
	Suécia	2
		87

Tabela 3. Dados sobre a caracterização da prática clínica dos veterinários participantes no estudo referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

Pergunta 2	Prática Clínica	Nº
	Corridas	4
	Desporto	14
	Lazer	17
	Reprodução	2
		37

Tabela 4. Dados sobre a suspeita de casos de Influenza Equina (IE) nos últimos dois anos em França, Irlanda, Reino Unido e Suécia

Pergunta 3	Suspeita de Casos de Influenza nos últimos dois anos	Nº
	(0-5)	24
	(6-10)	9
	(11-20)	1
	(21-50)	1
	(>50)	2
		37

Tabela 5. Dados sobre os casos diagnosticados objetivamente com o auxílio de testes laboratoriais em França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

Pergunta 4	Quantos casos diagnosticou objetivamente nos últimos dois anos	Nº
	0	22
	1	4
	2	0
	3	2
	4	1
	5	6
	6	1
	7	0
	8	0
	9	0
	10	1
		37

Tabela 6. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018, referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

Pergunta 5	Quantas vacinas foram administradas em 2018	Nº
	(0-20)	3
	(21-50)	3
	(51-100)	10
	(>100)	21
		37

Tabela 7. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2019 referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia

Pergunta 6	Quantas vacinas foram administradas em 2019	Nº
	(0-20)	2
	(21-50)	3
	(51-100)	10
	(>100)	22
		37

Tabela 8. Dados sobre o protocolo utilizado para a vacinação contra a Influenza Equina (IE) referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

Pergunta 7	Protocolo Vacinal segundo as Normas da FEI/FEP	Nº
	Sim	27
	Não	1
	País	9
		37

Tabela 9. Dados sobre o tipo de protocolo usado para a vacinação referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

Pergunta 8	Tipo de protocolo vacinal	Nº
	Anual	27
	Semestral	10
		37

Tabela 10. Dados sobre o uso de testes laboratoriais para diagnóstico de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019 referente à França, Irlanda, Reino Unido e Suécia.

Pergunta 9	Uso de testes laboratoriais nos últimos 2 anos	Nº
	Sim	24
	Não	13
		37

Tabela 11. Dados sobre a caracterização da prática clínica dos veterinários portugueses participantes no estudo.

Pergunta 2	Prática Clínica	Nº
	Corridas	0
	Desporto	24
	Lazer	20
	Reprodução	6
		50

Tabela 12. Dados sobre a suspeita de casos de Influenza Equina (IE) nos últimos dois anos em Portugal.

Pergunta 3	Suspeita de Casos de Influenza nos últimos dois anos	Nº
	(0-5)	37
	(6-10)	7
	(11-20)	5
	(21-50)	0
	(>50)	1
		50

Tabela 13. Dados sobre os casos diagnosticados objetivamente com o auxílio de testes laboratoriais em Portugal.

Pergunta 4	Quantos casos diagnosticou objetivamente nos últimos dois anos	Nº
	0	49
	1	0
	2	0
	3	0
	4	1
	5	0
	6	0
	7	0
	8	0
	9	0
	10	0
		50

Tabela 14. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2018 em Portugal.

Pergunta 5	Quantas vacinas foram administradas em 2018	Nº
	(0-20)	2
	(21-50)	10
	(51-100)	16
	(>100)	22
		50

Tabela 15. Dados sobre a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em 2019 em Portugal.

Pergunta 6	Quantas vacinas foram administradas em 2019	Nº
	(0-20)	2
	(21-50)	10
	(51-100)	20
	(>100)	18
		50

Tabela 16. Dados sobre o protocolo utilizado para a vacinação contra a Influenza Equina (IE) em Portugal.

Pergunta 7	Protocolo Vacinal segundo as Normas da FEI/FEP	Nº
	Sim	45
	Não	5
	País	0
		50

Tabela 17. Dados sobre o tipo de protocolo vacinal usado pelos Médicos Veterinários portugueses que participaram no estudo.

