

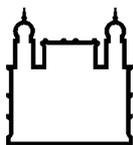
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DOS VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT
LOUIS E DO OESTE DO NILO EM EQUINOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

FLÁVIA LÖWEN LEVY CHALHOB

Rio de Janeiro
Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

FLÁVIA LÖWEN LEVY CHALHOUB

Investigação da circulação dos vírus da encefalite de Saint Louis e do oeste do Nilo em equinos do estado do Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador (es): Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis
Prof. Dr. Alex Pauvolid-Corrêa

RIO DE JANEIRO
Março de 2017

Chalhoub, Flávia Löwen Levy.

Investigação da circulação dos vírus da encefalite de Saint Louis e do oeste do Nilo em equinos do estado do Rio de Janeiro / Flávia Löwen Levy Chalhoub. - Rio de Janeiro, 2017.

xix, 76 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Ana Maria Bispo de Filippis.

Co-orientador: Alex Pauvolid-Corrêa.

Bibliografia: f. 62-73

1. arbovírus. 2. vírus do oeste do Nilo. 3. vírus da encefalite de Saint Louis. 4. ELISA de bloqueio. 5. equine. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

FLÁVIA LÖWEN LEVY CHALHOUB

INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DOS VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS E DO OESTE DO NILO EM EQUINOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis
Prof. Dr. Alex Pauvalid-Corrêa

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Gisela Freitas Trindade - Presidente (Biomanguinhos/Fiocruz)

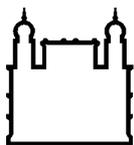
Prof. Dra. Maria Angélica Monteiro de Mello Mares Guia - Revisora (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Andreza Soriano Figueiredo Nunes (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Eduardo de Melo Volotão - Suplente (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Cristiana Couto Garcia - Suplente (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 3 de março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Com todo o meu amor à minha mãe,
minha maior inspiração para
transposição de qualquer obstáculo e
conquista dos meus desejos.

AGRADECIMENTOS

À minha filha, Maria Luísa, o maior presente que a vida me deu, o sentido sem o qual, tudo seria nada.

Ao Frederico Chalhoub, meu marido, neste tempo, mantivemo-nos determinados e cúmplices. Esta realização foi essencialmente motivada pelo seu afeto, compreensão e respeito às minhas escolhas.

À minha família pela desmedida união. Ao meu pai Alberto Levy, pela habilidade de deixar leve qualquer fardo. À minha mãe, Maria das Graças Löwen, pela sua intensidade e presença, que estabelece sempre os meus rumos. À minha irmã, Andréia Levy, pela amizade incondicional, pelo amparo infinito e pelo seu garantido companheirismo.

À minha orientadora Dra Ana Bispo que sempre foi extremamente solícita e me aceitou como orientanda desde o primeiro contato, por acreditar que eu conseguiria vencer os desafios de uma nova empreitada, pela acolhida e apoio que enriqueceu enormemente minha vida profissional.

Ao meu co-orientador Alex Pauvalid-Correa pela preciosa e imprescindível colaboração e disponibilidade no decorrer do meu projeto. Sua ajuda foi primordial para o andamento e construção desse trabalho.

À Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, que me ajudou durante esta jornada tornando mais compreensível o conteúdo dessa dissertação com suas as suas inúmeras e gentis contribuições.

Às minhas amigas Cintia Damasceno Rodrigues, Maria Celeste Torres e Aline Santos, tudo teria sido mais árduo sem os prazerosos momentos de descontração e desabafo que dividimos. Em especial às queridas Cintia e Celeste pela partilha de conhecimentos e aconselhamentos que transcendem o ambiente acadêmico. Presentes em momentos cruciais, me deram suporte e tranquilidade. Suas ajudas foram fundamentais para que eu pudesse terminar esta batalha, mas suas amizades fizeram todo resto ficar pequeno. Meu sincero obrigada.

À Eliane Araújo pelas valiosas lições técnicas durante os consecutivos dias de execução experimental na sala de sorologia.

À Dra. Patrícia Sequeira pela precisa ajuda nos últimos momentos da pesquisa, quando o estresse já me tinha tomado conta.

Ao Dr. Marcos Mendonça, pelas conversas permeadas por questionamentos e conselhos pertinentes sobre as futuras perspectivas profissionais.

À coordenadora da Pós-graduação em Medicina Tropical, Dra. Martha Suarez Muttis, administrou dificuldades do curso, levou entusiasmo, compreensão e segurança aos alunos, concretizando objetivos em que muitos teriam desistido.

À Dra. Maria Angélica Mares Guia, por ter aceito ser a revisora e aos membros da banca examinadora, Dra. Gisela Freitas Trindade, Dra. Andreza Soriano Figueiredo Nunes, Dra. Cristiana Couto Garcia e Dr. Eduardo de Melo Volotão por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

À amiga Janaina Godinho Louzada pela amizade sincera e pela sua disponibilidade a sempre me ajudar com suas acertadas orientações, bem como à amiga Carol Chicre, que me possibilitaram o acesso à alguns haras nos quais realizei coletas. Aos colegas e colaboradores Paulo Celso Pires, Glenda Sommer, Debora Sperotto Gregg, Alceu Cardoso, Adriana Varol, Bárbara Santana, Nilton Renato Peixoto, José Renato Costa Caiado, Hugo Dutra Borges, Roberto Solanes e Francisco Ramalho da Silva ("Chiquinho") que compreenderam a importância deste trabalho me abrindo as "portelas", mantendo viva a esperança de uma Medicina Veterinária e uma equideocultura comprometida com a seriedade.

Aos proprietários, tratadores e todos os funcionários das propriedades onde foram realizadas as coletas, que contribuíram para que o meu trabalho no campo fosse realizado.

À Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS pela doação dos antígenos utilizados neste trabalho devido ao pronto atendimento da Dra. Raimunda do Socorro da Silva Azevedo e da Dra. Sueli Guerreiro Rodrigues à nossa solicitação.

À toda equipe do Laboratório de Flavivírus, pelo suporte estrutural, intelectual e ambiente de trabalho profissional. Aos amigos Simone Sampaio, Allison Fabri, Carolina Santos, Marcelle Santos, Ronaldo Lapa, Sheila Cheles, Leda Santos, Ana

Lúcia Bastos e Solange Regina, Everton Rodrigues, Ravi Mehta e Raquel Medialdea.

À querida turma de Mestrado de Medicina Tropical de 2015.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). Pelo suporte financeiro, sem o qual, se tornaria inviável a execução deste trabalho

“Somos seres desejantes destinados a incompletude, e é isso que nos faz caminhar”. Jacques Lacan



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

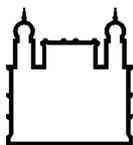
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DOS VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS E DO OESTE DO NILO EM EQUINOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

Epidemias e epizootias causadas por arbovírus são reportadas anualmente em todo mundo. Entre os arbovírus de grande importância médica e veterinária nas Américas, estão os flavivírus vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus do oeste do Nilo (WNV). No Brasil, WNV foi evidenciado pela primeira vez em equinos de Mato Grosso do Sul em 2011 e em 2015 foi diagnosticado em um caso humano de desordem neurológica no Piauí. SLEV foi evidenciado em casos humanos de meningite viral em 2006 em São Paulo e em 2009 em cérebro de um equino com encefalite em Minas Gerais. Apesar do estado do Rio de Janeiro (RJ) ter um grande rebanho de equinos, estudos acerca da circulação destes vírus nestes animais são escassos. Desta forma, realizamos uma investigação para a circulação de WNV e SLEV em equinos hígidos e com desordem neurológica de diferentes regiões do RJ, através de um inquérito sorológico por ELISA de bloqueio e RT-PCR em tempo real nos animais que apresentaram as desordens neurológicas e os residentes das mesmas propriedades. De um total de 435 amostras de soro submetidas ao ELISA de bloqueio, 38 (8.7%) foram reações monotípicas para SLEV e 89 (20.5%) foram reações monotípicas para WNV. O maior número e frequência de animais positivos para flavivírus foram nas mesorregiões Norte (65,8%) e Noroeste Fluminense (67,10%). Todas as amostras dos animais que apresentaram desordem neurológica foram negativas no RT-PCR em tempo real para WNV. A detecção de amostras positivas no ELISA de bloqueio sugere que equinos do RJ foram expostos ao WNV e SLEV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVESTIGATION OF SAINT LOUIS ENCEPHALITIS AND WEST NILE VIRUSES IN EQUINES FROM THE STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

Epidemics and epizootics caused by arboviroses are reported worldwide. The Saint Louis encephalitis virus (SLEV) and West Nile virus (WNV) are arboviruses medical and veterinary magnitude in the americas. In Brazil, WNV was first detected in horses from Mato Grosso do Sul in 2011. A case of neurological human disorder was diagnosed in 2015 in Piauí. SLEV was evidenced in viral meningitis in 2006 in São Paulo and in an equine brain with encephalitis in Minas Gerais. Although the state of Rio de Janeiro is a large herd of horses, there are only few studies on the circulation of these viruses. In this study, through a serological epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay (blocking ELISA) and real time RT-PCR we performed an investigation for the circulation of WNV and SLEV in healthy horses and with neurological disorders of different regions of RJ. From a total of 435 serum samples submitted to the blocking ELISA, 38 (8.7%) were monotypic reactions to SLEV and 89 (20.5%) presented monotypic reactions to WNV. The highest number and frequency of flavivirus positive animals were in the North (65.8%) and Northwest Fluminense (67.10%) mesoregions. All samples from animals presenting neurological disorder were negative in real time RT-PCR. Detection of positive samples in the epitope- blocking ELISA suggests that RJ horses have been exposed to WNV and SLEV.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Arbovírus.....	1
1.1.1 Ciclos de transmissão.....	2
1.1.2 Vetores	4
1.1.3 Aves como hospedeiros amplificadores de arbovírus.....	5
1.1.4 Fatores associados a emergência dos arbovírus	5
1.1.5 Arboviroses de importância médica no Brasil.....	8
1.1.6 Família Flaviviridae gênero Flavivirus.....	9
1.1.7 Replicação dos flavivírus	11
1.1.8 Patogenia e manifestações clínicas dos flavivírus.....	12
1.1.9 Diagnóstico laboratorial	13
1.2 Flavivírus no Brasil	16
1.2.1 Vírus do oeste do Nilo (WNV).....	16
1.2.2 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)	18
1.2.3 O RJ e a circulação de flavivírus	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Instituições participantes	25
3.2 Aspectos éticos	25
3.3 Armazenamento das amostras.....	25
3.4 Escolha das propriedades e dos animais	25
3.4.1 Critérios de inclusão	26
3.4.2 Critérios de não inclusão:	26
3.5 Cálculo e tamanho da amostra.....	27

3.5.1	Constituição dos grupos	27
3.5.2	Amostras de animais com desordem neurológica aguda	30
3.5.3	Coleta, processamento e armazenagem da amostra sanguínea	31
3.5.4	Análises Laboratoriais.....	31
3.5.5	Teste sorológico - Elisa de Bloqueio.....	31
3.5.6	Execução do ELISA de Bloqueio	33
3.5.7	Teste Molecular:	36
3.5.8	Extração de RNA	36
3.5.9	RT-PCR, para flavivírus. One Step.....	36
3.5.10	One-step real-time RT-PCR Genesig® Standard Kit Quantification of WNV genomes (Primerdesign™ Ltda).....	37
3.6	Análise estatística:	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Resultados Sorológicos.....	39
4.2	Resultados segundo a localização geográfica:	40
4.2.1	Mesorregiões geográficas:.....	40
4.2.2	Reatividade para WNV e SLEV:	41
4.2.3	Municípios amostrados:	43
4.2.4	Amostras reativas ao WNV e SLEV.....	44
4.2.5	Avaliação dos resultados segundo sexo.....	46
4.2.6	Avaliação dos resultados segundo a faixa etária.....	47
4.2.7	Avaliação dos resultados segundo a atividade	49
4.2.8	Testes com os controles do banco amostral.....	51
4.3	Resultados Teste Molecular	51
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	60
7	PERSPECTIVAS	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9	ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vias de transmissão e exposição humana a arbovírus zoonóticos	3
Figura 2: Arbovírus emergentes nas Américas.	9
Figura 3: Estrutura viral dos flavivírus	10
Figura 4: Replicação dos flavivírus na célula hospedeira	12
Figura 5: Distribuição das Mesorregiões e Municípios amostrados no RJ.	29
Figura 6: Titulação do antígeno de SLEV e do MAb 6B6C-1.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efetivo de rebanho equino por Mesorregião Geográfica no RJ em 2015 e percentual em relação à população total	20
Tabela 2: Número de propriedades e animais por propriedade coletados nas Mesorregiões e Municípios do RJ.....	28
Tabela 3: Número de propriedades e animais com casos de desordem neurológica aguda por Mesorregiões e Municípios do RJ.....	30
Tabela 4: Número e percentual de animais reagentes a flavivírus pelo ELISA de bloqueio por mesorregião geográfica no RJ	41
Tabela 5: Número e percentual de animais reagentes a flavivírus pelo ELISA de bloqueio por município, RJ	43
Tabela 6: Número de animais reagentes a flavivírus pelo ELISA de bloqueio por município, RJ.....	45
Tabela 7: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por sexo	46
Tabela 8: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por sexo	46
Tabela 9: Percentual de animais reagentes para flavivírus ELISA de bloqueio por faixa etária.....	47
Tabela 10: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por faixa etária.....	48
Tabela 11: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por atividade.....	49
Tabela 12: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por atividade.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Equinos do RJ reagentes e não reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV	39
Gráfico 2: Equinos do RJ reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV .	40
Gráfico 3: Percentual de equinos do RJ reagentes e não reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV por mesorregião geográfica	41
Gráfico 4: Equinos do RJ reagentes ao SLEV e WNV no ELISA de bloqueio por mesorregião geográfica.....	42
Gráfico 5: Equinos do RJ reagentes e não reagentes no ELISA de bloqueio para flavivírus por município	44
Gráfico 6: Equinos do RJ reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV por sexo	47
Gráfico 7: Equinos do RJ reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV por faixa etária.....	49
Gráfico 8: Distribuição de animais reagentes por ELISA de bloqueio de epítipo em equinos agrupados por atividade no estado do RJ	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α - nível de significância

μ l - microlitros

% - Percentual

X² - Qui-quadrado

ABTS – 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

C – Proteína estrutural de capsídeo

C6/36 - Células de mosquitos

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CHIKV – *Chikungunya vírus*

DENV – *Dengue vírus*.

DNA – ácido desoxirribonucleico

E – Proteína estrutural de envelope

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

FC – Fixação de complemento

HI – Inibição da hemaglutinação

IF – Imunofluorescência

ILHV – *Ilheus virus*

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M.

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

JEV – *Japanese encephalitis vírus*

LABFLA – Laboratório de Flavivírus

Mab – Anticorpo monoclonal

MS – Ministério de saúde

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAYV – *Mayaro vírus*

NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 – proteínas não estruturais

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

prM – precursora da proteína de membrana

PRNT – *Plaque reduction neutralization test*

PBS – tampão fosfato salino

pH – coeficiente que indica o grau de acidez ou basicidade de uma solução aquosa

RJ – Rio de Janeiro

RK-13 - Células de rim de coelho

MG – Minas Gerais

MS - Mato Grosso do Sul

SIDRA – Sistema de Recuperação Automática

SLEV *Saint Louis encephalitis vírus*

SNC – Sistema Nervoso Central

WNV – *West Nile virus*

VEEV – *Venezuelan equine encephalitis virus*

VERO - Células de rim de macaco verde africano

YFV – *Yellow fever vírus*

ZIKV – *Zika vírus*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

Em sua maioria os vírus emergentes são zoonóticos, transmitidos de animais para seres humanos, e entre estes os vírus transmitidos por artrópodes hematófagos desempenham um papel significativo (Pfeffer & Dobler 2010).

Em 1942 foi introduzido o termo “arbovírus”, derivado da expressão em inglês “*arthropod borne virus*” que descreve um grupo ecológico de vírus de animais que se multiplicam em artrópodes e são transmitidos biologicamente entre hospedeiros vertebrados. Em 1963, o termo arbovírus foi oficialmente recomendado pelo “*International Subcommittee on Viral Nomenclature*”(Karabatsos 1985).

Os arbovírus são classificados em grupos antigênicos, de acordo com o critério sorológico estabelecido na década de 1950 (Casals 1957). Cada grupo é constituído de dois ou mais vírus que apresentam relações antigênicas demonstradas por um ou mais testes sorológicos (Vasconcelos et al. 2001).

Os arbovírus incluem diversos grupos taxonomicamente distintos, em sua grande maioria compostos por ácido ribonucleico (RNA) e foram classificados em diferentes famílias seguindo suas características físico-químicas. Dentre elas estão as famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Karabatsos N 1985, Calisher & Karabastos 1988). A escassez de arbovírus compostos por ácido desoxirribonucleico (DNA) sugere que as altas taxas de mutação e plasticidade genética dos vírus compostos por RNA, tenham permitido a replicação e disseminação destes vírus tanto em hospedeiros vertebrados como invertebrados (Weaver 2006). O genoma dos arbovírus pode ser segmentado ou não e apresentar-se com uma ou duas fitas nucleotídicas. Os arbovírus com genomas não segmentados incluem as famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, enquanto aqueles com genomas segmentados as famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Beaty et al. 1988).

Na década de 1980 foram registrados no catálogo internacional de arbovírus e outros vírus de vertebrados aproximadamente 550 vírus classificados em oito famílias e distribuídos em 14 gêneros (Karabastos 1985). Acredita-se que 214 são arbovírus envolvidos em infecções clínicas no homem e outros hospedeiros

vertebrados, sendo 134 documentadas como causadores de doença humana e 12 identificadas como zoonóticas. (Gubler 2002, Casseb et al. 2013).

1.1.1 Ciclos de transmissão

Os arbovírus circulam na natureza em ciclos de transmissão silvestres e urbanos envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. São vírus essencialmente zoonóticos e são transmitidos entre vertebrados de diferentes classes através de artrópodes hematófagos, incluindo insetos dípteros e aracnídeos ixodida (Casals 1957). Entre as classes de vertebrados mais envolvidas em ciclos de transmissão de arbovírus estão aves e mamíferos, principalmente pássaros, roedores e primatas não humanos. Com relação aos hospedeiros invertebrados, estão entre os insetos dípteros mais comumente envolvidos os culicídeos, psicodídeos e ceratopogonídeos, e entre os aracnídeos ixodida os carrapatos ixodídeos (Kuno & Chang 2005).

De um modo geral há uma relação de especificidade entre os arbovírus e seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. Para cada arbovírus, apenas uma ou algumas espécies relacionadas de hospedeiros estão envolvidas na manutenção do vírus na natureza. Com relação aos hospedeiros vertebrados, apenas algumas espécies quando infectadas apresentam viremia por tempo e com carga viral suficientes para infecção dos artrópodes vetores durante o repasto sanguíneo, e por isso são considerados hospedeiros amplificadores no ciclo de transmissão. Outras espécies podem se infectar, mas em virtude da curta e baixa viremia não são fontes de infecção para os artrópodes hematófagos e por isso não dão continuidade ao ciclo de transmissão e são consideradas hospedeiros terminais (Weaver & Barrett 2004). Entretanto, mesmo entre as espécies consideradas hospedeiros vertebrados amplificadores a participação de cada espécime é normalmente temporária e única uma vez que apresentam uma viremia de apenas alguns dias e se tornam imunes após a infecção primária (WHO 1985).

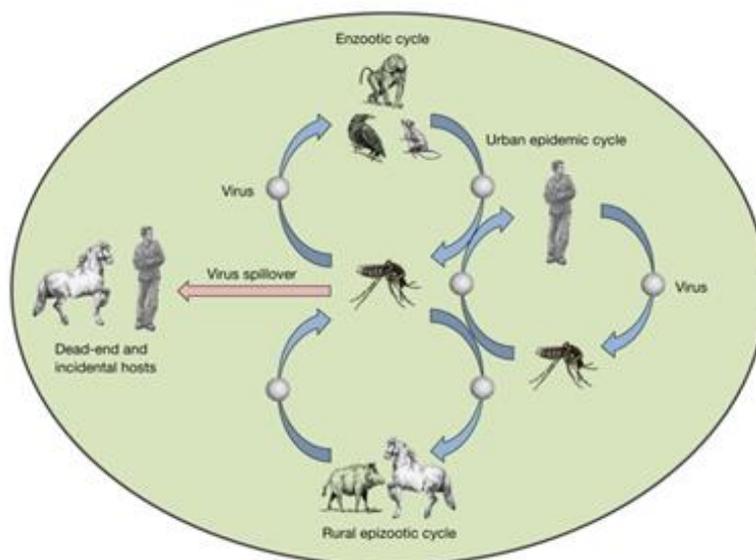
Com relação aos hospedeiros invertebrados, para cada arbovírus apenas algumas espécies de invertebrados vão participar do ciclo de transmissão. Aquelas espécies que apresentam susceptibilidade à infecção e amplificação viral, capacidade de transmissão e características ecológicas determinadas que permitam o contato com hospedeiros vertebrados amplificadores são consideradas vetores no ciclo de transmissão. Outras espécies que não apresentam essas características

podem se infectar, mas não participam do ciclo de transmissão e manutenção do arbovírus na natureza. Já os vetores, uma vez infectados, mantêm a infecção e capacidade de transmissão por toda a vida do artrópode e por essa razão podem ser considerados os verdadeiros reservatórios em ciclos de transmissão de arbovírus (Causey 1958).