Pergunta 8	Tipo de protocolo vacinal	Nº
	Anual	25
	Semestral	25
		50

Tabela 18. Dados sobre o uso de testes laboratoriais para diagnóstico de Influenza Equina (IE) em 2018 e 2019 em Portugal.

Pergunta 9	Uso de testes laboratoriais nos últimos 2 anos	Nº
	Sim	3
	Não	47
		50

Apêndice III: Relatório sobre a Irlanda

Qualitative analysis of the usage of laboratory tests to confirm the diagnose of equine influenza and the vaccination practice against the disease by veterinarians in Ireland



Author:
Luís Miguel Machado Dionísio,
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Humanidades e Tecnologia
Lusofona de Lisboa

April 2020

Dionísio (2020)

Title:

Qualitative analysis of the usage of laboratory tests to confirm the diagnose of equine influenza and the vaccination practice against the disease by veterinarians in Ireland

Background and objective

Equine influenza (EI) is a highly contagious respiratory infectious disease of the equines and is caused by the equine influenza A virus (EIV-A). The EIV-A belongs to the family Orthomyxoviridae, transmits easily by direct contact and inhalation with fast global spread found to affect equine and other equids. (Timoney,1996). EIV-A outbreaks have caused high levels of equine illness and economic damage in several countries and the high transmission also represents a risk for infection to other species like dogs, cats and humans. (Law, 1874; Sovinova *et al.*, 1958; van Maanen & Cullinane, 2002; Myers & Wilson, 2006).

The EIV-A changes through frequent mutations, recombination and reassortment of the genetic material, with a continuous challenge of the immune system of the host, being animals or humans. (Webster *et al.*, 1992; Mehle *et al.*, 2012).

Vaccination is highly effective to prevent, control, and limit the impact of equine influenza. (Gildea *et al.* 2012).

The prevention of the disease should be done through vaccination with efficacious vaccines, to more efficiently limit the seriousness of the clinical symptoms and the morbidity during the outbreaks. The vaccines do have a very important role on the control of the disease progression and the booster protocol should be followed to reduce the risk of infection. (Powell *et al.*, 1995; Daly *et al.*, 2004; Minke *et al.*, 2004; Elton & Cullinane, 2013).

World Organization for Animal Health (OIE) does the homologation of the strains recommended for vaccination purposes. Every year the Expert Surveillance Panel (ESP) formally established in 1995 and consisting of designated experts from the OIE and WHO, reviews the disease surveillance and virus characterization data, with special

Dionísio (2020)

attention to vaccine breakdown and emergent novel antigenic variants, and makes recommendations about the selection of the vaccine strain to be used. The update of the strains is done only if the immunization provided by the strain in use is considered to be inadequate (Cullinane *et al.*, 2010).

The major difficulty of the fight against equine influenza is the ability to control the virus through vaccination and the existence of several animal reservoirs which are responsible for the reappearance of the virus.

The mutation of the antigen plays also a relevant role and it represents a challenge to the immunologic system and consequently to the intended effect of the vaccine of securing the organism predisposition for a response when in presence of the virus, limiting its progression. (Daly *et al.*, 2013; Elton & Cullinane, 2013).

To achieve a robust prevention of the disease it is recommended the active surveillance that should include the genetic and antigenic characterization of the virus, together with clinical and epidemiological information provided by the veterinarian's professional societies, as well as information on the potential failure of the vaccines. This will enable the identification of a vaccine failure and the alert for a potential disease outbreak. (Back *et al.*, 2016; Daly & Murcia, 2018).

The objective of this study was to qualitatively assess the veterinarians practice in what regards the use of laboratory tests to diagnose equine influenza and their vaccination practice to prevent the disease in selected European countries.

This report includes data from Ireland only. The cross-country assessment is the subject matter of the Veterinarian Medicine Master's Thesis and the complete dataset and its analysis is included in the original Master's Thesis paper.

Methods and Materials

The methodology used for the assessment of the veterinarians' practice in what regards the use of laboratory tests to confirm the diagnose of equine influenza and the vaccination practice against the disease, was an online survey using a questionnaire that was distributed among veterinarians. The veterinarians in selected European countries were invited to give feedback on their previous last 2 years of practice, 2018 and 2019. The countries included in this qualitative study were France, Ireland, Portugal, Sweden and

Dionísio (2020)

the United Kingdom. The country selection criteria used was the occurrence of equine influenza outbreak in 2018 and/or 2019 per the OIE available communication.

Between the 20th of February 2020 and the 16th of March 2020, the veterinarians in Ireland were invited to participate in an online survey intended to collect information about their equine influenza vaccination practice. The communication was made by the Equine Interest Group of Veterinary Ireland through the Equine News Section of the Veterinary Ireland Journal and social media.

It is worth to mention that the study was launched in Portugal earlier. The questionnaires were made available in Portuguese in Portugal and in English in the remaining participating countries. The questionnaire used in the study is included in the Appendix.

The questionnaires launched out of Portugal included one additional initial screening question to ensure that only answers provided by veterinarians would be included in the analysis, aiming for fair data comparison and bias reduction. This “exclusion” question was added because the digital platform used to launch the questionnaire in one of the countries out of Portugal, also allowed for non-veterinarians to have access to the questionnaire. This screening question permitted the elimination of all data provided by non-veterinarians. All these questionnaires were excluded from all the analysis performed.

This was a blind study in order to protect the identity of the veterinarians and the identity of the horses.

Results

The launch of this survey in Ireland coincided with the fast spreading COVID-19 crisis from Asia to the rest of the world. In this period, many countries in Europe were mobilizing all the scientific community members and healthcare professionals to increase their level of readiness to manage the pandemic. Ireland was not an exemption.

The veterinarians in Ireland do have a fundamental role in the local community and have actively been mobilized in the fight against COVID-19. Nevertheless, with the tireless support of Dr. Peter Bishton, the successful engagement with the veterinarian community was achieved and 16 fully answered questionnaires were collected.

Dionísio (2020)

This number represents about 43% of the non-Portugal total questionnaires included in the study, it is considered to be a quite reasonable sample allowing for directional qualitative analysis of the current vaccination practice.

Among the responders, 38% of the veterinarians reported that most of the horses they treat in their clinic are leisure horses and 31% reported that most of the horses they treat in their clinic are sport horses. The full results are included on figure 1 below.

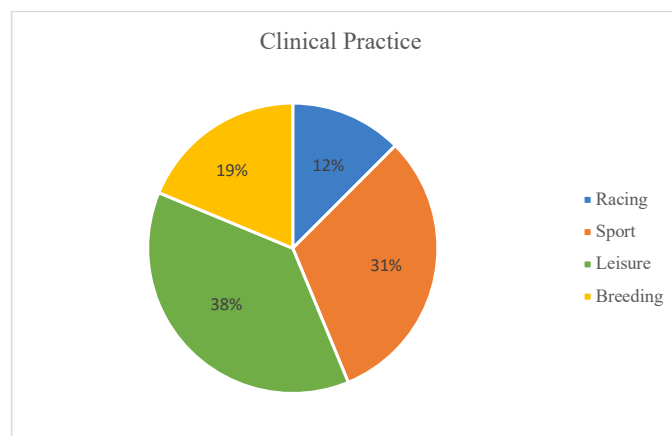


Figure 1: Distribution of veterinarians per the majority of treated horses

In the study period, past 2 years, all the veterinarians have reported that they had equine influenza suspected cases in their clinic. It is relevant to mention that 3 veterinarians had a much higher number of equine influenza suspected cases than the average. The results of the suspected cases are summarized on the figure 2.