Na grande maioria dos ciclos de transmissão dos arbovírus, humanos e animais domésticos participam apenas como hospedeiros terminais (Figura 1). Entre as exceções estão o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) que têm animais domésticos, como cavalos e porcos respectivamente, como amplificadores dentro de um ciclo de transmissão epizoótico (Weaver et al. 1999, Brault et al. 2002, Van den Hurk et al. 2009).

Outras exceções incluem os arbovírus que circulam em ciclos urbanos como os vírus dengue (DENV), da febre amarela (YFV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV). Nestes, os humanos são o principal hospedeiro amplificador vertebrado dentro do ciclo epidêmico urbano (Weaver & Barrett 2004, Iranpour et al. 2016). Entretanto, mesmo nesses casos o caráter zoonótico dos arbovírus é evidente uma vez que ainda que circulando em áreas urbanas entre o homem e mosquitos antropofílicos, estes arbovírus mantêm ciclos de transmissão enzoóticos em ambiente selvagem que envolvem primatas não humanos e mosquitos silvestres (Weaver & Barrett 2004).

Figura 1: Vias de transmissão e exposição humana a arbovírus zoonóticos



Fonte: (Iranpour et al. 2016)

1.1.2 Vetores

A família *Culicidae* da ordem Diptera, apresenta o maior número de espécies e os mais importantes vetores em ciclos de transmissão de arbovírus. Entre as espécies mais importantes estão as espécies do gênero *Culex*, que se alimentam predominantemente em aves e mamíferos, e as espécies dos gêneros *Aedes*, *Sabethes*, *Hemagogous* e *Anopheles* que se alimentam principalmente em mamíferos (Papavero & Guimarães 2000, Kuno & Chang 2005, Guedes 2012).

Na grande maioria das espécies da família *Culicidae* as fêmeas são hematófagas obrigatórias e o sangue ingerido além da nutrição, é importante para maturação dos ovos. Os machos, não realizam hematofagia. Os ovos são depositados na água ou em substratos acima de superfícies aquáticas, em recipientes naturais ou artificiais, geralmente localizados em locais sombreados, onde níveis elevados de temperatura e umidade são fundamentais para o seu desenvolvimento e eclosão das larvas (Eiras 2005).

Após repasto sanguíneo em um hospedeiro amplificador infectado, a replicação inicial do arbovírus no artrópode ocorre em células epiteliais do intestino médio seguida de disseminação através da hemolinfa pela hemocele para outros tecidos atingindo ductos salivares e posterior liberação para a saliva. Nos artrópodes vetores, o período entre a infecção e a transmissão é chamado de período de incubação extrínseco (Kramer & Ciota 2015).

Cerca de 470 espécies de culicídeos estão distribuídas no Brasil, entre elas espécies consideradas silvestres e outras antrópicas, que se apresentam mais adaptadas a sistemas modificados pelo homem. O vírus do oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) são transmitidos principalmente por mosquitos *Culex* spp. Um exemplo é a ampla distribuição no Brasil de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, que estão associados aos ambientes urbanos, e o *Aedes albopictus* relacionado a ambientes não só urbanos, mas também rurais. O controle desses mosquitos no Brasil tem sido um desafio e são necessárias cada vez mais pesquisas para confirmar a eficácia de novos métodos (Lima-Camara 2016)

1.1.3 Aves como hospedeiros amplificadores de arbovírus

As aves são o principal hospedeiro amplificador de alguns arbovírus (Blitvich et al. 2003b, Komar et al. 2003). As movimentações migratórias sazonais intra e intercontinental de algumas espécies determinam sua importância na dispersão de arbovírus (Gamino & Höfle 2013). A convivência das aves de outros locais com espécies nativas pode predispor a transmissão local de determinados arbovírus (Reed et al. 2003).

Geralmente o WNV causa elevada viremia com mortalidade de aves significativa, por outro lado, o SLEV não causa mortalidade de aves e produz viremia de baixa a moderada (Lord et al. 2006).

Na América do Sul, os movimentos ocorrem através das migrações neárticas (aves provenientes do hemisfério norte), migrações austrais (aves provenientes do hemisfério sul) e ainda, os movimentos em escalas regionais e locais cumprindo todo ciclo em território nacional (Sick 1997, ICMCBio 2016). As principais rotas de migração no Brasil são: 1) a rota Atlântica, a mais extensa e ao longo de toda costa brasileira; 2) a rota Nordeste, passando pelos estados do Maranhão, Piauí e Bahia; 3) a rota do Brasil Central, desde o estado do Amapá até o estado do Rio Grande do Sul; 4) rota Amazônia Central/Pantanal; e 5) rota Amazônia Ocidental (ICMCBio 2016).

1.1.4 Fatores associados a emergência dos arbovírus

Os arbovírus são amplamente distribuídos no mundo, dependendo da disponibilidade de hospedeiros e vetores (Merck 2001). As populações mais afetadas são as que estão localizadas em regiões que concentram grandes populações destes hospedeiros vertebrados amplificadores e artrópodes vetores (Hubálek & Halouzka 1999).

O clima, condições ecológicas dos vírus, vetores, hospedeiros amplificadores e o estado imunológico da população são alguns dos fatores relevantes, que favorecem a emergência das arboviroses e estabelecem sua distribuição geográfica. A ocorrência se dá de forma esporádica, endêmica ou epidêmica. O único continente onde os arbovírus não são endêmicos é o Antártico. Nas áreas tropicais, os arbovírus circulam durante a maior parte do ano. Em climas mais temperados, no entanto, os arbovírus são transmitidos entre vetores e

hospedeiros vertebrados principalmente durante os meses mais quentes. Nestas regiões, nas estações mais frias, alguns arbovírus podem persistir durante o inverno através da transmissão transovariana observada em alguns arbovírus (Gubler 2002, Lopes et al. 2014).

A fragmentação de habitat (menores e mais isolados) vem causando a perda de diversidade. Essa redução do habitat original, incluindo a perda no tamanho e o isolamento das manchas de vegetação, influenciam o declínio do número de espécies. Os fragmentos florestais remanescentes podem diferir na forma, tamanho, microclima, regime de luminosidade, solo, grau de isolamento e tipo de propriedade. Conseqüentemente, a fragmentação da floresta pode influenciar os padrões locais e regionais de biodiversidade devido à perda de micro-habitats únicos. As mudanças nos padrões de dispersão e migração alteram a distribuição, comportamento e sobrevivência das espécies (Vasconcelos et al. 2001, Burla et al. 2012, Murray & Daszak 2013, Rulli et al. 2017).

No Brasil, 30% do território está alterado por atividades humanas, agricultura, áreas urbanas e desmatamento, e nenhum dos biomas brasileiros persiste com suas características originais preservadas, sendo reduzidos os fragmentos dos habitats originais. Grande parte dessa fragmentação de habitats deve-se ao processo de urbanização que também produz alterações nos ambientes naturais, modificando substancialmente a paisagem e levando a conseqüente formação de mosaicos de ilhas de diferentes formas e tamanhos, onde a vegetação nativa é geralmente substituída por espécies oportunistas ou exóticas (Guedes 2012).

A modificação do padrão de migração e aglomeração de espécies de aves (Murphy 1998) juntamente com o crescimento da população humana leva a um aumento considerável de espécies domésticas e peridomésticas (Reisen 2012). A diversidade biológica desses novos cenários pode representar riscos decorrentes da interação ave-mosquito-homem. Por se tratar de vírus essencialmente zoonóticos estas alterações podem influenciar direta ou indiretamente os ciclos de transmissão de alguns arbovírus (Urbinatti et al. 2001).

Somado às mudanças ecológicas produzidas pelo homem, como desmatamento e urbanização desordenada, a poluição dos rios e valas, fornece sítios de oviposição artificiais com potencial de aumentar a população e distribuição de artrópodes transmissores, especialmente para *Aedes* spp. e *Culex* spp.. Essas alterações podem levar ao aparecimento de novos reservatórios ou induzir a adaptação de determinadas espécies de arbovírus a novos ciclos de manutenção.

Eventuais deslocamentos de artrópodes transmissores entre diversas localidades, mesmo de forma passiva, através dos meios de transporte, e movimentação humana e animal, também são fatores importantes para a emergência de arboviroses (Yanoviak et al. 2006, Figueiredo 2007, Pfeffer & Dobler 2010).

O transporte e comércio de aves vivas, domésticas, silvestres/migratórias, exóticas, entre outras, têm sido envolvido na disseminação de agentes etiológicos e potencialmente os arbovírus (Shortridge, KF & Burrows 1997).

A variação da pluviosidade também contribui para a proliferação de mosquitos vetores. O aumento da frequência de chuvas implica no aumento de coleções hídricas aumentando a oferta de criadouros naturais ou artificiais para mosquitos fêmeas depositarem seus ovos. Além disso, as chuvas podem tornar a umidade do ar mais propícia ao desenvolvimento e às atividades dos insetos vetores (Gomes 2002).

O maior risco de doença humana vem da capacidade de alguns arbovírus, que se desenvolvem naturalmente em um ciclo de transmissão silvestre, amplificarem e se adaptarem a ciclos urbanos ou periurbanos, enzoóticos envolvendo hospedeiros vertebrados urbanos e vetores antropofílicos, como populações de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* ou *Culex* spp. (Weaver & Reisen 2010).

Embora muitos arbovírus não tenham comprovada ação patogênica em humanos ou animais, o grande número de arbovírus conhecidos fornece um recurso imenso para o surgimento de novos patógenos no futuro (Liang et al. 2015).

Os arbovírus são uma ameaça global de saúde pública, em virtude de sua crescente dispersão territorial e necessidade de ações de prevenção e controle cada vez mais complexas (WHO 2009).

Muitos arbovírus negligenciados, relevantes para saúde pública estão sendo evidenciados crescentemente no mundo. Entre eles estão o VEEV, vírus da encefalite equina do leste (EEEV) (Nassar et al. 1997), vírus oropouche (OROV) (Vasconcelos et al. 1998), vírus rocio (ROCV), vírus cacipacoré (CPCV) (Lopes et al. 2014, Mota et al. 2016), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (Mansfield et al. 2009), vírus bussuquara (BSQV), (Figueiredo 2000) vírus ilhéus (ILHV), JEV (Erlanger et al. 2009), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) (Terzian et al. 2011) e WNV (BRASIL 2014, Vieira et al. 2015).

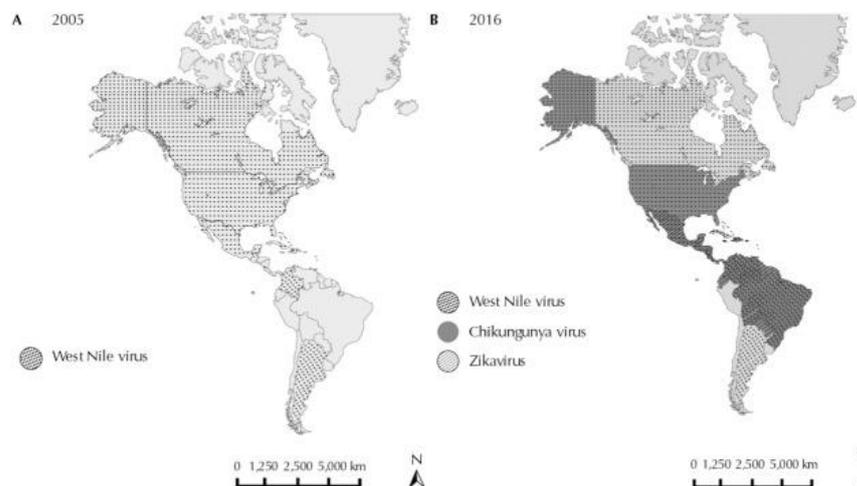
1.1.5 Arboviroses de importância médica no Brasil

O Brasil é constituído por uma grande extensão terrestre (8.512.000 km²) e a maior parte do país tem um clima tropical. O país possui uma grande diversidade biológica e um alto endemismo de espécies diversas contendo cerca de um décimo da biodiversidade mundial. Essa riqueza está distribuída no território nacional em seis biomas continentais: Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Pampa, os quais são caracterizados pela uniformidade do ambiente, de acordo com o clima, a fitofisionomia e o solo (Urbinatti et al. 2001). O Brasil ainda possui grandes cidades, densamente povoadas e infestadas por mosquitos antropofílicos. Essas características ecológicas e sócio econômicas, fazem do Brasil o cenário ideal para a ocorrência de arboviroses (Figueiredo 2000, 2007, Guedes 2012).

As cidades brasileiras também abrigam parques que são comumente frequentados pela população para atividades de lazer, que são áreas importantes para a proteção e conservação da biodiversidade, com presença de lagos, fontes e outros locais que podem servir de refúgio para mosquitos que infestam a área urbana, bem como presença de potenciais hospedeiros vertebrados amplificadores de arbovírus, como aves e mamíferos (Whately 2008).

No Brasil, os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, com predomínio nas regiões tropicais, que oferecem condições ecológicas favoráveis. Trinta e quatro dos 200 arbovírus e outros vírus de vertebrados identificados na Amazônia brasileira são comprovadamente patogênicos para o homem (Travassos da Rosa et al. 1989). Entre os principais arbovírus responsáveis por epidemias no Brasil estão os flavivírus YFV e DENV e mais recentemente ZIKV, os alfavírus CHIKV e vírus Mayaro (MAYV) e o bunyavírus OROV. Depois da introdução no Caribe de CHIKV em 2013 e de ZIKV no Brasil em 2015, o país vem sofrendo epidemias não só por esses dois arbovírus, mas também por DENV e YFV (Figura 2) (Lima-Camara 2016, Paniz-Mondolfi et al. 2016).

Figura 2: Arbovírus emergentes nas Américas.



Distribuição de WNV (pontilhada), CHIKV (cinza escuro) e ZIKV (cinza claro):
(A) em 2005, e (B), em 2016.

Fonte: (Lima-Camara 2016).

1.1.6 Família *Flaviviridae* gênero *Flavivirus*

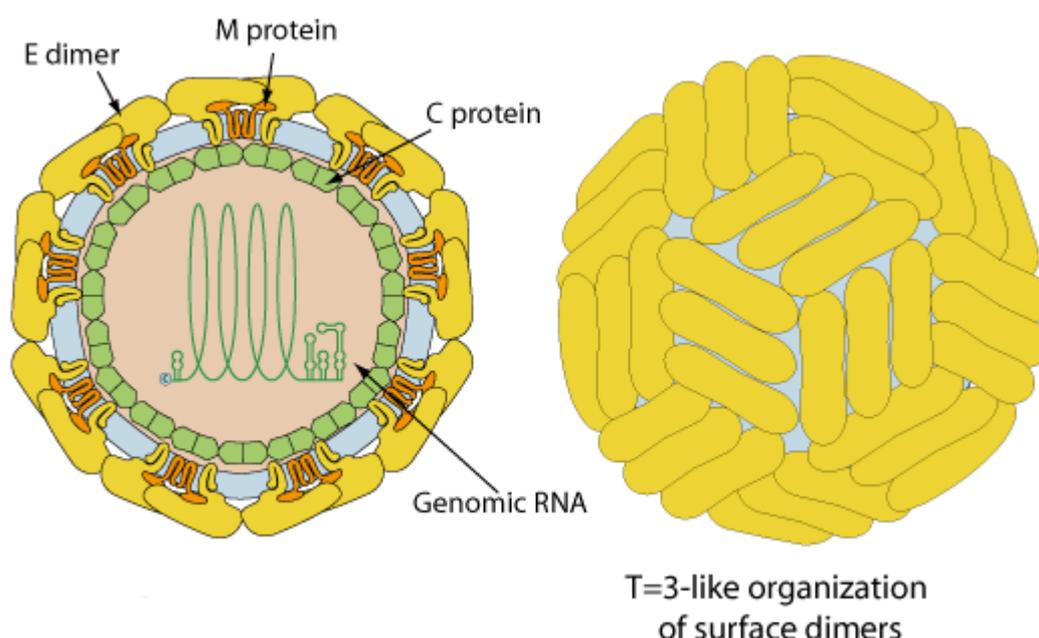
A família *Flaviviridae* compreende os gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*, no entanto, apenas *Flavivirus* contém arbovírus (Simmonds, P., Becher, B., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T. 2017).

Os flavivírus são vírus envelopados, icosaédricos e apresentam um genoma RNA composto por uma fita simples de polaridade positiva de aproximadamente 11000 nucleotídeos. Apresentam três proteínas estruturais (capsídeo [C], envelope [E], e pré-Membrana/membrana [prM/M]) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), responsáveis por funções como a replicação, virulência e patogenicidade. A proteína do capsídeo (C) é responsável pela estrutura da partícula viral, se liga fortemente às moléculas de RNA (Chambers et al. 1990).

A glicoproteína prM faz parte da estrutura dos virions imaturos e sua clivagem, gera a proteína M, antes da extrusão viral da célula hospedeira. E a proteína M está relacionada à organização da estrutura superficial e na infectividade do vírus (Chambers et al. 1990, Lorenz et al. 2002)

A proteína de envelope (E) é a maior proteína estrutural do virion, responsável pelas principais propriedades biológicas do ciclo viral, induz resposta imune protetora, sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes (Chen et al. 1997, Modis et al. 2005). Sua estrutura consiste de um dímero, no qual cada monômero tem 3 domínios. Embora todos os domínios contêm epítomos envolvidos em neutralização e inibição da hemaglutinação, somente o domínio II contém epítomos de reação cruzada entre os flavivírus (Figura 3) (Chambers et al. 1990).

Figura 3: Estrutura viral dos flavivírus



Fonte: (ViralZone 2016)

A partir de testes sorológicos baseados nos determinantes antigênicos da proteína E, os flavivírus, apesar de relacionados se diferem antigenicamente e foram classificados em oito complexos antigênicos, incluindo o complexo DENV, complexo da TBEV, complexo da JEV e complexo YFV (Calisher & Karabastos 1988, Lindenbach et al. 2001).

Testes sorológicos como inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento (FC) e neutralização (NT), classificavam os gêneros *Flavivirus* e os *Pestivirus* como membros da família *Togaviridae*. Posteriormente, baseado em estudos genéticos, morfológicos e em características de replicação, os flavivírus

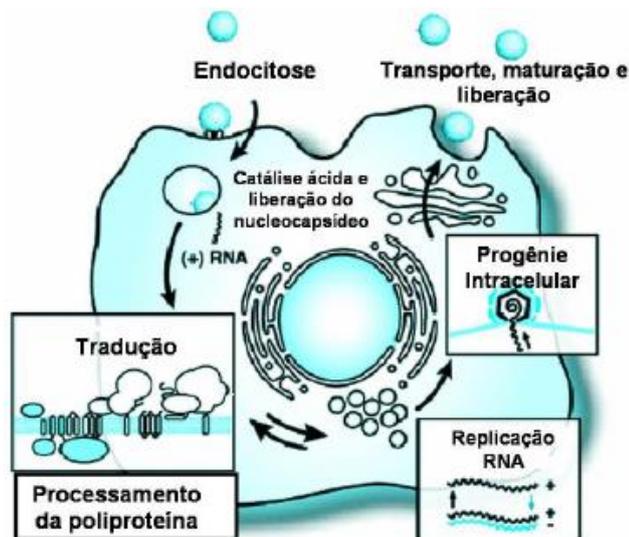
foram classificados em um grupo distinto. A partir de 1984, o gênero *Flavivirus* passou a fazer parte da família *Flaviviridae*. O termo *Flavus*, em latim, significa amarelo, referenciando a icterícia decorrente de grave disfunção hepática causada pelo YFV (Lindenbach et al. 2001).

1.1.7 Replicação dos flavivírus

Após serem inoculados através da picada de um artrópode infectado, os flavivírus se replicam em tecidos locais e linfonodos regionais, e chegam à corrente sanguínea através da circulação linfática levando à viremia. Os flavivírus podem se replicar em uma grande variedade de células, de diferentes tecidos, dependendo do hospedeiro. Estes tecidos incluem neurônios, células gliais, células do baço, fígado, coração linfonodos e pulmões (Castillo-Olivares & Wood 2004).

Brevemente, a infecção se inicia com a ligação e penetração por endocitose do vírion aos receptores celulares. O pH ácido do endossoma promove a mudança conformacional da proteína E possibilitando a fusão de membranas e liberação do material genético viral no citoplasma, replicação e tradução das proteínas estruturais e não estruturais virais. A replicação do RNA genômico inicia-se pela síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa pelo RNA polimerase, posteriormente formando novas fitas de RNA de polaridade positiva e montagem de novas partículas virais, próximo ao retículo endoplasmático. Nos novos vírions formam-se os capsídeos com a proteína C, sendo nesta fase, partículas imaturas, compostas de proteínas virais de membrana (prM e E) ligadas à membrana do retículo endoplasmático. Estas partículas produzidas são liberadas na célula hospedeira, tornando-se maduras após a clivagem do “pr” da partícula viral (Figura 4) (Lindenbach et al. 2001, Maeda & Maeda 2013, Lopes et al. 2014).

Figura 4: **Replicação dos flavivírus na célula hospedeira**



Fonte: Adaptado de Lindenbach et al. 2001

1.1.8 Patogenia e manifestações clínicas dos flavivírus

Assim como para as mais de 100 espécies de arbovírus que causam infecção em humanos e animais domésticos, a maioria das infecções por flavivírus não leva ao desenvolvimento de quadro clínico. Quando clínica, as infecções podem evoluir desde uma síndrome inespecífica, com regressão espontânea em uma a duas semanas até a forma hemorrágica ou neuroinvasiva podendo deixar sequelas ou até mesmo levar à morte (Casseb et al. 2013).

Os flavivírus variam amplamente o seu potencial patogênico. Grande parte deles produz doença em humanos e muitos são patogênicos para diferentes espécies animais como aves, suínos equinos, caninos, entre outras. Estes vírus podem ser divididos em categorias: os que produzem infecção no sistema nervoso central (SNC), acompanhada de meningoencefalite, entre eles o WNV, ROCV e SLEV, e os associados com febre hemorrágica, incluindo entre outros YFV e DENV (Lindenbach et al. 2001, Flores & Weiblen 2009a).

Entre os animais domésticos, os equinos estão entre as espécies susceptíveis à infecção clínica por arbovírus. Diversos arbovírus estão envolvidos principalmente em desordens neurológicas em equinos, que muitas vezes podem evoluir para o óbito. Entre estes arbovírus estão o EEEV, WEEV, VEEV, JEV e WNV (Petersen & Hayes 2008, Weaver & Reisen 2010, Liang et al. 2015). Os sinais clínicos em equinos mais comumente relatados podem incluir hipertermia ataxia, alterações de

comportamento, depressão, hiperexcitabilidade, anorexia, fraqueza, incoordenação, paresia ou paralisia de um ou vários membros e decúbito. Manifestações motoras como bruxismo, espasmos, fasciculações, tremores e convulsões também são relatados (Saegerman et al. 2016).

As manifestações clínicas observadas durante infecção clínica por diversos arbovírus podem ser muito parecidas o que dificulta o diagnóstico clínico dessas arboviroses (Lima-Camara 2016). Além disso, ainda não se conhece profundamente os desdobramentos da associação desses arbovírus em um mesmo animal, fato possível de ocorrer por estes coabitarem, muitas vezes, a mesma região geográfica e serem transmitidos pelos mesmos vetores (Roth et al. 2014).

1.1.9 Diagnóstico laboratorial

Para realização do diagnóstico das infecções por arbovírus são utilizadas técnicas de detecção viral direta e indireta. Entre as técnicas de detecção direta estão as provas moleculares, baseadas na detecção de fragmentos do genoma viral como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o isolamento viral, que se baseia na detecção de replicação viral em diferentes sistemas hospedeiros, como por exemplo, em cultura de células. O isolamento viral pode ser realizado através da propagação em cultura de células suscetíveis, como células de rim de coelho (RK-13), células de rim de macaco (VERO), células de mosquitos (C6/36) e ovos de galinha embrionados. Nos arbovírus, a evidência direta da replicação viral na cultura celular ocorre através da observação do efeito citopático. (Castillo-Olivares & Wood 2004).

A PCR, quando comparada ao isolamento viral em cultura de células, oferece maior sensibilidade e celeridade. O DNA amplificado, após a transcrição reversa utilizada para a grande maioria dos arbovírus que são compostos por RNA, pode ainda ser sequenciado para estudos moleculares. De um modo geral o diagnóstico molecular pela detecção do genoma viral em amostras clínicas de pacientes e animais infectados por flavivírus é priorizado para detectar infecções em fase aguda (Lanciotti 2003, Castillo-Olivares & Wood 2004). Na fase inicial da infecção, ocorre a replicação e consequente viremia que pode variar de 4 a 9 dias (Ratterree et al. 2004, Erra et al. 2013) A viremia do WNV é caracteristicamente baixa sendo,

portanto, a detecção de IgM por sorologia mais indicada para diagnóstico de casos clínicos humanos (Zeinad et al. 2004).

Os métodos convencionais de PCR apesar de oferecerem maior sensibilidade, apresentam maior risco de contaminação proveniente da excessiva manipulação do material podendo gerar resultados falso-positivos. A técnica em tempo real diminui consideravelmente a contaminação, já que a amplificação e detecção do material amplificado ocorrem simultaneamente dentro do equipamento (Higuchi et al. 1992).

Entre os testes indiretos estão as provas sorológicas, que se baseiam na detecção de anticorpos específicos, como por exemplo, os testes de inibição da hemaglutinação (HI), fixação de complemento (FC), imunofluorescência, (IF), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e soroneutralização (NT) como o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) (Travassos da Rosa et al.1994). Cada um dos testes avaliam diferentes atividades de anticorpos (WHO-World Health Organization 2007).

Durante a infecção pelos flavivírus o hospedeiro passa a produzir imunoglobulina M (IgM) na fase aguda e na fase convalescente os níveis de imunoglobulina G (IgG) no sangue começam a subir e persiste nos animais infectados (Lindenbach et al. 2001, Ratterree et al. 2004).

Uma questão crítica sobre a especificidade destes testes sorológicos são as reações cruzadas com outros flavivírus, principalmente em infecções secundárias, com particular importância nas áreas em que a co-circulação de vários flavivírus ocorrem (Kuno 2003).

Os anticorpos detectados por HI e NT são de aparecimento mais precoce e persistem por mais tempo do que os anticorpos detectados por FC. Anticorpos neutralizantes podem ser detectados por longos períodos assim como os anticorpos inibidores da hemaglutinação (Goés & Bruno-Lobo 1961). Com relação à especificidade, os anticorpos detectados por HI são os menos específicos, principalmente entre os flavivírus e também alfavírus, ocorrendo amplas reações de grupo. Os anticorpos detectados por FC também apresentam reação cruzada, mas são mais específicos que HI. Os anticorpos detectados por NT são os que apresentam maior especificidade (Casals 1957).

O HI é realizado de acordo com a capacidade aglutinante de hemáque os flavivírus apresentam, deste modo, sabendo que a capacidade de hemaglutinação do vírus é bloqueada pela reação do vírus com o anticorpo específico, não ocorrerá

hemaglutinação de hemácias adicionadas a esse sistema na presença de anticorpos específicos (Kuno 2003).

O PRNT apresenta uma maior especificidade, e por esta razão considera-se como o "padrão ouro" para a detecção de anticorpos para flavivírus. Anticorpos neutralizantes podem ser determinados por testes *in vitro*. O PRNT pode ser realizado em cultura de células e fundamenta-se no princípio de que vírus infecciosos, quando reagem com o anticorpo específico, são neutralizados e, portanto, perdem a capacidade de infectar e causar efeito citopático em células permissivas. No entanto, o PRNT é uma técnica laboriosa que requer insumos específicos e corpo técnico treinado, não sendo portanto um teste adequado para ser utilizado em larga escala em sistemas de vigilância e investigação ativa (Roehrig et al. 2008).

Dos testes sorológicos apropriados para a triagem de anticorpos, ELISA é o formato usado mais amplamente, como é versátil, reproduzível e fácil de padronizar, proporcionando uma vigilância mais rápida para o monitoramento da circulação de arbovírus (Blitvich et al. 2003b).

O ELISA é um método imunológico de quantificação da concentração de anticorpos que é revelada através da ligação covalente de uma molécula indicadora à uma enzima que transforma um substrato límpido em um produto colorido (Abbas & Lichtman 2005). Este método pode detectar tanto IgM quanto IgG e é muito utilizados para distinguir infecções primárias e secundárias pela relação entre IgM e IgG, como por exemplo para diagnóstico de DENV (Kuno et al. 1991).

O ELISA de captura para IgM (MAC-ELISA) é específico em casos de infecção primária, mas reações cruzadas podem ocorrer em casos de exposição prévia a outros flavivírus (Monath TP 2004).

Diferentes métodos de ELISA para detecção de anticorpos foram desenvolvidos. No entanto, para a utilização da técnica durante uma vigilância sorológica envolvendo um grande número de espécies, são necessários anticorpos secundários específicos para as diferentes espécies em teste. Como alternativa, está o ELISA de bloqueio de epítomos que não necessita de múltiplos anticorpos secundários. Em testes de vigilância em locais que os flavivírus coexistem, o ELISA de bloqueio de epítomo é utilizado com sucesso para a diferenciação destas infecções.

1.2 Flavivírus no Brasil

Entre os flavivírus de maior importância médica no Brasil estão o WNV, SLEV, YFV, DENV, ZIKV, ILHV e ROCV (Travassos da Rosa, APA, Travassos da Rosa, JFS, Pinheiro, FP & Vasconcelos 1997, Lima-Camara 2016).

1.2.1 Vírus do oeste do Nilo (WNV).

O WNV foi isolado pela primeira vez em 1937 no Distrito do Nilo Ocidental no noroeste de Uganda. O vírus foi isolado de uma paciente levemente febril durante uma investigação para o YFV (Smithburn et al. 1940). Vários surtos subsequentes ocorreram na África, Ásia e Europa em sua maioria caracterizada por síndromes febris inespecíficas. O WNV passa a ser considerado um vírus de maior relevância médica em 1996, numa grande epidemia de encefalite em Bucareste, Romênia (Tsai et al. 1998).

Alguns anos depois, WNV passa a ser questão de saúde pública também nas Américas, quando em 1999 é detectado pela primeira vez no ocidente causando quadros de encefalite humana e desordem neurológica em aves na cidade de Nova York, EUA. Desde então, WNV passou a ser detectado em toda a América do Norte, Central e Sul e hoje é considerado o agente causal mais importante de encefalite viral em todo o mundo (Chancey et al. 2015).

Entre o final de agosto e início de setembro de 1999, em Nova York e áreas adjacentes ocorreu um surto de encefalite viral que causou sete mortes com 62 casos confirmados. Embora os casos humanos fossem documentados na cidade de Nova York, concomitante com este surto, envolvendo uma região muito mais ampla, as autoridades de saúde locais observaram o aumento da mortalidade entre as aves (especialmente corvos) e cavalos. A causa do surto foi demonstrada ser pelo WNV, baseado em testes sorológicos e mapeamento de sequências genômicas detectadas em seres humanos, aves e mosquitos (Anderson et al. 1999, Jia et al. 1999, Lanciotti et al. 1999, Petersen & Hayes 2008). Em três anos, a doença se encontrava disseminada praticamente por todo território norte americano, incluindo Canadá e ilhas Cayman (Lanciotti et al. 2000).

A primeira evidência de WNV na América do Sul ocorreu em 2004, através da detecção de anticorpos específicos para WNV em cavalos na Colômbia e em 2006

na Venezuela (Mattar et al. 2005, Bosch et al. 2007). No mesmo ano, o vírus foi isolado pela primeira vez na América do Sul a partir de amostras de cérebro de três cavalos em diferentes locais da Argentina que morreram de encefalite (Morales et al. 2006). Em 2008, WNV é novamente isolado a partir de flamingos aparentemente saudáveis de um zoológico na Colômbia. (Osorio et al. 2012)

No Brasil, uma maior investigação para circulação de WNV foi iniciada em 2002 a partir de inquéritos sorológicos realizados em aves capturadas no litoral do RS (MS, SVS 2003) e do estado do Rio Grande do Norte (MS, SVS 2004). Entretanto, todos os resultados foram negativos e a primeira evidência da circulação de WNV no Brasil veio a ser reportada apenas em 2011, quando equinos hígidos do Pantanal de Mato Grosso do Sul apresentaram anticorpos neutralizantes específicos para WNV (Pauvolid-Corrêa et al. 2011). Desde então, evidências da circulação de WNV vem sendo reportadas em equinos assintomáticos no Brasil de outras localidades como também no estado de Mato Grosso (MT), no nordeste e no sul do RJ (Araújo et al. 2004, Silva 2010, Melandri et al. 2012) Apesar destas evidências sorológicas, apenas em 2015 WNV foi reportado como agente causador de desordem neurológica no Brasil, quando um agricultor com encefalite foi diagnosticado sorologicamente para WNV no Piauí (Vieira et al. 2015).

Infecções por WNV em equinos possuem taxas de mortalidade que variam entre 25 e 45%. Animais que sobrevivem duas a três semanas após o aparecimento dos sinais geralmente se recuperam (Ward et al. 2006, Flores & Weiblen 2009b). A infecção por WNV em equinos se inicia com uma viremia baixa e passageira podendo evoluir para encefalite em aproximadamente 3 a 15 dias (Bunning et al. 2002). A doença em cavalos é caracterizada por apresentarem ataxia, fraqueza, fasciculação muscular, debilidade generalizada, incoordenação dos membros e déficit de nervo craniano (Trock et al. 2001). Sendo que a maioria dos cavalos infectados não apresenta sinais clínicos (Ostlund et al. 2001).

O grande impacto causado pelas epidemias nos EUA impulsionou a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas para uso humano e animal. Até 2007 já existiam vacinas convencionais inativadas, atenuadas e recombinantes desenvolvidas e testadas em equinos, sendo quatro vacinas licenciadas. Em geral, as vacinas conferem boa proteção contra a doença clínica e reduzem os níveis de viremia (T et al. 2003). A vacina que se apresentou mais eficaz, contém o poxvírus do canário, expressando as glicoproteínas do envelope do WNV. Esta vacina foi capaz de proteger de viremia 100% dos eqüinos desafiados 30 dias após a vacinação e 90%

daqueles desafiados um ano após a imunização, sendo que nenhum animal desenvolveu sinais clínicos (Minke et al. 2004). Vacinas para uso humano e em aves domésticas de importância econômica também estão em desenvolvimento e podem ser licenciadas nos próximos anos (Van Der Meulen et al. 2005).

1.2.2 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)

O SLEV foi primeiramente isolado e identificado como causador das encefalites humanas, durante uma epidemia em 1933, na cidade de Saint Louis, Missouri, EUA. Relacionou-se o aumento do número de casos com a alta infestação de mosquitos vetores do gênero *Culex* (Lumsden 1958). A constatação de que os vetores seriam mosquitos do gênero *Culex* e que as aves do peridomicílio manteriam e amplificariam o vírus, ocorreu em uma epidemia em Washington em 1941 e 1942 (Hofmeister 2011).

A disseminação ocorreu ao longo do Norte e América do Sul com ocorrência conhecida na Argentina e no Brasil desde 1960, com surtos relatados em 2005 na Argentina e em 2006 no Brasil (Kopp et al. 2013)

Ao contrário do WNV que tem a sua origem conhecida a partir do Velho Mundo, a origem de SLEV é obscura. Atualmente, sabe-se que a linhagem do vírus que se encontra em propagação surgiu na América Central no século 17, junto as grandes ocupações humanas em áreas de floresta.

No Brasil, o SLEV foi primeiramente isolado em 1960 em um pool de mosquitos coletados na estrada Belém-Brasília (Vogel et al. 2005). No estado de São Paulo, entre 1967 e 1969, oito isolamentos dos vírus foram obtidos em roedores, aves e ratos sentinela (Lopes et al. 1979). Na década de 1980, pequenas epizootias causadas por SLEV envolvendo aves silvestres e animais sentinelas ocorreram no Estado do Pará. Com relação a população humana, SLEV já foi detectado em 1978 de um paciente no Pará (Pinheiro et al. 1981), em 2004 de uma paciente na cidade de São Paulo, inicialmente com suspeita clínica de Dengue (Rocco et al. 2005) e durante uma epidemia de dengue em São José do Rio Preto em 2006, foi descrito inclusive em um caso de co-infecção com DENV-3 (Mondini et al. 2007). Atualmente, SLEV se encontra disseminado na América do Norte até o sul da Argentina. (Beltrán et al. 2014).

Inquéritos sorológicos realizados entre 2005 e 2007 em equinos no Brasil sugerem a circulação de SLEV em equinos da Amazônia, Pantanal de Mato Grosso do Sul e no sul do RJ (Rodrigues et al. 2010, Pauvalid-Corrêa et al. 2010, Pauvalid-Corrêa et al. 2014, Silva et al. 2010). Em 2013, foi descrito o primeiro isolamento de SLEV em equino com desordem neurológica (Rosa et al. 2013). Apesar das evidências sorológicas em equinos, e o caso reportado em Minas Gerais, normalmente o SLEV não está relacionado a manifestações clínicas nesta espécie (Rosa et al. 2013).

Alguns inquéritos sorológicos realizados em amostras de soro de equinos em diversos estados do Brasil já comprovaram a intensa co-circulação de flavivírus. Em 2009, no mesmo estudo realizado no Pantanal e Mato Grosso do Sul, em que foi reportado pela primeira vez evidências sorológicas de WNV no país através de soros de cavalos, foram evidenciados 55% de soropositivos para flavivírus entre as amostras coletadas, também foi detectado soropositividade para SLEV, ILHV e CPCV (Pauvalid-Corrêa et al. 2011).

1.2.30 RJ e a circulação de flavivírus

O RJ localiza-se na região sudeste do Brasil (22 ° 54'S, 43 ° 10'W) possui 43.781,566 Km² de área, dividido em 92 municípios (IBGE 2015). A vegetação predominante é a Mata Atlântica. Destaca-se pelas paisagens diversificadas apresentando três unidades de relevo: regiões de baixada e planalto, e os maciços costeiros (CEPERJ 2016).

Uma mesorregião é uma subdivisão dos estados brasileiros que congrega diversos municípios dentro de uma região com similaridades econômicas e sociais. As seis mesorregiões do RJ são: Baixadas, Centro Fluminense, Metropolitana, Noroeste Fluminense, Norte Fluminense e Sul Fluminense (CEPERJ 2011).

O RJ possui um clima quente com áreas úmidas, semi-úmidas e, até, secas e uma temperatura média anual de 24° C. Com chuvas em quase todos os meses do ano nas áreas úmidas e nas semi-úmidas, com períodos de mais de sete meses de muito pouca chuva nas épocas secas. A temperatura e a distribuição das chuvas pelos meses do ano variam, principalmente, de acordo com o relevo e a proximidade do mar. Quanto mais alto, mais baixa é a temperatura. Quanto mais perto do mar, mais amena. Desta forma, percebem-se vários tipos de clima, destacando-se o tropical e o tropical de altitude (CEPERJ 2016).

Cerca de 30 espécies de aves migram para a América do Sul, e permanecem geralmente de setembro a maio, através de umas das diversas rotas migratórias do Brasil, sendo a Rota Atlântica, a principal, que percorre toda extensão da costa brasileira, do Amapá até o RS. Somente o RJ conta com quatro principais áreas de concentração de aves migratórias do Brasil, são elas a Restinga de Maçambaba, ilha de Cabo Frio, Lagoa da Ribeira e Lagoa Feia, que se localizam dentro das mesorregiões norte fluminense e das baixadas litorâneas (ICMCBio 2014).

O Brasil tem o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial, com cerca de oito milhões de cabeças (MAPA 2016) produzindo uma movimentação financeira em torno de R\$ 16,15 bilhões anuais e ocupação direta de cerca de 607 mil pessoas podendo chegar a 3 milhões de pessoas se considerados os empregos indiretos. Nos últimos anos houve um forte crescimento das criações voltada para o público urbano, tanto para lazer quanto para esporte além dos animais direcionados para lida, em geral associados à bovinocultura. Crescendo também o número e tamanho dos eventos, como provas de tambor e baliza, vaquejadas e tantos outros (Lima & Cintra 2015). De acordo com a Pesquisa Pecuária Municipal realizada em 2015, no RJ totalizam 100.220 cabeças de equinos, distribuídos nas mesorregiões geográficas, divididos em diferentes tipos de criação, raças, e atividades que desempenham (Tabela 1) (IBGE 2015b).

Tabela 1: Efetivo de rebanho equino por Mesorregião Geográfica no RJ em 2015 e percentual em relação à população total

Mesorregião	Efetivo rebanhos	% Em relação à população total
Metropolitana	28.356	28,3%
Noroeste Fluminense	20.564	20,5%
Norte Fluminense	19.925	19,9%
Baixadas litorâneas	11.213	11,2%
Centro Fluminense	9. 621	9,6%
Sul Fluminense	10.541	10,5%
Total:	100.220	100%

A vegetação do RJ é constituída por formações diferenciadas, que inclui a floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, floresta estacional semidecidual, áreas de formações pioneiras (restingas e manguezais), vegetação xeromórfica e refúgios ecológicos (Veloso et al. 1991)

Encontra-se no planalto, sobretudo nas áreas de relevo mais acidentado, áreas remanescentes de floresta, conhecida como Mata Atlântica, que antes cobria quase todo o território do Estado (CEPERJ 2016). As condições ecológicas e ambientais da mata Atlântica favorecem um conjunto diversificado de mosquitos, incluindo espécies que são vetores potenciais de patógenos humanos e animais. Estudos realizados nesta floresta dentro da região sudeste, indicam ampla distribuição espacial desses mosquitos a alta exposição dos indivíduos às picadas (Laporta et al. 2012).

Devido aos processos históricos de ocupação e uso econômico da costa brasileira, a Mata Atlântica com alta taxa de desmatamento e degradação de seus ambientes tem levado ao desaparecimento de várias espécies tanto da flora quanto da fauna. Essas ações resultaram na fragmentação do hábitat e isolamento das áreas remanescentes (Tanizaki-Fonseca & Moulton 2000). A Mata Atlântica está entre os cinco *hotspots* mais importantes de biodiversidade, ou seja, entre as regiões mais ricas e ameaçadas do planeta. Atualmente concentra os maiores fragmentos florestais concentram-se nas cadeias montanhosas da Serra do Mar acima de 500 m. Analisando em conjunto com os fragmentos menores estima-se que tenha restado cerca de 8.000 km² de florestas (Tanizaki-Fonseca & Moulton 2000). Dados levantados pelo SOS Mata Atlântica em 2000 apontaram uma área correspondente a 16,7% do RJ ocupada pelo que restou da Mata Atlântica, sendo que 29,8% encontram-se em Unidades de Conservação (SOSMA 2013).