Dionísio (2020)

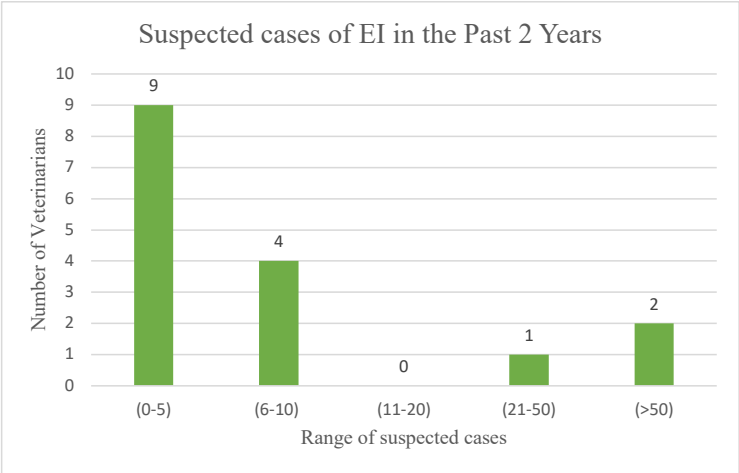


Figure 2: Suspected cases of Equine Influenza in the Past 2 Years

There were 39 suspected cases confirmed through laboratory tests. These results are included on figure 3. In comparison with the results included on figure 2, it is possible to conclude that the suspected cases were investigated, and the veterinarians aimed to validate the diagnosis. Consequently, it was possible to identify among the suspected cases, the cases included on the figure 3.

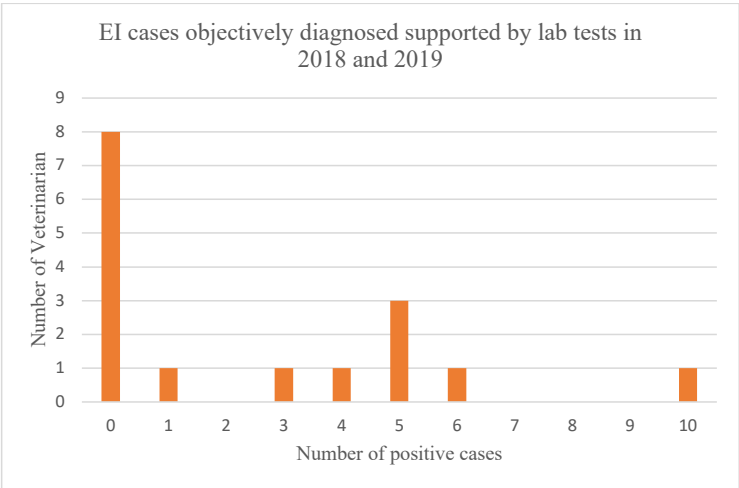


Figure 3: Cases objectively diagnosed supported by lab tests

The results of the vaccination practice against equine influenza included on the figures 4 and 5 demonstrate a strong vaccination practice among veterinarians in Ireland

Dionísio (2020)

in 2018 and 2019. According to these results one of the veterinarians administrated a lower number of vaccines in 2019 in comparison with his practice in the previous year, 2018. This reduction cannot immediately be perceived as a negative result, because it may be related with horses that have been moved to another veterinarian clinic. It is also relevant to mention that the addition or reduction of one single horse to the clinic might result on having one veterinarian moving to a different range.