No litoral do RJ existem outros tipos de cobertura vegetal, como os manguezais e a vegetação existente nas praias, restingas e dunas. As baixadas estão entre o planalto e o oceano, entremeando-se também pelas colinas e maciços costeiros, que são elevações dentro destas áreas das baixada (CEPERJ 2016).

Nos últimos anos, particularidades ocorreram no RJ, como desenvolvimento da exploração de petróleo e gás que incluíram as mesorregiões norte e baixadas litorâneas levando-as a um alto impacto ambiental tanto pela atividade como também pelo aumento do crescimento demográfico (particularmente urbano), promovendo com isso uma pressão importante ao meio ambiente. Além disso, a urbanização na região das baixadas litorâneas se intensifica na faixa costeira, ameaçando não apenas as restingas, mas também as praias, os manguezais e as lagoas. Mais intensamente na região norte fluminense, fazendas adjacentes invadem e assoreiam partes da lagoa para incorporar terras. Há também o crescimento imobiliário intenso, com ameaças constantes de construção, que

utilizam a faixa de areia e vegetação próxima à praia. Outro fator de pressão no RJ é um gasoduto que atravessa oito municípios do RJ entre Macaé e Duque de Caxias (Valente et al. 2011).

Desde a década de 1980 no RJ, enfrenta-se de forma quase ininterrupta, sucessivas epidemias de DENV que, desde então, vêm surgindo com a entrada e circulação de todos os quatro sorotipos, e o estabelecimento de uma situação de hiperendemicidade dramaticamente demonstrada. Hoje, com o aparecimento do ZIKV e CHIKV há a co-circulação de pelo menos três arbovírus onde se convive com falhas na prevenção, dependentes de aspectos de saúde, macroestruturais, socioeconômicos e ambientais (Valle et al. 2016).

Nos anos que ocorreram o início das epidemias de DENV no período de 1986 a 2003, temperaturas mostraram-se significativamente mais altas durante o verão que nos demais anos, sugerindo ser a temperatura um fator crítico para o início das epidemias (Câmara et al. 2009). A relação entre a temperatura e a transmissão de patógenos, como as doenças transmitidas por vetores, ganhou atenção significativa considerando o grave impacto que o aumento da temperatura global pode impactar na transmissão de algumas doenças (Patz et al. 2005, Barcellos et al. 2009). Assim como o aumento da competência dos vetores para vários outros flavivírus quando se encontram em temperaturas elevadas, WNV tem o ciclo de replicação elevado nos vetores em temperaturas mais elevadas, aumentando a cinética de disseminação e transmissão (Kilpatrick et al. 2008).

A circulação de SLEV e WNV em equinos do RJ ainda é pouco conhecida, com estudos realizados em Resende (Silva et al. 2014). Na década de 1970, um inquérito sorológico realizado com crianças em idade escolar no RJ detectou a presença de imunoglobulinas anti-SLEV em 3% do grupo avaliado (Pinheiro et al. 1975).

Casos de desordem neurológica são comumente observados em equinos do estado sem confirmação diagnóstica. Considerando: 1) a significativa população de equinos no RJ; 2) a circulação de aves migratórias da Rota Atlântica provenientes da costa leste dos Estados Unidos em áreas de concentração no RJ; 3) evidências sorológicas da circulação de SLEV no RJ; e por fim 4) Relatos de casos de desordem neurológica de etiologia não esclarecida em equinos do RJ.

Estudos que visem utilizar equinos como marcadores para circulação de SLEV e WNV têm uma efetiva aplicação para vigilância destes arbovírus no estado. Investigações de circulação viral em animais podem ser consideradas importantes

indicadores para saúde pública, com o propósito de servir de alerta precoce para que medidas de controle possam ser adotadas pelas autoridades de saúde, tanto humana quanto veterinária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Evidenciar a exposição de equinos do RJ a SLEV e WNV.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Detectar anticorpos para SLEV e WNV em equinos do RJ;
- 2) Detectar a presença de flavivírus e especificamente WNV em amostras de soro e/ou líquido de equinos de propriedades acometidas por epizootia de desordem neurológica no RJ

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instituições participantes

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Referência Regional para Dengue e Febre Amarela (LABFLA) e contou com o apoio do setor de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas/Belém pela doação dos antígenos.

3.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos estão de acordo aos princípios éticos de experimentação animal, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC), sob protocolo 047/2015 e aprovação 07/2016.

Todas as coletas de sangue dos equinos foram feitas com o consentimento dos proprietários e/ou dos médicos veterinários responsáveis em todas as propriedades onde foram realizadas e contaram com a participação dos seus funcionários.

3.3 Armazenamento das amostras

As amostras de soro utilizadas no estudo foram coletadas a campo de equinos e posteriormente armazenadas a -70°C , no LABFLA.

3.4 Escolha das propriedades e dos animais

Para este estudo transversal foram selecionados por conveniência, estabelecimentos agropecuários com criação de equinos independente de sexo, raça e idade.

A escolha dos animais foi feita de forma não aleatória, ou seja, de acordo com a autorização dos seus proprietários e/ou responsáveis para a participação no estudo, sob ciência do propósito e implicações do mesmo. Após autorização, responderam um questionário (ANEXO A) com a finalidade de avaliar informações

sobre o perfil de criação dos cavalos, idade, sexo, evidências de sinais clínicos, vacinação, viagens, manejo da propriedade e outros prováveis fatores relacionados à exposição a flavivírus. Por estarem envolvidas tradicionais propriedades de criação de cavalos, com animais de grande performance e alto valor, para possibilitar a participação destes no estudo, sem prejudicar suas posições neste complexo do agronegócio do cavalo foi apresentado a cada uma, um termo de confidencialidade e sigilo, garantindo a não divulgação de qualquer tipo de identificação nem do animal e nem da propriedade (ANEXO B).

Mesmo sabendo das limitações em obter informações confiáveis dos responsáveis pelos animais, sobre o histórico de deslocamentos realizados, dentro do possível não foram selecionados equinos com histórico de viagem para outros estados e/ou região fora da abordada, afim de se obter uma informação relacionada somente a determinada região.

Os animais coletados foram principalmente cavalos sadios. Em duas propriedades, além da coleta de sangue em animais sadios, também foram coletadas amostras de dois cavalos que apresentaram desordem neurológica aguda, sem diagnóstico definido, tendo apenas sido descartada a raiva.

3.4.1 Critérios de inclusão

Equinos residentes no RJ, durante o período do estudo, independente de sexo, raça e idade, principalmente sadios como também aqueles que apresentam quadro clínico sugestivo de desordem neurológica, sob ciência e autorização de seus proprietários e responsáveis.

3.4.2 Critérios de não inclusão:

Equinos não residentes no RJ,

Equinos com histórico de viagem para outros estados e/ou região.

Equinos que não obtiverem autorização de proprietários e responsáveis para participação no estudo.

3.5 Cálculo e tamanho da amostra

O cálculo para o tamanho da amostra foi planejado tendo como referência o efetivo de equinos (cabeças) de acordo com Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2015 realizado com auxílio do programa openepi (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>). Frente a uma população estudada disponível de 100.220 equinos no RJ estimando a frequência de soropositividade em 50% (+-5%) e limite de confiança de 5%. Por este cálculo deveriam ser avaliados no mínimo, 383 animais, a fim de se obter um intervalo de confiança de 95%. No presente estudo foram avaliados 435 animais.

3.5.1 Constituição dos grupos

As amostras de soro colhidas foram agrupadas segundo a sua localização geográfica, sexo, idade, função e a fim de se verificar a influência desses fatores na ocorrência de anticorpos para WNV e SLEV.

Em relação ao número mínimo de amostras de soro de equinos coletados em cada Mesorregião Geográfica, foi considerado o percentual de animais que cada mesorregião participa na população total e calculou-se o mesmo percentual do valor calculado para o tamanho mínimo da amostra (383). Desta forma, as quantidades aproximadas mínimas de soro a serem coletados por região deveriam ser: 109 animais na Região Metropolitana, 79 no Noroeste Fluminense, 76 no Norte Fluminense, 42 nas Baixadas Litorâneas, 37 no Centro Fluminense e 40 no Sul Fluminense. Em algumas regiões, por ter ocorrido maior oportunidade de coletas, um número maior de animais foi coletado.

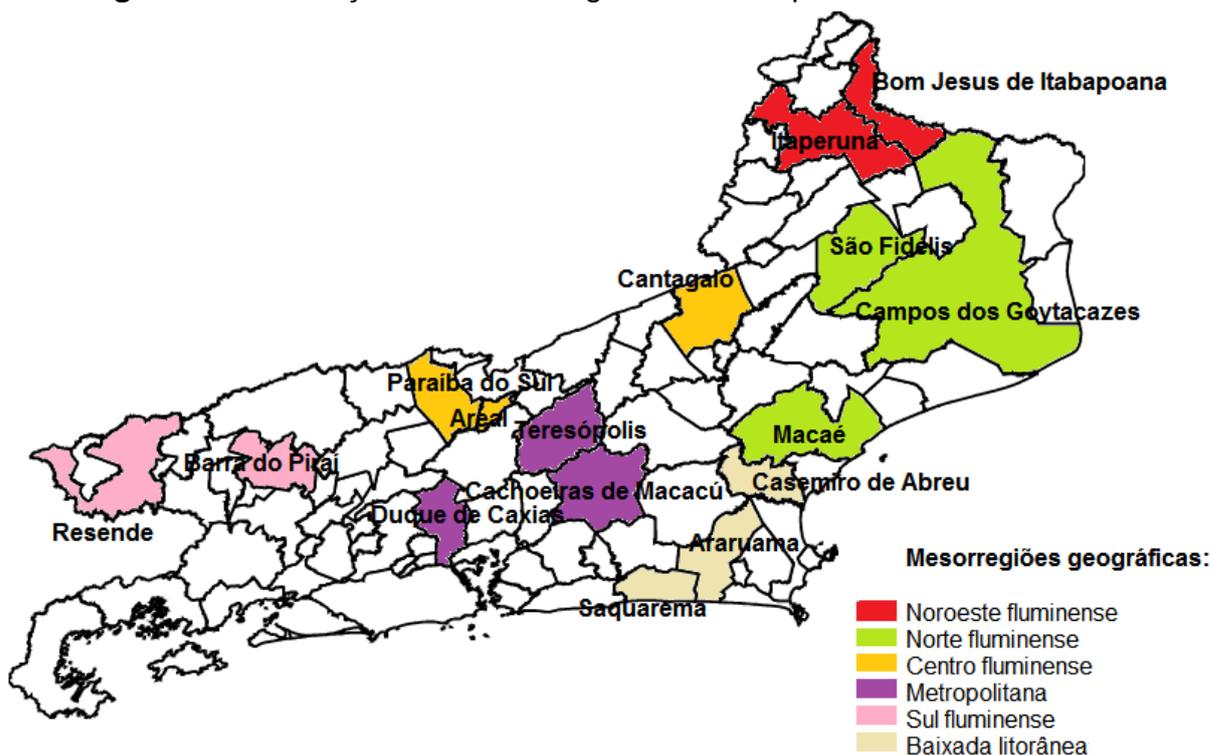
Na Região Metropolitana foram coletadas amostras de 114 animais, sendo 17 animais em Duque de Caxias, 43 em Teresópolis, 54 em Cachoeiras de Macacú. Na Região Noroeste Fluminense, foram coletadas de 79 animais sendo 38 soros em Bom Jesus do Itabapoana e 41 soros em Itaperuna. Na Região Norte Fluminense coletados 76 soros, sendo de 6 animais em Campos dos Goytacazes, 24 em São Fidelis e 46 em Macaé. Nas Baixadas Litorâneas, coletados 77 soros, sendo 22 em Araruama, 31 em Saquarema e 24 em Casemiro de Abreu. Na Região Centro Fluminense, 49 soros foram coletados, sendo 20 soros em Cantagalo, 16 em Paraíba do Sul e 13 em Areal. Na região Sul Fluminense, 40 soros foram coletados, sendo 17 soros coletados em Barra do Piraí e 23 animais coletados em Resende.

Um total de 20 propriedades do RJ, dentro de 17 municípios diferentes foram amostradas dividindo-se em 6 propriedades na região metropolitana, 2 propriedades na região noroeste fluminense 3 propriedades na região norte fluminense e 3 nas baixadas litorâneas 3 na região centro fluminense e 3 na região sul fluminense (Tabela 2, Figura 5).

Tabela 2: Número de propriedades e animais por propriedade coletados nas Mesorregiões e Municípios do RJ

Mesorregião	Municípios	Nº propriedades	Nº Animais	Total
Metropolitana	Duque de Caxias	1	17	114
	Cachoeiras de Macacú	3	54	
	Teresópolis	2	43	
Noroeste Fluminense	Bom Jesus do Itabapoana	1	38	79
	Itaperuna	1	41	
Norte Fluminense	Campo dos Goytacazes		6	76
	São Fidélis	111	24	
	Macaé		46	
Baixadas Litorâneas	Araruama	1	22	77
	Saquarema	1	31	
	Casemiro de Abreu	1	24	
Centro Fluminense	Cantagalo	1	20	49
	Paraíba do Sul	1	16	
	Areal	1	13	
Sul Fluminense	Barra do Piraí	2	17	40
	Resende	1	23	
Total:	17	20	435	435

Figura 5: Distribuição das Mesorregiões e Municípios amostrados no RJ.



Foram coletadas amostras de soro de 125 animais do sexo masculino e 310 animais do sexo feminino.

Com relação à faixa etária estes animais foram subdivididos em 5 grupos: Grupo 1: animais com idade igual ou inferior a 6 meses de idade (n=7), Grupo 2: animais acima de 6 meses e igual ou inferior a 24 meses de idade (n=63), Grupo 3: animais acima de 24 meses e igual ou inferior a 72 meses de idade (n=123), Grupo 4: animais acima de 72 meses e igual ou inferior a 120 meses de idade (n=133) e Grupo 5 constituído por animais com idade superior a 120 meses de idade (n=86). A idade dos animais foi determinada pelo responsável pelo animal no momento da colheita da amostra de sangue.

As atividades que os animais desempenhavam estavam divididas em: trabalho, esporte, lazer e reprodução desta forma, seis são animais usados para trabalho nas propriedades, como pecuária, tração, entre outros. Duzentos e dezoito animais desenvolvem diferentes modalidades de esportes, quarenta animais são destinados para lazer e cento e setenta e um para reprodução.

3.5.2 Amostras de animais com desordem neurológica aguda

Em duas propriedades amostradas para este estudo, na mesma ocasião das coletas houve a ocorrência de casos de desordem neurológica aguda inespecífica seguida de óbito em alguns animais.

Propriedade 1:

Propriedade localizada em região rural no município de Teresópolis, com criação de 22 equinos. Em agosto de 2015 ocorreram casos de desordem neurológica aguda sem diagnóstico definido em 12 animais, sendo um deles com evolução para óbito e o restante obtiveram resposta positiva à terapia de suporte terapêutico. Ocorreram relatos não confirmados de quadros semelhantes em propriedades próximas. Foram cedidas pelo médico veterinário responsável da propriedade, amostras de soro todos os 22 animais residentes no local (Tabela 3).

Propriedade 2:

Propriedade localizada em região rural no município de Saquarema, com criação de aproximadamente 60 animais apresentou em janeiro de 2016 casos de desordem neurológica aguda sem diagnóstico definido com evolução para o óbito em três cavalos que se encontravam agrupados em um piquete distante dos demais, dentro de uma área de vegetação densa e recém desmatada para preparação de piquetes. Foram coletadas amostras de um animal que ocorreu o óbito e mais 10 animais que compartilhavam o mesmo piquete (Tabela 3).

Tabela 3: Número de propriedades e animais com casos de desordem neurológica aguda por Mesorregiões e Municípios do RJ.

Mesorregião	Municípios	Nº propriedades	Nº Animais
Baixas Litorâneas	Saquarema	1	11
Metropolitana	Teresópolis	1	22
Total:		2	33

3.5.3 Coleta, processamento e armazenagem da amostra sanguínea

As amostras de sangue foram coletadas no período entre agosto de 2015 a outubro de 2016, envolvendo todas as estações, condições climáticas e ecológicas.

A coleta de sangue para obtenção de soro foi realizada através da punção da veia jugular externa, utilizando agulhas no calibre 25 x 0,8 mm acoplada a um dispositivo para coleta em tubo descartável a vácuo, tipo Vacutainer[®], de material de silicone, 15x100mm, com acelerador de coagulação e capacidade máxima de 10ml. Após a coleta, as amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente até a coagulação e completa retração do coágulo. O soro obtido foi separado após centrifugação e transferido para dois tubos. Um tubo para pesquisa de anticorpos e um outro tubo contendo 560 µl de AVL para testes moleculares. Os tubos foram identificados e transportados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável para o LABFLA onde foram mantidos a -70 C até o momento das análises.

3.5.4 Análises Laboratoriais

Antes de iniciarem os testes para pesquisa de anticorpos e vírus as alíquotas das amostras destinadas ao teste sorológico foram inativadas em banho maria a 56 °C por 45 min e congeladas a -20°C. As destinadas ao PCR em tempo real foram mantidas em tampão AVL a – 70°C até o momento da extração do RNA.

Todas as etapas seguintes envolvendo manipulação das amostras biológicas, foram realizadas com uso de barreiras de contenção primária através da utilização de equipamentos de proteção individual como jaleco, máscara, luvas e equipamentos de contenção coletiva como cabine de segurança biológica em laboratório de nível de segurança 2 (NB2).

3.5.5 Teste sorológico - Elisa de Bloqueio

Todas as amostras coletadas de soro dos equinos foram submetidas à técnica de ELISA de bloqueio para pesquisa de anticorpos anti-SLEV e anti-WNV (Blitvich et al. 2003a, b).

Este teste baseia-se na capacidade das imunoglobulinas do hospedeiro bloquearem a ligação de anticorpos monoclonais com o antígeno. Microplacas são sensibilizadas com antígeno seguido da adição dos soros testes, onde anticorpos

específicos quando presentes na amostra, ao se ligarem no antígeno previamente fixado à placa bloqueiam a ligação destes ao anticorpo monoclonal (MAb). Após a lavagem, o MAb não ligado ao antígeno é retirado não ocorrendo assim a reação colorimétrica desencadeada pela peroxidase, conjugada ao MAb, na última etapa do ensaio. Desta forma, as amostras positivas não apresentam reação colorimétrica (Blitvich et al. 2003a, b, Kitai et al. 2007)

Para a pesquisa de anticorpos para SLEV e WNV, as amostras de soro foram submetidas à técnica de ELISA de bloqueio em dois testes separadamente. Um teste em uma placa sensibilizada com antígeno de WNV e um segundo teste em outra placa sensibilizada com antígeno de SLEV. O mesmo MAb 6B6C-1 HRP (conjugado à peroxidase), reativo ao grupo dos flavivírus (Jackson Immuno Research), foi usado nos dois testes.

Os antígenos utilizados nos dois testes foram gentilmente cedidos pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC). De acordo com a informação técnica fornecida com o reagente, os antígenos foram preparados a partir de cérebros de camundongos infectados com os vírus, pela técnica de extração por sucrose-acetona (Casals & Brown 1954, Clarke & Casals 1958)

3.5.5.1 Cálculo da diluição do antígeno e do MAb 6B6C-1

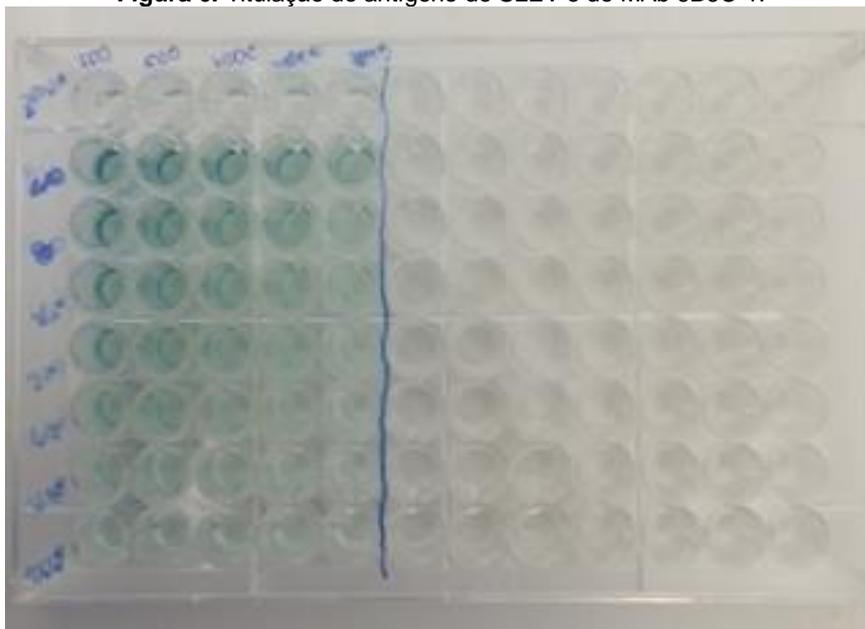
Antes de iniciar o ELISA de bloqueio, determinou-se a diluição ótima dos antígenos de SLEV e WNV, bem como do MAb 6B6C-1 através de titulação. Os antígenos foram diluídos de 1:40 até 1:5120 e o MAb de 1:250 até 1:4000.

Para a execução da titulação, microplacas de poliestireno de noventa e seis orifícios COSTAR® 3595 foram sensibilizadas utilizando os quarenta poços internos com 100µl de antígeno de WNV ou SLEV (dependendo da titulação realizada) em uma diluição seriada de concentração inicial 1:40 até 1:5120 em solução tampão carbonato-bicarbonato (50mM carbonato de Sódio, 50 mM bicarbonato de sódio, PH 9.6). A seguir, as placas foram incubadas por 16 horas a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte à sensibilização, as microplacas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem (0.1% Tween 20 em solução tampão fosfato salino [PH 7.4]), em lavadora automática, e depois incubadas por 40 minutos a 37°C em câmara úmida com uma solução de bloqueio com a finalidade diminuir reações inespecíficas (solução tampão fosfato salino contendo 5% de leite desnatado). Sequentemente as

microplacas foram novamente lavadas 4 vezes com solução de lavagem antes da adição do MAb 6B6C-1 HRP, diluído seriadamente de 1:250 até 1:4000 em solução de bloqueio. As microplacas foram então novamente incubadas por uma hora a 37°C em câmara úmida e posteriormente lavadas 4 vezes com solução de lavagem. Finalizando, foram adicionados em cada poço da microplaca, 75 µl de solução preparada com volumes iguais da solução A e B do Substrato Peroxidase ABTS (azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (KPL, Gaithersburg, Md.). Em 15 minutos foi observada a reação colorimétrica. A leitura dos resultados foi obtida com base na densidade ótica (DO) determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm.

As diluições ótimas foram determinadas levando-se em consideração a produção de uma reação colorimétrica satisfatória utilizando maior diluição possível dos antígenos e do MAb (Figura 6).

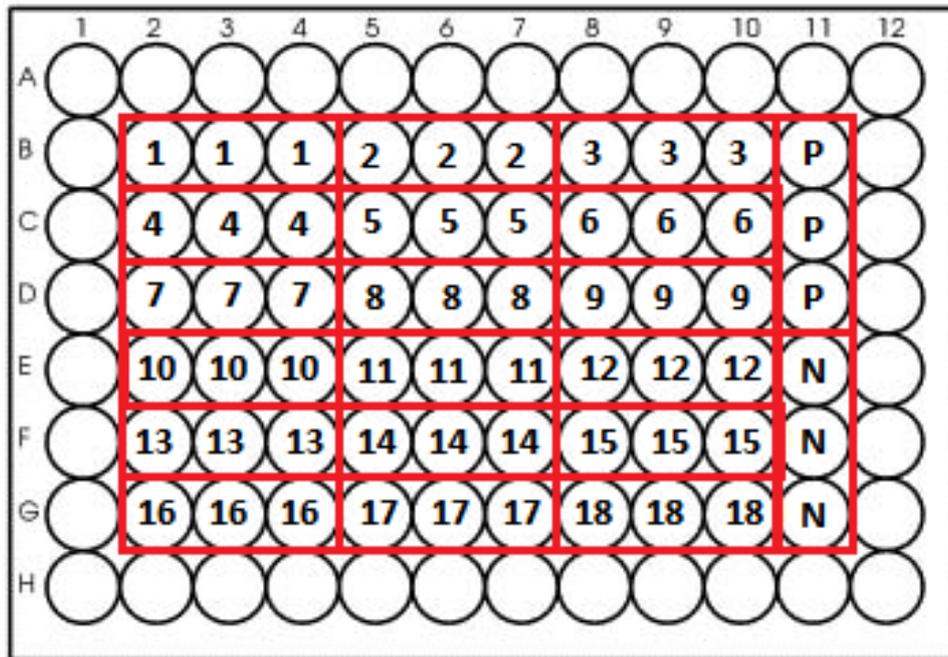
Figura 6: Titulação do antígeno de SLEV e do MAb 6B6C-1.



3.5.6 Execução do ELISA de Bloqueio

Em cada placa foram testadas 18 amostras de soro de equino além de um controle positivo (amostra positiva por PRNT90 do banco amostral do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz) e um controle negativo (amostra negativa por PRNT90 do banco amostral do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz), todos em triplicata (Figura 7)

Figura 7: Esquema de distribuição de amostras na placa.



Para a execução do ELISA de bloqueio, microplacas de poliestireno de 96 orifícios COSTAR® 3595 foram sensibilizadas utilizando os sessenta poços internos (não utilizando as duas colunas e duas fileiras mais externas da placa) com 100µl de antígeno de WNV ou SLEV (dependendo do teste realizado) em solução tampão carbonato-bicarbonato. A seguir as placas foram incubadas por 16 horas a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte à sensibilização, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem, em lavadora automática, após a lavagem, as placas foram incubadas por 40 minutos a 37°C em câmara úmida com a solução de bloqueio. Em seguida a microplacas foram novamente lavadas 4 vezes com solução de lavagem antes da adição das amostras e dos controles positivos e negativos. Todas as amostras bem como os controles foram diluídas em 1:10 na solução de bloqueio e testadas em triplicatas em volume final de 50 µl. As microplacas foram então incubadas por duas horas a 37°C em câmara úmida, e depois lavadas em solução de lavagem. Após a lavagem, foi adicionado às placas o MAb 6B6C-1 HRP diluído em solução de bloqueio de acordo com o resultado da titulação. As microplacas foram novamente incubadas por uma hora a 37°C em câmara úmida e depois lavadas 4 vezes em solução de lavagem. Após lavagem, foram adicionados em cada poço 75 µl de solução reveladora composta por volumes iguais da solução A e B do substrato peroxidase ABTS (azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (KPL, Gaithersburg, Md.) e as placas incubadas por 15 minutos na estufa a 37°C. A leitura dos resultados foi obtida pela densidade ótica (DO) determinada em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm. Após a leitura, foram determinadas as médias da DO de cada soro em teste e também dos controles (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Etapas ELISA de Bloqueio.

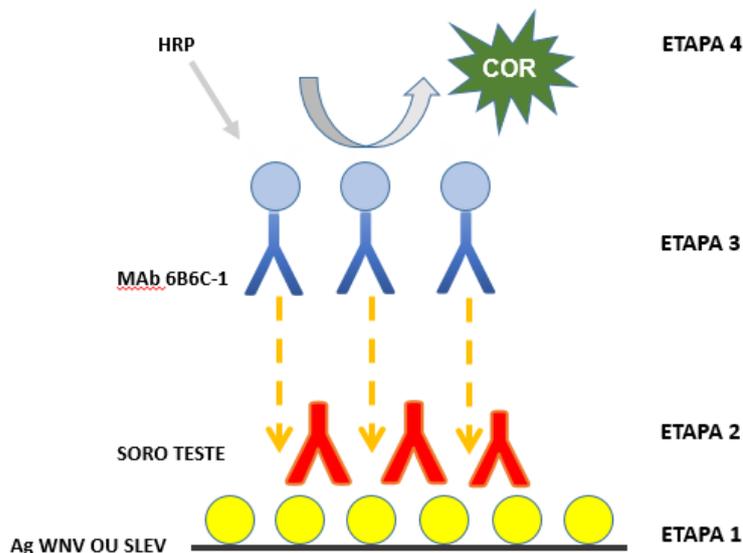
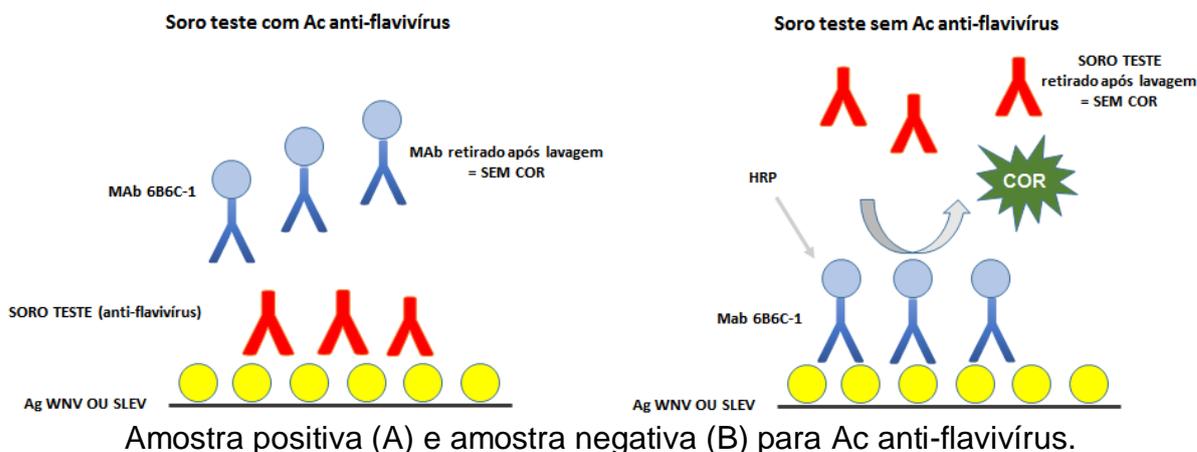


Figura 9: Demonstração do ELISA de bloqueio.



A interpretação dos resultados foi obtida com aplicação dos valores da DO obtida na leitura das placas na seguinte fórmula:

$$\% = 100 - [(DO amostra - DO Branco) / (DO controle negativo - DO Branco)] \times 100$$

Onde, DO= densidade ótica e Branco = média dos 36 poços externos.

A capacidade da amostra de soro que está sendo testada bloquear a ligação do MAb 6B6C-1 com o antígeno (WNV ou SLEV) fixado à placa é comparada com a

de uma amostra de soro negativa utilizada como controle. Os resultados estão expressos em percentual de bloqueio e amostras $\geq 30\%$ de bloqueio são consideradas soropositivas, como descrito por Blitvich et al. 2003.

Para testar a sensibilidade e especificidade do teste foram utilizados 5 controles reativos ao WNV, 5 controles reativos ao SLEV e 5 controles negativos em placas sensibilizadas com antígeno de SLEV e em placas sensibilizadas com antígeno de WNV.

3.5.7 Teste Molecular:

Todas as amostras dos animais provenientes das duas propriedades onde ocorreram casos de desordem neurológica, incluindo os que apresentaram quadro clínico e os conviventes foram submetidas primeiramente ao RT-PCR para flavivírus (one-step flavivírus RT-PCR) e também pelo protocolo em tempo real (*one-step Real-time* WNV RT-PCR).

3.5.8 Extração de RNA

Um total de 35 amostras, sendo 34 soros e 1 líquido foram submetidas à extração de RNA utilizando o kit comercial (QIAamp Viral RNA mini kit da QIAGEN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.9 RT-PCR, para flavivírus. One Step

As amostras de RNA foram submetidas a RT-PCR utilizando a metodologia adaptada por Moreau (2007), para detecção de amplo espectro de fragmentos genômicos de flavivírus. Este protocolo está baseado na amplificação de 269 a 272 pb da região N terminal e gene NS5 e utiliza iniciadores (PF2R e PF1S).

Para a reação de RT-PCR foram utilizados 2,5µl de RNA em um volume final de 25µl por reação. Foram adicionados 5µl de 5X OneStep Qiagen Buffer, 1µl dNTP mix (400 µM) 2,15µl Primer PF2R (0,6µM) e 2,15µl PF1S (0,6µM), 11,2µl de água livre de RNase/DNase e 1µl Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix. Foram utilizados quatro controles positivos, sendo um de ZIKV, outro de DENV-1, outro de SLEV e outro de WNV pertencentes do laboratório de Flavivírus como também água

ultra-pura como controle negativo nas reações. No sistema Bioer Line-Gene 9660 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), as condições de termociclagem utilizadas foram: 50°C por 30 minutos para a transcrição reversa (RT), seguida de 95°C por 15 minutos (inativação da enzima RT e ativação da Taq Polimerase) seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação do DNA), 55,8°C por 1 minuto (hibridização), 72°C por 1 minuto (extensão) e ainda 1 ciclo de 72°C por 10 minutos (extensão final). Após o término, o produto final da reação foi aplicado ao gel de agarose para avaliação do resultado obtido.

3.5.10 One-step real-time RT-PCR Genesig® Standard Kit Quantification of WNV genomes (Primerdesign™ Ltda)

As amostras de RNA foram submetidas a RT-PCR em tempo real para WNV utilizando a plataforma TaqMan® RT-PCR com iniciadores específicos para WNV desenhados para amplificação de regiões não codificantes 3' e 5' do genoma do WNV.

Foi utilizado o Genesig® Standard Kit Quantification of WNV genomes (Primerdesign™ Ltda). Os iniciadores deste kit têm 100% de homologia com sequências de referência de WNV clinicamente relevantes e foram desenhados para quantificação específica e exclusiva de todas as linhagens de WNV (Genesig 2016). Foram adicionados 10 µl de 2X oasig OneStep qRT-PCR mastermix (PrimerDesign), 1 µl de WNV primer e sonda, 1µl de água livre de RNase/DNase e 5µl de RNA obtendo um volume final de 20 µl por reação. Foram utilizados três controles positivos para WNV, sendo um do próprio kit e dois pertencentes ao laboratório de Flavivírus como também água ultra-pura como controle negativo nas reações.

No sistema Bioer Line-Gene 9660 Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), as condições de termociclagem utilizadas foram: 55°C por 10 minutos para a transcrição reversa (RT), seguida de 95°C por 2 minutos (inativação da enzima RT e ativação da Taq Polimerase), seguidos de cinquenta ciclos de 95°C por 10 segundos (desnaturação do DNA) e 60°C por 60 segundos (amplificação e coleta dos dados de fluorescência através de FAM).

3.6 Análise estatística:

O pacote estatístico GraphPad Prismv7.01 foi empregado para o processamento e análise de dados. As significâncias estatísticas da relação entre as variáveis descritas acima foram confrontadas pelo teste do Qui-quadrado (X^2) ou exato de Fisher, conforme o caso. Admitindo-se o nível de significância (α) de 0,05, para rejeição da hipótese de nulidade ($p \leq \alpha$).

4 RESULTADOS

As definições dos termos utilizados estão no Anexo C.

4.1 Resultados Sorológicos

Um total de 435 amostras de soro de cavalos do RJ foram testadas para presença de anticorpos anti-SLEV e anti-WNV pelo método ELISA de bloqueio. Foram consideradas soropositivas as amostras que apresentaram um percentual de inibição igual ou maior de 30%.

Desta forma, 200 (46%) amostras apresentaram anticorpos para flavivírus considerando as reações monotípicas e as reações inespecíficas e cruzadas e 235 (54%) foram soronegativas (Gráfico 1).

Um total de 162 (37,24%) amostras foram sororreativas no teste com WNV. Com relação ao teste com SLEV, 111 amostras (25,5%) foram sororreativas. Um total de 73 (16,78%) amostras foram sororreativas nos dois testes (Gráfico 2).

Entre os 111 equinos que foram sororreativos para SLEV, 38 (34,23%) foram reações monotípicas (Gráfico 2).

Com relação aos 162 equinos sororreativos para WNV, 89 (54,93%) apresentaram reação monotípica (Gráfico 2).

Gráfico 1: Equinos do RJ reagentes e não reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV

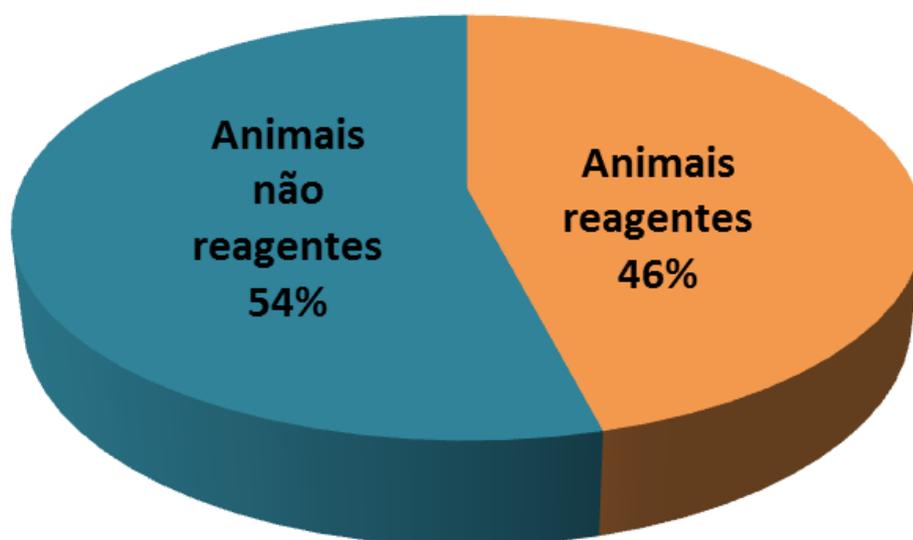
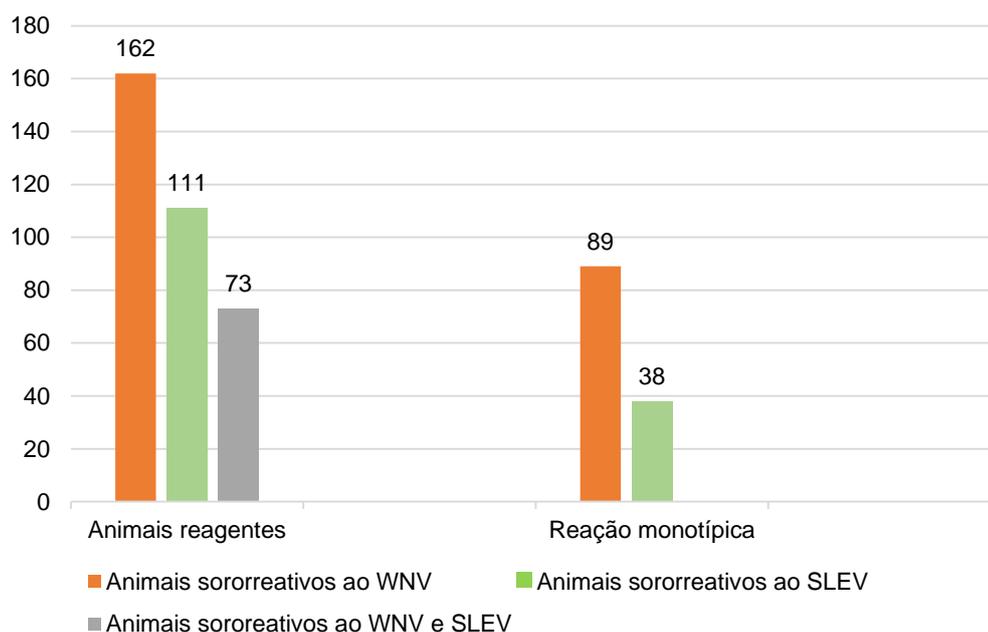


Gráfico 2: Equinos do RJ reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV



4.2 Resultados segundo a localização geográfica:

4.2.1 Mesorregiões geográficas:

Em todas as mesorregiões geográficas foram detectados animais sororreagentes para flavivírus. Foram 29 na mesorregião Metropolitana, 52 no Noroeste Fluminense, 51 no Norte Fluminense, 37 nas Baixadas Litorâneas, 26 no Centro Fluminense e 5 no Sul Fluminense. O maior número de animais sororreagentes foi observado nas mesorregiões Norte e Noroeste Fluminense com quantidades equivalentes ($p < 0.0001$). A mesma semelhança dos resultados foi observada quando se compara o percentual de animais sororreagentes em relação ao número total de animais amostrados em cada mesorregião, com 65,8% e 67,10%, respectivamente. Nas outras mesorregiões, 53% dos equinos foram sororreagentes no Centro Fluminense, 48% nas Baixadas Litorâneas, 25,43% na mesorregião Metropolitana e 12,5% no Sul Fluminense. A média de animais reagentes entre as Mesorregiões geográficas no RJ foi 45,30% (Gráfico 3, Tabela 4).