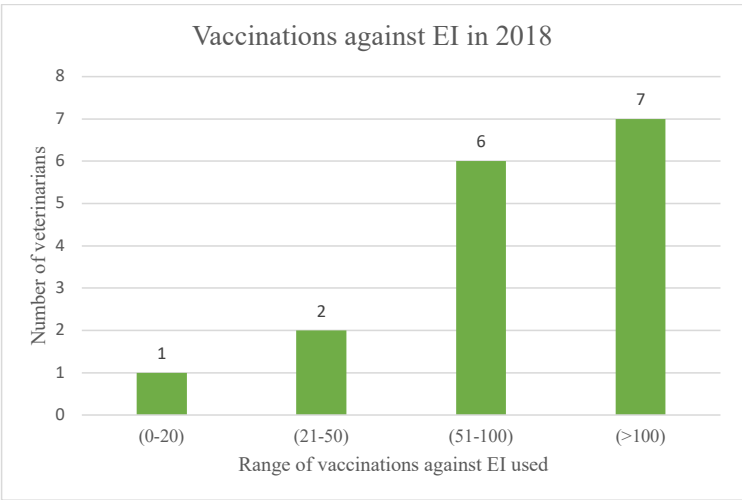


Figure 4: Vaccinations against Influenza in 2018 in Ireland

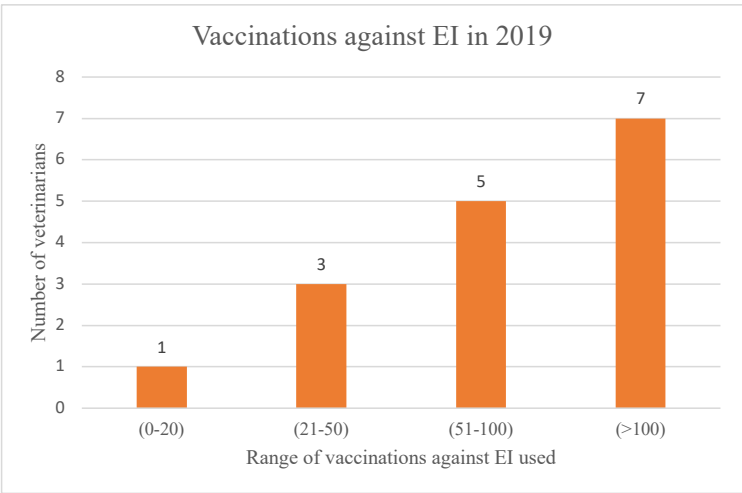


Figure 5: Vaccinations against Influenza in 2019 in Ireland

Dionísio (2020)

In Ireland, all the 16 veterinarians who submitted their answers to the questionnaire have confirmed that they follow the Irish vaccination guidelines or the vaccination guidelines of the International Equestrian Federation (FEI), independently of the characteristics of their clinical practice, to include a majority of leisure horses or other. In comparison with the results on this parameter from the other countries included in the study, the vaccination practice against equine influenza in Ireland is very positive.

In all the other countries, there isn't such a high adherence rate to the vaccination guidelines against equine influenza.

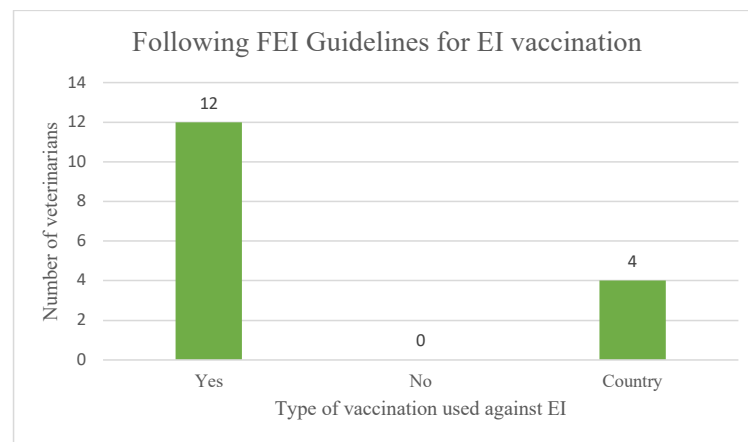


Figure 6: Guidelines for Equine Influenza vaccination

According with the Guidelines, depending on the horse activity or mobility, it is possible to follow an annual or semester-based vaccination protocol. The figure 7 included below shows that in Ireland the annual vaccination protocol is preferred among the veterinarians.

Dionísio (2020)

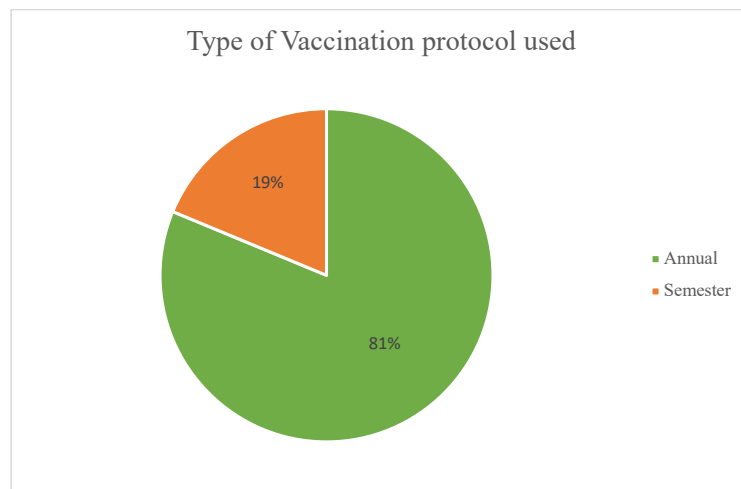


Figure 7: Type of vaccination protocol used

Most of the veterinarians reported that, in the study period, they used laboratory tests to screen equine influenza cases, as shown on figure 8. In comparison with the number of suspected cases in the same period, it is possible to say that the percentage of the laboratory tests usage was positive.

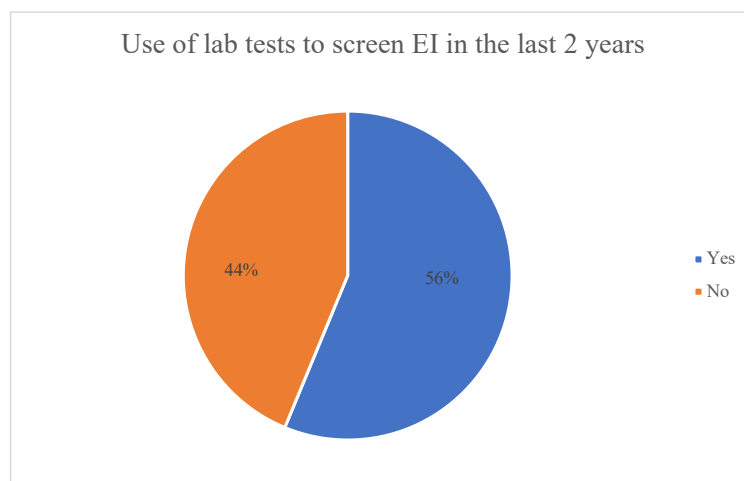


Figure 8: Usage of laboratory tests to confirm the Equine Influenza diagnosis in 2018 and 2019

Dionísio (2020)

Conclusions

This study demonstrates that in Ireland, the veterinarians, through their clinical practice, have shown to be highly committed to the safety and well-being of animals and human beings. All the participants reported to follow the guidelines for the vaccination against equine influenza. Therefore, from the veterinarian's behavioral perspective, it is fair to say that Ireland is well positioned to investigate and assess adequately the efficacy of the vaccines against equine influenza used in real world and to be an active member of the Expert Surveillance Panel.

The use of laboratory tests to diagnose equine influenza by veterinarians in Ireland is considered to be a good practice. The numbers show that there is room for improvement on what regards the usage rate of these tests though, mainly because, the testing for equine influenza is provided free of charge by the Irish Equine Centre and the cost is supported by the Department of Agriculture, Food and the Marine of Ireland, not representing an additional cost burden to the horses' owners. (IEC, 2020)

A more in depth follow up study post-COVID-19 will certainly allow for a more granular understanding of the usage of laboratory tests to confirm the diagnose of equine influenza and the vaccination practice against the disease by veterinarians in Ireland.

Acknowledgement

I am very grateful to Dr. Peter Bishton/ Equine Interest Group of Veterinary Ireland for the outstanding collaboration. His extraordinary continuous engagement and support, even during the COVID-19 crisis period, was truly inspiring.