Gráfico 3: Percentual de equinos do RJ reagentes e não reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV por mesorregião geográfica

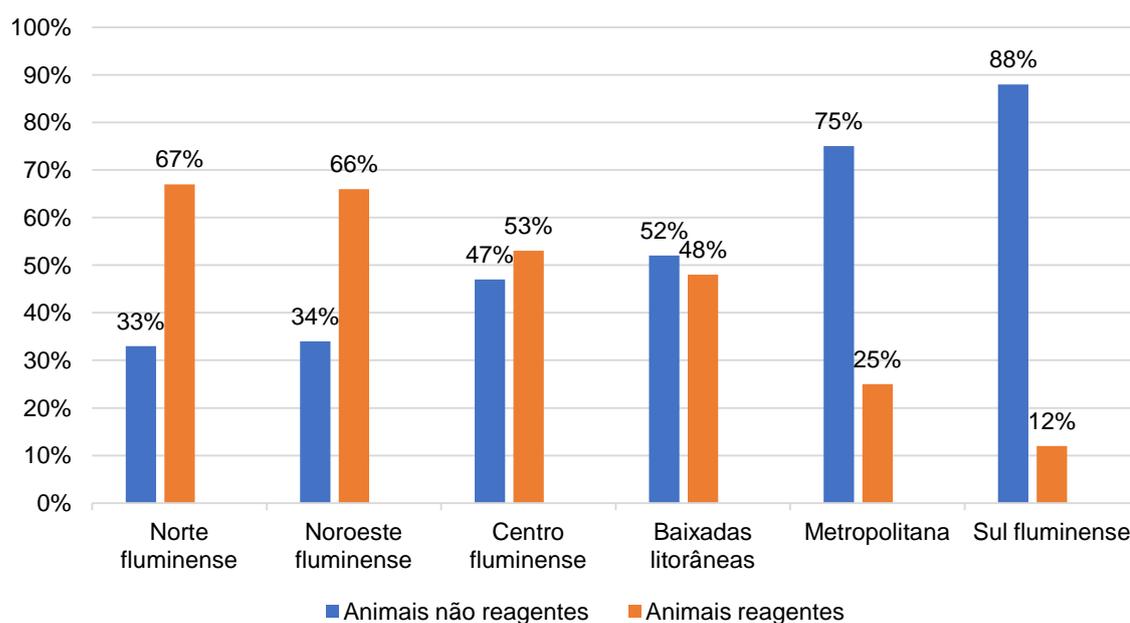


Tabela 4: Número e percentual de animais reagentes a flavivírus pelo ELISA de bloqueio por mesorregião geográfica no RJ

Mesorregião Geográfica	Nº Animais testados	Nº Animais Soropositivos para flavivírus	% soropositivos em relação ao total de animais testados por Mesorregião Geográfica
Metropolitana	114	29	25,43%
Noroeste Fluminense	79	52	65,8%
Norte Fluminense	76	51	67,10%
Baixas Litorâneas	77	37	48%
Centro Fluminense	49	26	53%
Sul Fluminense	40	5	12,5%
Total:	435	200	45,30%

4.2.2 Reatividade para WNV e SLEV:

O percentual de reatividade específica para WNV em cada mesorregião geográfica do RJ foi de 12,5% (n=5) entre os animais no Sul fluminense, 22,80% (n=26) entre os animais da mesorregião metropolitana, 52,63% (n=40) no Norte

fluminense, 46,83% (n=37) no Noroeste fluminense, 42,85% (n=21) no Centro fluminense e 42,85% (n=33) nas Baixadas litorâneas (p<0.0001).

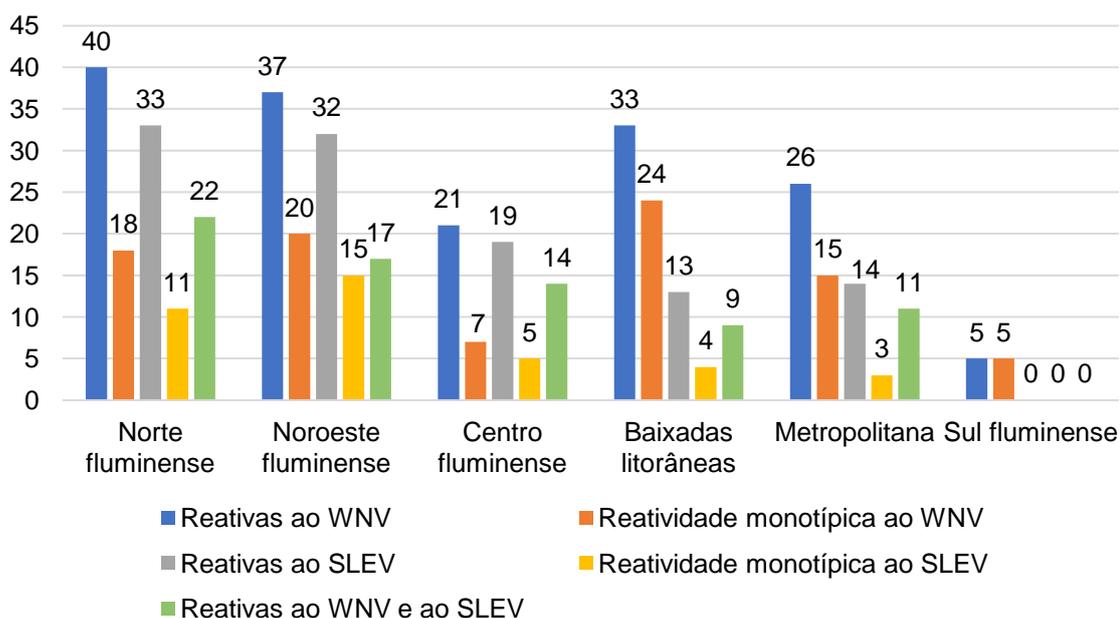
Dentre as reações para WNV em cada mesorregião geográfica, o percentual de animais que reagiram de maneira monotípica foi de 100% (n=5) no Sul fluminense, 57,69% (n=15) na mesorregião metropolitana, 45%(n=18) no Norte fluminense, 54,05% (n=20) no Noroeste fluminense, 33,33% (n=7) no Centro fluminense e 72,72% (n=24) nas Baixadas litorâneas (p=0,0191).

O percentual de reatividade específica para SLEV em cada mesorregião geográfica do RJ foi de 12,28% (n=14) na metropolitana, 43,42% (n=33) no Norte fluminense, 40,50% (n=32) no Noroeste fluminense, 38,77% (n=19) no Centro fluminense e 16,88% (n=13) nas Baixadas litorâneas (p<0.0001).

Dentre as reações para SLEV em cada mesorregião geográfica, o percentual de animais que reagiram de maneira monotípica foi de 21,42% (n=3) na mesorregião metropolitana, 33,33% (n=11) no Norte fluminense, 46,87% (n=15) do Noroeste fluminense, 26,31% (n=5) no Centro fluminense e 30,76% (n=4) nas Baixadas litorâneas (p<0.0003).

O percentual de reatividade para os dois flavivírus WNV e SLEV em cada mesorregião foi de 9,64% (n=11) na mesorregião metropolitana, 28,94% (n=22) no Norte fluminense, 21,51% (n=17) no Noroeste fluminense, 28,57% (n=14) no Centro fluminense e 11,68% (n=9) nas Baixadas litorâneas (p<0.0001) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Equinos do RJ reagentes ao SLEV e WNV no ELISA de bloqueio por mesorregião geográfica



4.2.3 Municípios amostrados:

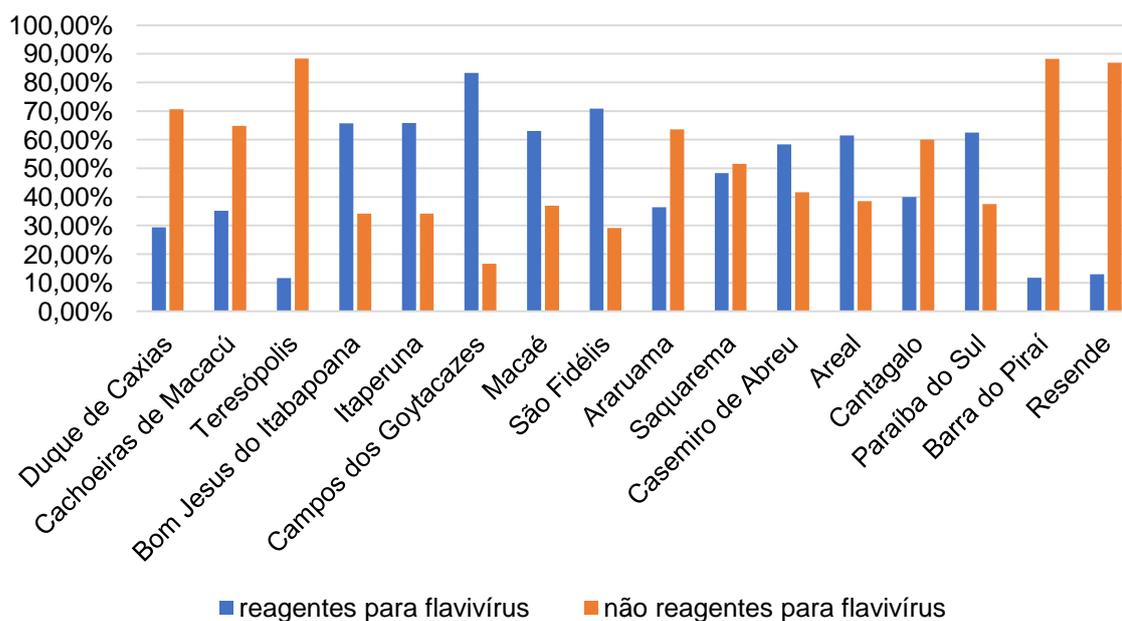
Dos 16 municípios onde foram realizadas as coletas, todos apresentaram animais positivos para flavivírus (100%).

Os municípios que apresentaram maior ocorrência de animais positivos em relação ao número de animais amostrados foram: Campos dos Goytacazes 83,33% (n=5), São Fidélis 70,83% (n=17), Itaperuna 65,85% (n=27), Bom Jesus do Itabapoana 65,78% (n=25), Macaé 63,04% (n=29), Paraíba do Sul 62,5% (n=10), Areal 61,53% (n=8), Casemiro de Abreu 58,33% (n=14), Saquarema 48,38% (n=15), Cantagalo 40% (n=8), Araruama 36,36% (n=8), Cachoeiras de Macacú 35,18% (n=19), Duque de Caxias 29,41% (n=5), Resende 13,04% (n=3), Barra do Pirai 11,76% (n=2) e Teresópolis 11,62% (n=5) ($p < 0.0001$). A média de animais reagentes entre os municípios no RJ foi 47,30% (Tabela 5, Gráfico 5).

Tabela 5: Número e percentual de animais reagentes a flavivírus pelo ELISA de bloqueio por município, RJ

Municípios	Nº Animais testados	Nº Animais reagentes para flavivírus	Nº Animais não reagentes para flavivírus	% reagentes para flavivírus em relação ao total de animais testados em cada município
D. Caxias	17	5	12	29,41%
C. Macacú	54	19	35	35,18%
Teresópolis	43	5	38	11,62%
B J Itabap.	38	25	13	65,78%
Itaperuna	41	27	14	65,85%
C.Goytacazes	6	5	1	83,33%
Macaé	46	29	17	63,04%
São Fidélis	24	17	7	70,83%
Araruama	22	8	14	36,36%
Saquarema	31	15	16	48,38%
C. Abreu	24	14	10	58,33%
Areal	13	8	5	61,53%
Cantagalo	20	8	12	40%
P. do Sul	16	10	6	62,5%
Barra do Pirai	17	2	15	11,76%
Resende	23	3	20	13,04%
Total:	435	200	235	47,30%

Gráfico 5: Equinos do RJ reagentes e não reagentes no ELISA de bloqueio para flavivírus por município



4.2.4 Amostras reativas ao WNV e SLEV

As 162 amostras reativas ao teste específico com antígeno WNV, estavam distribuídas no RJ com 5 animais no Sul fluminense (2 em Barra do Piraí e 3 animais em Resende), 26 animais na metropolitana (17 em Cachoeiras de Macacú, 5 em Duque de Caxias, 4 em Teresópolis), 40 no Norte fluminense (2 em Campos dos Goytacazes, 28 em Macaé, 10 em São Fidélis), 37 no Noroeste fluminense (19 em Bom Jesus do Itabapoana e 18 em Itaperuna), 21 no Centro fluminense (8 em Areal, 5 em Cantagalo e 8 em Paraíba do Sul) e 33 nas Baixadas litorâneas (7 em Araruama, 12 em Casemiro de Abreu e 14 em Saquarema) ($p < 0.0001$).

Das 89 reações monotípicas para WNV, 9 foram em Saquarema, 7 em Araruama, 8 em Casemiro de Abreu, 1 em Cantagalo, 2 em Areal, 4 em Paraíba do Sul, 9 em Bom Jesus do Itabapoana, 11 em Itaperuna, 17 em Macaé, 1 em São Fidélis, 11 em Cachoeiras de Macacú, 2 em Duque de Caxias, 2 em Teresópolis. 2 em Barra do Piraí e 3 em Resende ($p < 0.0001$).

As 111 amostras reativas ao teste específico com antígeno SLEV estavam distribuídas no RJ com 14 animais na metropolitana (8 em Cachoeiras de Macacú, 3 em Duque de Caxias, 3 em Teresópolis), 33 no Norte fluminense (5 em Campos dos Goytacazes, 12 em Macaé, 16 em São Fidélis), 32 no Noroeste fluminense (16 em Bom Jesus do Itabapoana e 16 em Itaperuna), 19 no Centro fluminense (6 em Areal,

7 em Cantagalo e 6 em Paraíba do Sul) e 13 nas Baixadas litorâneas (1 em Araruama, 6 em Casemiro de Abreu e 6 em Saquarema) ($p < 0.0001$). Entre as reações monotípicas, 2 foram em equinos de Cachoeiras de Macacú, 1 de Teresópolis, 1 de Macaé, 7 de São Fidélis, 3 de Campos dos Goytacazes, 6 de Bom Jesus do Itabapoana, 9 de Itaperuna, 3 de Cantagalo, 2 de Paraíba do Sul, 1 de Saquarema, 1 de Araruama e 2 de Casemiro de Abreu ($p < 0.0001$).

As 73 amostras reativas nos dois testes específicos, com antígeno WNV e SLEV distribuíram-se no RJ com 11 animais na Mesorregião metropolitana (6 em Cachoeiras de Macacú, 3 em Duque de Caxias, 2 em Teresópolis), 22 no Norte fluminense (2 em Campos dos Goytacazes, 11 em Macaé e 9 em São Fidélis), 17 no Noroeste fluminense (10 em Bom Jesus do Itabapoana e 7 em Itaperuna), 14 no Centro fluminense (6 em Areal, 4 em Cantagalo e 4 em Paraíba do Sul) e 9 nas Baixadas litorâneas (4 em Casemiro de Abreu e 5 em Saquarema) ($p = 0.0755$) (Tabela 6).

Tabela 6: Número de animais reagentes a flavivírus pelo ELISA de bloqueio por município, RJ

Municípios	Nº Animais reagentes para WNV	Nº Reações monotípicas para WNV	Nº Animais reagentes para SLEV	Nº Reações monotípicas para SLEV	Nº Animais reagentes para WNV e SLEV
D. Caxias	5	2	3	0	3
C. Macacu	17	11	8	2	6
Teresópolis	4	2	3	1	2
B J Itabap	19	9	16	6	10
Itaperuna	18	11	16	9	7
C. Goytacazes	2	0	5	3	2
Macaé	28	17	12	1	11
São Fidélis	10	1	16	7	9
Araruama	7	7	1	1	0
Saquarema	14	9	6	1	5
C. Abreu	12	8	6	2	4
Areal	8	2	6	0	6
Cantagalo	5	1	7	3	4
P. do Sul	8	4	6	2	4
Barra do Pirai	2	2	0	0	0
Resende	3	3	0	0	0
Total:	162		111		73

4.2.5 Avaliação dos resultados segundo sexo

Das 435 amostras de soro analisadas, 28,73% (n=125) eram equinos machos e 71,26% (n=310) fêmeas. Entre as 200 amostras de soro reagentes para flavivírus, 50 eram de equinos machos e 150 de fêmeas (p=0.1365). O percentual de animais reagentes por sexo foi semelhante sendo 40% entre os machos e 48,38% entre as fêmeas (Tabela 7).

Tabela 7: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por sexo

Sexo	Reagentes para flavivírus	% animais positivos / nº animais coletados por sexo
Machos	50	40%
Fêmeas	150	48,38%

Com relação ao percentual de equinos reagentes para WNV entre os sexos, 27,2% (n=34) dos machos coletados foram reagentes, sendo 50% (n=17) monotípicas. Com relação as fêmeas, 40,96% (n=127) (p>0,9999) foram reagentes, sendo 55,90% (n=71) monotípicas (p=0.1355).

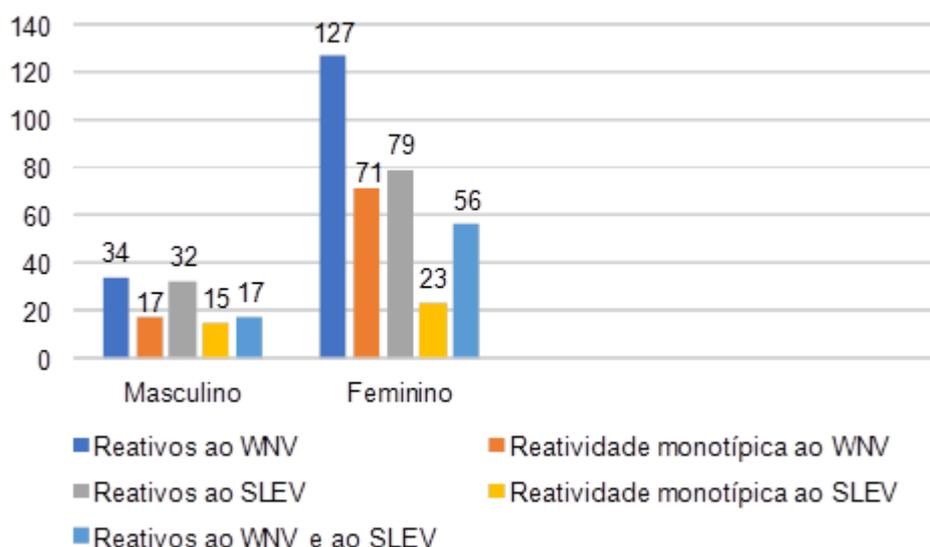
Com relação ao SLEV, 25,6% (n=32) dos machos foram reagentes, sendo 46,87% (n=15) monotípicas enquanto 25,48% (n=79) das fêmeas foram reagentes, sendo 29,11% (n=23) destas reações monotípicas (p>0,9999), sendo e (p=0.1355).

O percentual de machos reagentes aos dois antígenos SLEV e WNV foi de 13,6% (n=17). Entre as fêmeas, 18,06% (n=56) foram reagentes aos dois antígenos (p=0.3210) (Tabela 8, Gráfico 6).

Tabela 8: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por sexo

Sexo	% reagentes para WNV	% reagentes para SLEV	% reagentes para WNV e SLEV
Machos	27,2%	25,6%	13,6%
Fêmeas	40,96%	25,48%	18,06%

Gráfico 6: Equinos do RJ reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV por sexo



4.2.6 Avaliação dos resultados segundo a faixa etária

Neste estudo a frequência de anticorpos para flavivírus segundo a faixa etária obteve os seguintes resultados dentro de cada grupo: Grupo 1 (idade igual ou inferior a 6 meses): 42% (n=3) reativos, Grupo 2 (acima de 6 meses e igual ou inferior a 24 meses): 33,33% (n=21), Grupo 3 (acima de 24 meses e igual ou inferior a 72 meses): 33,84% (n=44) reativos, Grupo 4 (acima de 72 meses e igual ou inferior a 120 meses): 54,60% (n=77) reativos, Grupo 5 (animais acima de 120 meses de idade): 58,51% (n=55) reativos ($p=0.0002$) (Tabela 9).

Tabela 9: Percentual de animais reagentes para flavivírus ELISA de bloqueio por faixa etária

Grupo	Reagentes para flavivírus	% animais positivos / nº animais coletados por grupo de faixa etária
1	3	42%
2	21	33,33%
3	44	33,84%
4	77	54,60%
5	55	58,51%
Total	200	

Foram reativos ao WNV 28,57% (n=2) dos animais do Grupo 1, 26,98% (n=17) dos animais do Grupo 2, 23,84% (n=31) dos animais do Grupo 3, 43,97% (n=62) dos animais do Grupo 4 e 53,19% (n=50) dos animais do Grupo 5 ($p < 0.0001$). Das reações específicas para WNV dentro de cada grupo, 50% (n=1) do Grupo 1, 64,70% (n=11) do Grupo 2, 45,16% (n=14) do Grupo 3, 51,61% (n=32) do Grupo 4 e 62% (n=31) do Grupo 5 apresentaram reação monotípica ao WNV ($p = 0.0006$).