Dionísio (2020)

References

- Back, H., Berndtsson, L.T., Gröndahl, G., Ståhl, K., Pringle, J. & Zohari, S. (2016). The first reported Florida clade 1 virus in the Nordic countries, isolated from a Swedish outbreak of equine influenza in 2011. *Vet Microbiol* 184, 1-6.
- Cullinane, A., Elton, D., & Mumford, J. (2010). Equine influenza surveillance and control. *Influenza Other Respir Viruses* 4:339-344
- Daly, J.M., & Murcia, P.R., (2018). Strategic implementation of vaccines for control of equine influenza. *Equine Vet J* 50
- Daly, J.M., Newton, J.R., & Mumford, J.A. (2004). Current perspectives on control of equine influenza. *Vet Res* 35:411-423
- Daly, J.M., Newton, J.R., Wood, J.L.N., & Park, A.W. (2013). What can mathematical models bring to the control of equine influenza? *Equine Vet J* 45
- Elton, D., & Cullinane, A. (2013). Equine influenza: antigenic drift and implications for vaccines. *Equine Vet J* 45:768-769
- Gildea, S., Quinlivan, M., Arkins, S., & Cullinane, A. (2012). The molecular epidemiology of equine influenza in Ireland from 2007 to 2010 and its international significance. *Equine Vet J* 44:387-392
- IEC (2020). Equine Influenza Alert. Available online at: <http://www.irishequinecentre.ie/Content/pdf/18th%20Jan%202019%20Equine%20Influenza%20Alert1.pdf>
- Law, J. (1874). Influenza in horses in *Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1872*, ed Commission of Agriculture. Washington DC, pp. 203-248
- Mehle, A., Dugan, V.G., Taubenberg, J.K., Doudna, J.A. (2012). Reassortment and mutation of the avian influenza virus polymerase PA Subunit overcome species barriers. *J Virol* 86
- Minke, J.M., Audonnet, J.C., & Fischer, L. (2004). Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res* 35:435-443 DOI: 10.1051/vetres:2004019
- Myers, C., & Wilson, D. (2006). Equine Influenza Virus. *Clin Tech Equine Pract* 5:187-196
- Powell, D.G., Watkins, K.L., Li, P.H. & Shortridge, K.F. (1995). Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992. *Vet Rec* 136:531-6
- Sovinova, O., Tomova, B., Pouska, F., & Nemec, J. (1958). Isolation of virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 2:52-61

Dionísio (2020)

Timoney, P.J. (1996). Equine Influenza. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 19:205-211

van Maanen, C., & Cullinane, A. (2002). Equine influenza virus infections: An update. *Vet Quartely* 24:79-94. DOI: 10.1080/01652176.2002.9695127

Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T, Chambers, T.M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 56

Appendix

Influenza

The study of influenza in horses is the subject of a Veterinarian Medicine Master program of the Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia in Lisbon. In this questionnaire influenza is considered as the primary or secondary disease.

(In order to protect the horses information that were exposed to the disease, this is an anonymous questionnaire.)

* Required

1. Profile of the survey respondent: *

Mark only one oval.

- ☐ Veterinarian
☐ Nurse
☐ Other

2. 1. What is the geographical area of your clinical practice? *

3. 2. The majority of the horses in your clinical practice are: *

Mark only one oval.

- ☐ Sport
☐ Leisure
☐ Breeding
☐ Racing

4. 3. How many Influenza cases have you suspected to have seen in the last 2 years?

*

Mark only one oval.

- ☐ 0-5
☐ 6-10
☐ 11-20
☐ 21-50
☐ >50

5. 4. How many Influenza cases have you objectively diagnosed in the last 2 years, supported by lab test? *

6. 5. How many Influenza vaccinations did you do in 2018? *

Mark only one oval.

- ☐ 0-20
☐ 21-50
☐ 51-100
☐ >100

7. 6. How many Influenza vaccinations have you done in 2019? *

Mark only one oval.

- ☐ 0-20
☐ 21-50
☐ 51-100
☐ >100

8. 7. Does your vaccination protocol follow FEI guidelines? *

Mark only one oval.

- ☐ Yes
- ☐ No
- ☐ Country/ Equestrian Federation Guideline

9. 8. Do you follow annual or semester vaccination protocol? *

Mark only one oval.

- ☐ Annual
- ☐ Semester

10. 9. Have you used lab tests to screen Influenza in the last 2 years? *

This content is neither created nor endorsed by Google.

Google Forms