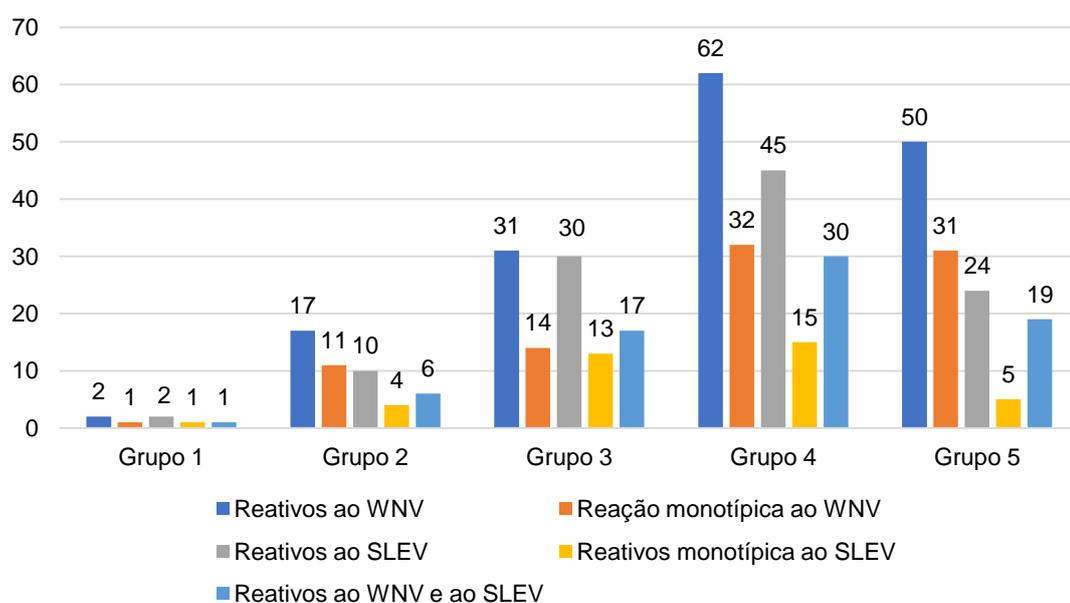
Foram reativos ao antígeno SLEV 28,57% (n=2) dos animais do Grupo 1, 15,87% (n=10) dos animais do Grupo 2, 23,07% (n=30) dos animais do Grupo 3, 31,91% (n=45) dos animais do Grupo 4 e 25,53% (n=24) dos animais do Grupo 5 ($p = 0.1079$). Das reações específicas para SLEV, dentro de cada grupo, 50% (n=1) dos animais do Grupo 1, 40% (n=4) dos animais do Grupo 2, 43,33% (n=13) dos animais do Grupo 3, 33,33% (n=15) dos animais do Grupo 4 e 20,83% (n=5) dos animais do Grupo 5 apresentaram reação monotípica ao SLEV ($p = 0.05634$).

Foram reativos aos dois antígenos WNV e SLEV 14,28% (n=1) dos animais do Grupo 1, 9,52% (n=6) dos animais do Grupo 2, 13,07% (n=17) dos animais do Grupo 3, 21,27% (n=30) dos animais do Grupo 4 e 20,21% (n=19) dos animais do Grupo 5 ($p = 0,9156$) (Tabela 10, Gráfico 7).

Tabela 10: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por faixa etária

Grupo	% reagentes para WNV	% reagentes para SLEV	% reagentes para WNV e SLEV
1	28,57%	28,57%	14,28%
2	26,98%	15,87%	9,52%
3	23,84%	23,07%	13,07%
4	43,97%	31,91%	21,27%
5	53,19%	25,53%	20,21%

Gráfico 7: Equinos do RJ reagentes no ELISA de bloqueio para SLEV e WNV por faixa etária



4.2.7 Avaliação dos resultados segundo a atividade

O percentual de equinos sororreagentes para flavivírus segundo a atividade que desempenham, incluindo animais de trabalho, esporte, lazer e reprodução: 33,33% (n=2) dos animais usados para trabalho, 37,15% (n=81) dos animais que desenvolvem esportes, 50% (n=20) dos animais de lazer e 56,72% (n=97) dos animais de reprodução (p=0,0015) (Tabela 11).

Tabela 11: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por atividade

Atividade	Reagentes para flavivírus	% animais positivos / nº animais coletados por grupo de atividades
Trabalho	2	33,33%
Esportes	81	37,15%
Lazer	20	50%
Reprodução	97	56,72%
Total	200	

Foram reativos ao WNV, 33,33% (n=2) dos animais de trabalho, 27,52% (n=60) dos animais de esportes, 50% (n=20) dos animais de lazer e 46,78% (n=80) dos animais de reprodução (p=0.0004). Com relação as reações monotípicas para WNV dentro de cada grupo foram positivos 50% (n=1) dos animais de trabalho, 60%

(n=36) dos animais de esportes, 60% (n=12) dos animais de lazer e 50% (n=40) dos animais de reprodução (p=0.1524).

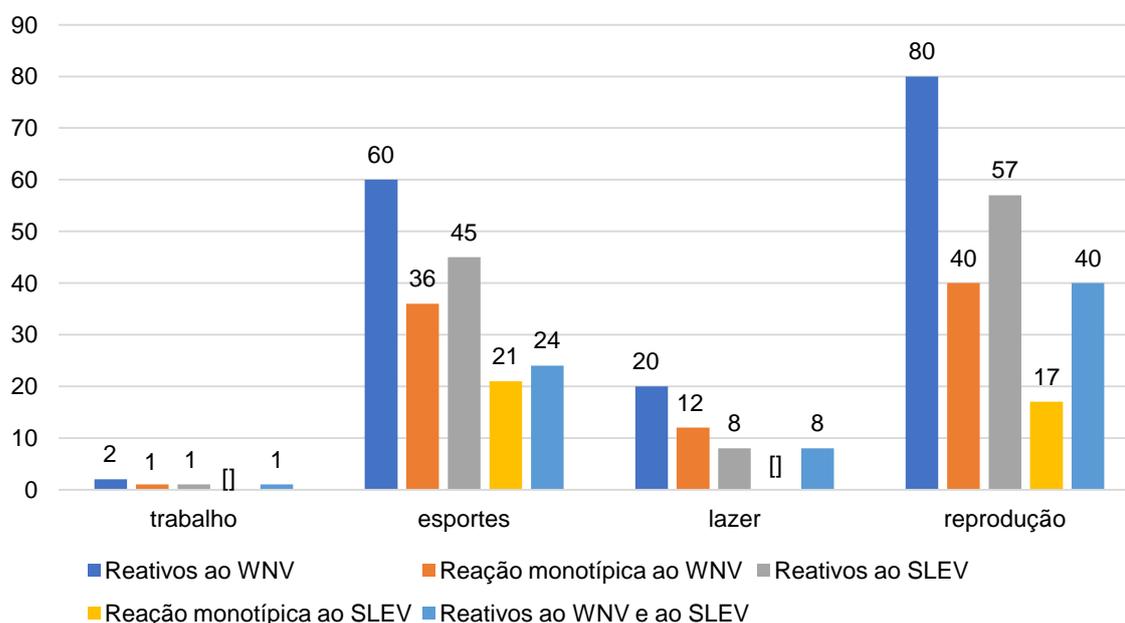
Foram reativos o antígeno SLEV, 16,66% (n=1) dos animais de trabalho, 20,64% (n=45) dos animais de esportes, 20% (n=8) dos animais de lazer e 33,33% (n=57) dos animais de reprodução (p=0.0279). Com relação as reações monotípicas para SLEV dentro de cada grupo, foram positivos 46,66% (n=21) dos animais de esportes, 29,82% (n=17) dos animais de reprodução e nenhum animal de trabalho ou lazer (p=0.3335).

Foram reativos aos dois antígenos WNV e SLEV, 16,66% (n=1) dos animais de trabalho, 11% (n=24) dos animais de esportes, 20% (n=8) dos animais de lazer e 23,39% (n=40) dos animais de reprodução (p=0.0126) (Tabela 12, Gráfico 8).

Tabela 12: Percentual de animais reagentes para flavivírus por ELISA de bloqueio por atividade

Atividade	% reagentes para WNV	% reagentes para SLEV	% reagentes para WNV e SLEV
Trabalho	33,33%	16,66%	16,66%
Esportes	27,52%	20,64%	11%
Lazer	50%	20%	20%
Reprodução	46,78%	33,33%	23,39%
Total			

Gráfico 8: Distribuição de animais reagentes por ELISA de bloqueio de epítipo em equinos agrupados por atividade no estado do RJ



4.2.8 Testes com os controles do banco amostral

Os cinco controles positivos e reativos para WNV e SLEV (amostras testadas por PRNT 90 do banco amostral), quando testados nas duas placas sensibilizadas com antígenos WNV e SLEV, apresentaram reatividade aos dois antígenos. Os 5 controles negativos (amostras negativas por PRNT 90 do banco amostral), não apresentaram reatividade a nenhum dos dois antígenos.

4.3 Resultados Teste Molecular

Apesar da grande sensibilidade dos testes, todas as 33 amostras de equinos testadas foram negativas no RT-PCR genérico para flavivírus e no RT-PCR em tempo real para WNV. Todos os controles positivos para flavivírus utilizados no presente estudo foram positivos e todos os controles negativos foram negativos nos dois protocolos, tanto no RT-PCR genérico para flavivírus quanto no RT-PCR em tempo real para WNV.

5 DISCUSSÃO

Os flavivírus estão entre os principais arbovírus de importância médica. O SLEV e WNV se agrupam no complexo antigênico JEV e estão envolvidos em casos de doença febril aguda e meningoencefalites tanto no homem como em animais. O Brasil apresenta características ecológicas e ambientais que formam um cenário ideal para a circulação de flavivírus (Figueiredo 2000, 2007, Guedes 2012). O conhecimento sobre co-circulação destes arbovírus no estado vem se intensificado a cada ano (Valle et al. 2016).

Os equinos são altamente suscetíveis à infecção por flavivírus e estudos realizados em várias partes das Américas têm demonstrado a presença de anticorpos de flavivírus de importância em saúde pública em equinos (Pauvolid-Corrêa et al. 2014). Os resultados obtidos destes estudos indicam que estes animais podem ser utilizados como importantes marcadores da circulação de arbovírus.

Neste estudo, procuramos evidências de circulação de WNV e SLEV em 435 equinos do RJ através de uma investigação sorológica por ELISA de bloqueio e RT-PCR em tempo real para pesquisa de WNV em animais com quadro clínico de etiologia indefinida.

O ELISA é o teste sorológico mais apropriado para a triagem de anticorpos, pela sua facilidade de padronização, versatilidade e reprodutibilidade (Blitvich et al. 2003b). É um teste que foi amplamente utilizado para detecção de anticorpos anti-WNV nos países da América do Norte, Central e Caribe (Blitvich et al. 2003a, b, Estrada-Franco et al. 2003, Loroño-Pino et al. 2003, Lefrançois et al. 2005, Mattar et al. 2005, Bosch et al. 2007, Diaz et al. 2008, Pauvolid-Corrêa et al. 2011, De Filette et al. 2012).

O teste utilizado neste trabalho foi o ELISA de bloqueio que é considerado um método rápido e de baixo custo e que vem sendo utilizado em estudos de vigilância para detecção de anticorpos, tanto IgM quanto IgG, para flavivírus em diversas espécies de vertebrados. O ELISA de bloqueio utilizando o Mab 6B6C-1 demonstrou grande sensibilidade para detecção de anticorpos anti-flavivírus em estudo realizados em aves (Blitvich et al. 2003a, b).

No presente estudo, 46% (n=200) dos animais testados apresentaram anticorpos para flavivírus. Outros inquéritos sorológicos realizados com equinos do MS em 2010 utilizando o mesmo método e com o mesmo MAb (reativo ao grupo dos

flavivírus) encontraram resultados similares, onde 55,4% e 60,5% das amostras foram reativas (Pauvolid-Corrêa et al. 2011, Melandri et al. 2012).

Resultados semelhantes também foram reportados em equinos da região amazônica (44,8%) e Mato Grosso do Sul (55,1%), porém utilizando métodos sorológicos diferentes (Rodrigues et al. 2010, Silva et al. 2014).

Os resultados dos estudos já realizados no Brasil, mesmo considerando a diferença de especificidade e sensibilidade nos testes utilizados, sugerem que a circulação de flavivírus acomete diferentes estados e localidades. Resultados positivos para a presença de anticorpos anti-flavivírus em equinos no Brasil sugerem exposição destes animais a um ou mais flavivírus.

O teste de ELISA de bloqueio já demonstrou que as populações de equinos estudadas possuíam um padrão de resposta imune consistente com o de uma população exposta a infecções por diferentes flavivírus, corroborando a já demonstrada diversidade de flavivírus no Brasil (Travassos da Rosa, APA, Travassos da Rosa, JFS, Pinheiro, FP & Vasconcelos 1997, Figueiredo 2000, Vasconcelos et al. 2005).

As amostras positivas para SLEV e WNV por PRNT 90 do banco amostral, foram reativas para SLEV e WNV corroborando, desta forma, a sensibilidade do ELISA de bloqueio realizado neste estudo. Além disso, considerando que também os controles negativos não apresentaram reatividade a nenhum dos dois antígenos, demonstrou que o teste não gerou resultados falso-positivos. Quanto à especificidade, amostras positivas para SLEV por PRNT 90 foram reativas para WNV e amostras positivas para WNV foram reativas para SLEV. Estes resultados podem indicar reação cruzada. Entretanto, vale ressaltar que as amostras positivas por PRNT 90 utilizadas como controle eram amostras de campo e por isso a presença de anticorpos neutralizantes para o segundo vírus não pode ser descartada.

A interpretação dos resultados de soropositividade para flavivírus deve ser feita criteriosamente (Komar 2001). A especificidade nestes testes é um fator limitante no diagnóstico. A dificuldade é ainda maior nas áreas em que existe a co-circulação de vários flavivírus, não somente pelas reações cruzadas com outros flavivírus, como também nos casos de infecções secundárias (Kuno 2003).

Quando avaliamos os resultados dos testes tanto na placa sensibilizada com SLEV como com a placa sensibilizada com WNV, verificamos diferenças nestas respostas. Um total de 162 (37,24%) amostras foram sororreativas ao teste na placa

sensibilizada com o antígeno WNV e 111 (25,5%) amostras foram sororreativas ao teste na placa sensibilizada com SLEV. Apenas 73 (16,78%) amostras foram sororreativas nos dois testes. Tais resultados podem ser interpretados como uma reação a epítomos específicos dos anticorpos das amostras em teste com os antígenos das placas sensibilizadas.

Entre estas reações, 38 de 111 (34,23%) apresentaram reação monotípica para SLEV e 89 de 162 (54,93%) apresentaram reação monotípica para WNV. Estes resultados sugerem ausência de reação cruzada.

Em outro inquérito sorológico para flavivírus com equinos no RJ, realizado em Resende na região Sul Fluminense, 20,5% dos equinos analisados foram positivos para SLEV e 33,5% para WNV (Silva et al. 2014). Assim como no presente estudo, estes resultados demonstram uma prevalência maior para WNV do que para SLEV em cavalos do RJ.

O último surto de SLEV conhecido no Brasil ocorreu durante uma epidemia de dengue. Esta evidência sugere a possível circulação silenciosa de SLEV durante epidemias por outros arbovírus no Brasil (Mondini et al. 2007). Normalmente, o SLEV não causa manifestações clínicas em equinos, apesar disso um caso foi recentemente reportado em Minas Gerais (Rosa et al. 2013).

Poucas investigações soro-epidemiológicas para SLEV em equinos foram realizadas no Brasil e a maioria delas foi na região do Pantanal, MS. O percentual de animais positivos para SLEV em nosso trabalho foi menor que os encontrados em estudos similares realizados no MS (Pauvolid-Corrêa et al. 2010).

Em um estudo realizado com amostras coletadas de 2004 a 2009 de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, RJ e Paraíba, o percentual de positividade para SLEV foi de 35,9%. (Silva et al. 2014). Nestes trabalhos, os cavalos da região do Mato Grosso do Sul têm uma característica diferente em relação aos cavalos do RJ, que são mais domesticados, vivem em ambientes com maior influência do homem, enquanto na região do Mato Grosso do Sul, os animais vivem em áreas de florestas com uma maior exposição aos ciclos silvestres.

Desde sua detecção na América do Norte em 1999, WNV passou a ser evidenciado por toda a América Latina. Na América do Sul foi isolado pela primeira vez a partir de tecido cerebral de equinos com encefalite na Argentina (Morales et al. 2006). Estudos sorológicos realizados na América do Sul entretanto, indicavam a circulação de WNV não só na Argentina, mas também na Colômbia e Venezuela (Mattar et al. 2005, Bosch et al. 2007). A primeira evidência sorológica da circulação

de WNV no Brasil foi reportada em 2011 com a identificação de anticorpos neutralizantes para WNV em equinos hígidos do Pantanal de MS (Pauvolid-Corrêa et al. 2011). A partir de então, outras novas evidências sorológicas da circulação de WNV em equinos passaram a ser reportadas no Brasil (Melandri et al. 2012). Entretanto, o WNV só foi relacionado como agente causador de encefalite humana no Brasil em 2015, quando um agricultor com quadro neurológico no Piauí foi diagnosticado sorologicamente para WNV (Vieira et al. 2015).

Outros estudos no Brasil demonstram a dispersão da circulação viral dentro do território brasileiro abrangendo vários estados como comprovado com amostras de cavalos coletadas entre 2004 e 2009. Entre os animais sororreagentes para flavivírus em SP, MG, MS, RJ e Paraíba, 33,9% dos animais foram sororreagentes para WNV com maior prevalência na Paraíba (45,5%), seguido pelo estado do Mato Grosso do Sul. A reatividade no RJ foi de 33,5% (Silva 2010). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram 37,24% de reatividade para WNV no RJ, confirmando as evidências de dispersão.

É importante considerar os diferentes métodos sorológicos e critérios de soropositividade utilizados nos diversos estudos em comparação com os utilizados neste estudo, já que os métodos diferem principalmente na especificidade.

Neste estudo, a diferença da distribuição dos animais sororreativos (inespecíficas, específicas, monotípicas e cruzadas), em relação à localização geográfica que os cavalos ocupam no RJ foi significativa ($p < 0.05$). Os resultados deste estudo e dos diversos resultados observados nas várias regiões do país demonstram que a circulação viral difere em cada região e aparentemente está ligada a presença do vírus e ao clima, às características ecológicas da região, do vetor e do reservatório relacionadas a cada região, determinam os maiores riscos de infecção.

As mesorregiões de maior prevalência foram as mesorregiões Norte e Noroeste Fluminense com resultados equivalentes. O percentual de animais sororreagentes em relação ao número total de animais amostrados em cada mesorregião, foi de 67,10% e 65,8% respectivamente. Dentro destas regiões, estão os municípios que apresentaram maior número de amostras reativas, sendo os municípios Macaé, com 29 (63%) e Itaperuna 27 (65,85%).

A mesorregião do norte fluminense apresentou as maiores prevalências para WNV (52,63%) e SLEV (43,42%) e entre os municípios com o maior número de reações positivas estão Macaé, São Fidélis, Bom Jesus de Itabapoana e Itaperuna.

Estas evidências sugerem uma maior dispersão viral nesta região, que pode estar relacionada às características ecológicas, como as maiores médias de precipitação com um período aproximado de cinco meses de chuva e sete meses de estiagem ou baixa precipitação. Outros fatores incluem temperatura média elevada durante o ano, com apenas três meses (maio, junho e julho) de temperaturas mais brandas, além das características ambientais e sócio econômicas desta região ser composta por muitas terras agrícolas ocupadas com pastagens e plantação de cana de açúcar. O pouco da vegetação remanescente encontra-se altamente fragmentada (Burla et al. 2012).

Sabe-se que as mesorregiões Norte fluminense e Noroeste fluminense, estão inseridas num contexto de grande desenvolvimento econômico. Nos últimos anos passou por grandes impactos ambientais e estruturais devido ao desenvolvimento de petróleo e gás (Valente et al. 2011). Além disso, na região, se localiza importantes áreas de concentração de aves migratórias do Brasil. São elas a Lagoa da Ribeira e Lagoa Feia nos municípios de Quissamã e Campos dos Goytacazes (ICMCBio 2014).

O maior número de reações monotípicas para WNV ocorreu nas Baixadas litorâneas, num total de 24 reações, porém quando analisamos o número em relação ao total das amostras que reagiram ao WNV, na região Sul Fluminense, 100% das amostras reativas ao WNV obtiveram uma reação monotípica. Já para o SLEV, a região Noroeste fluminense, foi a que apresentou além de um número maior, com 15 reações monotípicas, também em relação ao total de reações ao SLEV foi a que apresentou maior proporção de reações monotípicas, com 46,87%. Estes resultados podem sugerir que em determinadas mesorregiões um dos dois vírus, WNV ou SLEV, circule mais que o outro.

Em relação aos resultados segundo o sexo, foi demonstrando não existir associação entre o sexo do animal e a positividade no teste e que esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p > 0.05$). Desta forma, os resultados demonstram que ambos os sexos possuem a mesma susceptibilidade, e estão sob o mesmo risco de se infectar. Resultados de frequência de animais reagentes para flavivírus nos dois sexos foram semelhantes sendo 40% para o sexo masculino e 48,38% para o sexo feminino. A maior diferença entre os sexos em relação as reações monotípicas ocorreram em relação ao SLEV onde as fêmeas apresentaram 29,11% e os machos 46,87% dentro do total de reativos nos dois sexos para SLEV.

Em relação à atividade dos cavalos, os nossos resultados demonstraram existir associação entre a atividade do animal e a reatividade aos testes, já que esta diferença se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,05$), exceto a associação entre as reatividades monotípicas ($p > 0,05$). Os animais destinados à reprodução apresentaram grande diferença de frequência de sororreatividade (inespecífica, específicas e cruzadas) em relação às outras atividades. Esta circunstância pode estar relacionada ao manejo dos animais quando exercem estas atividades e a consequente exposição abundante aos vetores infectados que é o grande fator de risco às infecções (Figueiredo 2000). Geralmente estes animais ficam em criações extensivas mais próximas às matas, às áreas alagadas e portanto, mais expostas aos vetores. Enquanto os animais de esportes e trabalho vivem estabulados com cuidados ambientais mais constantes.

Observou-se um aumento dos animais reagentes com o aumento da idade demonstrando existir associação entre a idade do animal e às reatividades inespecífica, específica e monotípica para WNV. Esta diferença se mostra estatisticamente significativa quando comparamos as diversas faixas etárias ($p < 0,05$). Animais do grupo 4 (animais acima de 72 meses e igual ou inferior a 120 meses de idade e do grupo 5 (animais com idade superior a 120 meses de idade) apresentaram maior reatividade aos flavivírus, com 54,60% e 58,51% de reativos respectivamente. Esta relação pode ser claramente relacionada a maior exposição aos vírus pelo maior tempo de vida, já que se trata de animais acima de 72 meses de idade. A mesma associação entre os animais destes dois grupos apresentou maiores reatividades específica e monotípica ao WNV estatisticamente significativa ($p < 0,05$), e não houve diferença estatisticamente significativa quando se considerou a reatividade específica e monotípica para SLEV ($p > 0,05$). Inquéritos sorológicos realizados na região sul do Brasil também tiveram resultados compatíveis a esse estudo em relação a faixa etária sugerindo que a idade seja um fator de risco, tendo em vista o tempo de exposição (Vianna 2010). Os animais do grupo 1 (idade igual ou inferior a 6 meses) que apresentaram reatividade, podem estar relacionados a evidência de anticorpos maternos ainda circulantes no animal jovem. A duração dos anticorpos maternos transferidos através do colostro no potro não se estende por mais de seis meses (Jeffcott 1974). A detecção de sororreativos em animais do grupo 2 (acima de 6 meses e igual ou inferior a 24 meses), sugere uma circulação de flavivírus recente, entre aproximadamente 2014 e 2016

As desordens neurológicas nos cavalos são comuns e raramente tem o diagnóstico definido. Essas desordens podem ter diversas causas incluindo encefalites virais, bacterianas, protozoária, leucoencefalomalacia, traumatismos envenenamentos, encefalopatia hepática/urêmica. O acompanhamento e discriminação de enfermidades que afetam o sistema nervoso com quadro clínico semelhante e, portanto, confundíveis é de fundamental importância para que métodos de controle e prevenção possam ser implementados, uma vez que estas enfermidades prejudicam a equideocultura na região e podem representar potencial risco a saúde pública (MackAY et al. 2000, Dubey et al. 2001, Johnson 2011).

Os cavalos são altamente suscetíveis à infecção por WNV e desenvolvem sinais clínicos mais frequentes que nos seres humanos (Ward et al. 2006). Embora anticorpos contra SLEV já tenham sido detectados em diversos estudos em cavalos, estes não apresentam viremia elevada ou doença clínica quando infectados com SLEV (Rodrigues et al. 2010, Rosa et al. 2013).

De um modo geral, a tentativa de diagnóstico de uma desordem neurológica por infecção ao WNV em equinos, que se caracteriza por breve viremia pode dificultar a detecção do agente por método molecular, mesmo realizando a coleta sanguínea durante a fase aguda da infecção. Assim, embora reconheçêssemos a dificuldade em se detectar RNA viral em amostras de soro destes animais, os ensaios foram realizados, não somente nos animais sintomáticos como também nos conviventes da mesma propriedade visando à detecção de eventual infecção aguda assintomática nestes animais, que embora não tenha sido detectado neste estudo, não descarta a possibilidade de estarem envolvidos nos muitos casos que ocorrem no RJ.

A variedade de hospedeiros e vetores do vírus no Brasil, garante a este vírus a proliferação nas Américas que pode estar associado à vigilância limitada e baixa capacidade de diagnóstico (Artsob et al. 2009). Considerando a existência de equinos disseminados pelo país, além dos humanos, abrangendo uma área que inclui as aves, amplificadoras virais, o potencial para o surgimento de surtos em animais e humanos é preocupante (Figueiredo 2007). Apesar destas evidências sorológicas, poucos casos foram documentados da doença neurológica por WNV em humanos e equinos na América do Sul. No Brasil até o momento, foi descrito somente um caso humano no Piauí em 2015. WNV foi reportado como agente causador de encefalite humana no Brasil, quando um agricultor com quadro neurológico no Piauí foi diagnosticado sorologicamente para WNV (BRASIL 2014,

Vieira et al. 2015). Em um estudo entre 2008 e 2010 que analisou amostras por ELISA de bloqueio e por RT-PCR de equinos sadios e de equinos que apresentaram encefalite os testes moleculares foram negativos (Ometto et al. 2013). Um estudo com pacientes com síndrome febril sem diagnóstico definido de Manaus e pacientes com suspeita de meningoencefalite viral provenientes de SP não foi detectado RNA viral do WNV em nenhuma das amostras analisadas (Levi et al. 2011). Existem algumas teorias de que infecções por outros Flavivírus nos pássaros nativos poderiam resultar em cruzamentos imunes ou então a falta de um vetor competente para pássaros, homem e cavalos (Figueiredo 2007) . Variantes menos virulentas também poderiam estar envolvidas. A vigilância para o vírus na América do Sul é complicada pela diversidade de Flavivírus e a dificuldade de um diagnóstico que faça a distinção entre as infecções humanas (Gubler 2007).

Inquéritos sorológicos são importantes com a finalidade de investigar a presença de WNV nos casos clínicos, como também a exposição viral demonstrada pelos inquéritos sorológicos é importante para auxiliar a vigilância. Os resultados obtidos neste estudo sugerem a circulação de SLEV e WNV no estado. Outros estudos utilizando métodos mais específicos, como PRNT são necessários para comprovar os resultados obtidos através do ELISA de bloqueio e estas informações devem servir como um alerta aos profissionais de saúde humana e veterinária.

6 CONCLUSÕES

- A detecção de anticorpos anti-flavivírus neste primeiro estudo em grande escala através do ELISA de bloqueio em cavalos do RJ sugere circulação de flavivírus no estado;
- Ocorreu variação na reatividade para flavivírus entre as mesorregiões geográficas.
- Casos de reatividade aos dois flavivírus podem indicar reatividade cruzada ou infecções secundárias.
- A reatividade de amostras conhecidamente positivas e negativas (por PRNT) do banco amostral do Laboratório nos testes utilizando os dois antígenos, demonstra a necessidade da utilização de outros métodos de diagnóstico complementares para confirmação da especificidade dos resultados obtidos pelo ELISA de bloqueio utilizando o MAb 6B6C-1 e os antígenos específicos.
- De acordo com os resultados negativos por RT-PCR para WNV, os animais com desordens neurológicas, não puderam ser relacionados a infecção por WNV.

7 PERSPECTIVAS

A realização de outros estudos utilizando métodos sorológicos mais específicos, como utilização do ELISA de bloqueio de epítipo utilizando anticorpos monoclonais específicos e também a utilização do teste “padrão ouro”, PRNT são necessários para comprovar os resultados obtidos através do ELISA de bloqueio de epítipo com MAb reativo ao grupo dos flavivírus.

Realização de outras investigações no RJ, incluindo outras espécies (aves) e busca e investigação constante de desordens neurológicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, Lichtman A 2005. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Ltd, Rio de Janeiro.
- Araújo FAA, Vianna RDST, Andrade Filho GV De, Melhado DL, Todeschini B, Cavalcante GCE, De, Fedrizzi CE, Magalhães VS, Scherer A, Almeida MAB De, Portella ADS, Santos E Dos, Scherer SB, Doretto L, Martins LC, Rodrigues SG, Vasconcelos PFDC 2004. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. *Bol Eletronico Epidemiol* 5: 1–8.
- Artsob H, Gubler DJ, Enria DA, Morales MA, Pupo M, Bunning ML, Dudley JP 2009. West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health* 56: 357–369.
- Barcellos C, Monteiro AMV, Corvalan C 2009. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. *Nature* 18: 285–304.
- Beaty B, Trent D, JT R 1988. Virus variation and evolution: mechanisms and epidemiological significance. In: *arboviruses Epidemiol. Ecol.*, Boca Raton: CRC Press, Monath TP, pp. 59–85.
- Beltrán FJ, Bechara YI, Guido GG, Cicuttin GL, Beaudoin JB, Dohmen FEG 2014. Detección molecular de vírus de Encefalitis de Saint Louis en mosquitos de Buenos Aires, Argentina. *Med. (Buenos Aires)* 74: 433–436.
- Blitvich BJ, Bowen RA, Marlenee NL, Hall RA, Bunning ML, Beaty BJ 2003a. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2676–2679.
- Blitvich BJ, Marlenee NL, Hall RA, Calisher CH, Bowen RA, Roehrig JT, Komar N, Langevin SA, Beaty BJ 2003b. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west nile virus in multiple avian species. *J Clin Microbiol* 41: 1041–1047.
- Blitvich BJ, Marlenee NL, Hall R a, Calisher H, Bowen R a, Roehrig JT, Langevin S a, Beaty BJ, Calisher CH, Komar N 2003c. Immunosorbent Assays for the Detection of Serum Antibodies to West Nile Virus in Multiple Avian Species Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Serum Antibodies to West Nile Virus in Multiple Avian Species. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1041–1049.

- Bosch I, Herrera F, Navarro J-C, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, Jones M, Fernández E, Pérez N, Pérez-Emán J, Guimarães AE, Barrera R, Valero N, Ruiz J, Velásquez G, Martínez J, Comach G, Komar N, Spielman A, Kramer L 2007. West Nile virus, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 651–653.
- BRASIL M da S 2014. Portal da Saúde. *Ministério da Saúde confirma Prim. caso Febre do Nilo.*
- Brault AC, Powers AM, Holmes EC, Woelk CH, Weaver SC 2002. Positively charged amino acid substitutions in the e2 envelope glycoprotein are associated with the emergence of venezuelan equine encephalitis virus. *J. Virol.* 76: 1718–1730.
- Bunning ML, Bowen RA, Bruce Cropp C, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ 2002. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 380–386.
- Burla RS, Neto RS, Maciel CP, Silva RA 2012. Análise das condicionantes socioeconômicas e ambientais para a implantação da silvicultura nas regiões Norte e Noroeste Fluminense. *Bol. do Obs. Ambient. Alberto Ribeiro Lamago, Campos dos Goytacazes/RJ* 6: 85–113.
- Calisher C, Karabastos N 1988. Arbovirus serogroups: Definition and geographic distribution. In: *Arboviruses Epidemiol. Ecol.*, Boca Raton, Florida, pp. 19–57.
- Câmara FP, Gomes AF, Santos GT Dos, Câmara DCP 2009. Clima e epidemias de dengue no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42: 137–140.
- Casals J 1957. The arthropod-borne group of animal viruses. In: *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, pp. 219–235.
- Casals J, Brown L V 1954. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J. Exp. Med.* 99: 429–449.
- Casseb ADR, Casseb LMN, Silva SP Da, Vasconcelos PFDC 2013. Arbovírus: Importante Zoonose Na Amazônia Brasileira. *Veterinária e Zootec.* 20: 391–403.
- Castillo-Olivares J, Wood J 2004. West Nile virus infection of horses. *Vet. Res.* 35: 467–483.
- Causey OR 1958. Reservatórios e transmissores. *Memórias do Inst. Evandro Chagas* 6: 133–136.
- CEPERJ 2011. Divisão regional, segundo as mesorregiões geográficas e municípios - Estado do Rio de Janeiro - 2011.
- CEPERJ 2016. Área total dos municípios. *Estado do Rio Janeiro - Posição e Extensão.*

- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM 1990. Flavivirus Genome organization, expression and replication. *Rev. Microbiol.* 44: 649–688.
- Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M 2015. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Res. Int.* 2015: 1–20.
- Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH 1997. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J. Virol.* 71: 3466–3473.
- Clarke D, Casals J 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 5: 561–573.
- Diaz LA, Komar N, Visintin A, Juri MJD, Stein M, Allende RL, Spinsanti L, Königheim B, Aguilar J, Laurito M, Almirón W, Contigiani M 2008. West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 689–691.
- Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJA, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA 2001. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet. Parasitol.* 95: 89–131.
- Eiras AE 2005. Culicidae. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA (Eds.), *Parasitol. Humana*, Atheneu, São Paulo, pp. 355–367.
- Erlanger TE, Weiss S, Keiser J, Utzinger J, Wiedenmayer K 2009. Past, present, and future of Japanese encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 1–7.
- Erra EO, Korhonen EM, Voutilainen L, Huhtamo E, Vapalahti O, Kantele A 2013. Dengue in Travelers: Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia and Their Associations with Clinical Parameters. *PLoS One* 8.
- Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DWC, Coffey L, Carrara AS, Rosa AT Da, Clements T, Wang E, Ludwig G V., Campomanes Cortes A, Paz Ramirez P, Tesh RB, Barrett ADT, Weaver SC 2003. West Nile Virus in Mexico: Evidence of Widespread Circulation since July 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1604–1607.
- Figueiredo LTM 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2: 1643–1649.
- Figueiredo LTM 2007. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40: 224–229.
- Filette M De, Ulbert S, Diamond MS, Sanders NN 2012. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* 43.
- Flores EF, Weiblen R 2009a. O vírus do Nilo Ocidental. *Ciência Rural* 39: 604–612.
- Flores EF, Weiblen R 2009b. O vírus do Nilo Ocidental. *Ciência Rural* 39: 604–612.
- Fundação SOS Mata Atlântica Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais 2013. *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2011-2012*. São Paulo.

- Gamino V, Höfle U 2013. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: A review. *Vet. Res.* 44.
- General S, County J 1946. Louis.
- Genesig 2016. Quantification of West Nile Virus genomes. *genesig Stand. kit Handb.*: 1–11.
- Goés P, Bruno-Lobo M 1961. Estudos sobre arbovírus: síntese do problema e plano inicial de trabalho: Epidemiologia. *An Microbiol.* 9: 79–111.
- Gomes ADC 2002. Vigilância Entomológica. *Inf. epidemiológico do SUS* 11: 79–90.
- Gubler DJ 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 33: 330–342.
- Gubler DJ 2007. The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Clin. Infect. Dis.* 45: 1039–1046.
- Guedes MLP 2012. Culicidae (Diptera) No Brasil: Relações Entre Diversidade, Distribuição E Enfermidades. *Oecologia Aust.* 16: 283–296.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology. (N. Y).* 10: 413–417.
- Hofmeister EK 2011. West Nile virus: North American experience. *Integr. Zool.* 6: 279–289.
- Hubálek Z, Halouzka J 1999. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643–650.
- Hurk AF Van den, Ritchie S a, Mackenzie JS 2009. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 17–35.
- IBGE IB de G e E 2015a. Estados@. *Rio Janeiro, IBGE, Dep. Recur. Nat. e Estud. Ambient.*
- IBGE IB de G e E 2015b. Efetivo dos Rebanhos, por tipo de rebanho.
- ICMCBio 2014. Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de aves migratórias no Brasil. *CEMAVE/ICMBio*: 87.
- ICMCBio 2016. Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de aves migratórias no Brasil. *CEMAVE/ICMBio*: 87.
- Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, Ande SR, Alizadeh J, Wiechec E, Lindsay R, Drebot M, Coombs KM, Ghavami S 2016. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* 18: e1.
- Jeffcott LB 1974. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. *Equine vet J* 6: 109–115.

- Johnson AL 2011. Update on infectious diseases affecting the equine nervous system. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 27: 573–587.
- Karabastos N 1985. *International catalogue of arboviruses: including certain other viruses of vertebrates* (N Karabastos, Ed.). American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Tex.
- Karabastos N 1985. International Catalogue of Arboviruses. In: *Am Soc Trop Med Hyg.*, San Antonio, p. .
- Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD 2008. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog.* 4.
- Kitai Y, Shoda M, Kondo T, Konishi E 2007. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1024–1031.
- Komar N 2001. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951: 58–73.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth NM, Edwards E, Hettler DL, Bunning ML 2003. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 311–322.
- Kopp A, Gillespie TR, Hobelsberger D, Estrada A, Harper JM, Miller R a., Eckerle I, Müller M a., Podsiadlowski L, Leendertz FH, Drosten C, Junglen S 2013. Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus. *MBio* 4: 1–11.
- Kramer LD, Ciota AT 2015. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr. Opin. Virol.* 15.
- Kuno G 2003. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv Virus Res* 61: 65.
- Kuno G, Chang GJJ 2005. Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 608–637.
- Kuno G, Gómez I, Gubler D 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 33: 101–113.
- Lanciotti RS 2003. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res* 61: 67–99.
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT 2000. Rapid detection of

- West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4066–4071.
- Laporta GZ, Ribeiro MC, Ramos DG, Sallum MAM 2012. Spatial distribution of arboviral mosquito vectors (Diptera, Culicidae) in Vale do Ribeira in the South-eastern Brazilian Atlantic Forest. *Cad. Saude Publica* 28: 229–238.
- Lefrançois T, Blitvich BJ, Pradel J, Molia S, Vachi??ry N, Pallavicini G, Marlenee NL, Zientara S, Petitclerc M, Martinez D 2005. West Nile virus Surveillance, Guadeloupe, 2003-2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1100–1103.
- Levi JE, Geraldi MP, Torres KL, Torres MS, Gomes H, Mourão MPG, Colella R, Wendel S 2011. Investigação molecular da presença do vírus do oeste do nilo em doadores de sangue e pacientes de três regiões brasileiras. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 33: 399.
- Liang G, Gao X, Gould EA 2015. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg. Microbes Infect.* 4: e18.
- Lima-Camara TN 2016. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev. saúde pública* 50: 1–7.
- Lima RA de S, Cintra AG 2015. *Estudo do Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos*.
- Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice, C.M 2001. Flaviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virol.*, Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 810–851.
- Lopes N, Nozawa C, Linhares REC 2014. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 5: 55–64.
- Lopes O de S, Sacchetta L de A, Coimbra T, Pereira L 1979. Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 28: 583–585.
- Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A 2002. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 76: 5480–5491.
- Loroño-Pino M a, Blitvich BJ, Farfán-Ale J a, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, Rosado-Paredes EP, García-Rejón JE, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 857–859.
- MackAY R., Granstrom DE, Saviile WJA, Reed SM 2000. *Equine protozoal*

myeloencephalitis.

- Maeda A, Maeda J 2013. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet. J.* 195: 33–40.
- Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T 2009. Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 90: 1781–1794.
- MAPA M da AP e A 2016. Equideos.
- Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N 2005. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1497–1498.
- Melandri V, Guimarães AÉ, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, Alencar J, Bosch I 2012. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107: 1073–1075.
- Meulen KM Van Der, Pensaert MB, Nauwynck HJ 2005. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.* 150: 637–657.
- Minke JM., Siger L., Karaca K, Austgen L, Gordy P, Bowen R, Renshaw RW., Loosmore S., Audonnet JC., Nordgren B 2004. Recombinant canaripox vaccine carrying the prM,E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Arch. Virol.* 18: 221–230.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison C, Harrison SC 2005. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein †. *J. Virol.* 79: 1223–1231.
- Monath TP 2004. Yellow fever vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W (Eds.), *Vaccine*, Elsevier Ltd, Philadelphia, pp. 1095–1176.
- Mondini A, Vieira R, Bronzoni DM, Izabela L, Maria T, Lopes I, Eduardo L, Helena S, Nunes P, Celestino G, Silva D, Carolina M, Sarkis F, Rahal P, Tadeu L, Chiaravalloti F 2007. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. 40: 84–86.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Levis S, Enría D 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1559–1561.
- Mota MT de O, Terzian AC, Silva MLCR, Estofolete C, Nogueira ML 2016. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Brazilian J. Microbiol.*: 1–13.
- Murphy FA 1998. Emerging zoonoses. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 429–435.

- Murray KA, Daszak P 2013. Human ecology in pathogenic landscapes: Two hypotheses on how land use change drives viral emergence. *Curr. Opin. Virol.* 3: 79–83.
- Nassar ES, Coimbra TLM, Rocco IM, Pereira LE, Souza LTM, Souza DMU-I, Moura M, Bergo JP, Bergo RCF 1997. Human Disease Caused by an Arbovirus Closely Related to Ilheus Virus: Report of Five Cases. *Intervirology*: 247–252.
- Ometto T, Durigon Edison Luiz, Araujo Jansen de, Aprelon R, Aguiar DM de, Cavalcante GT, Melo RM, Levi JE, Junior SM de A, Petry MV, Neto IS, Serafini P, Villalobos E, Cunha EMS, Lara M do CASH, Nava AFD, Nardi MS, Hurtado R, Rodrigues R, Sherer AL, Sherer J de FM, Geraldi MP, Seixas MM, Moraes, Peterka C, Bandeira D de S, Pradel J, Vachier N, Labruna MB, Camargo LMA, Lanciotti R, Lefrançois T 2013. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 11: 723–730.
- Osorio JE, Ciuderis K a., Lopera JG, Piedrahita LD, Murphy D, LeVasseur J, Carrillo L, Ocampo MC, Hofmeister E 2012. Characterization of West Nile viruses isolated from captive American flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellin, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 565–572.
- Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ 2001. Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 665–669.
- Paniz-Mondolfi AE, Rodriguez-Morales AJ, Blohm G, Marquez M, Villamil-Gomez WE 2016. ChikDenMaZika Syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 15: 42.
- Papavero N, Guimarães JH 2000. The Taxonomy of Brazilian Insects Vectors of Transmissible Diseases (1900-2000) - Then and Now. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 109–118.
- Patz J, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley J 2005. Impact of regional climate change on human health. *Nature* 438: 310–317.
- Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LTM, Couto-Lima D, Campos Z, Nogueira MF, Silva EE da, Nogueira RMR, Schatzmayr HG 2011. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106: 467–474.
- Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Costa EV da, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, Nogueira MF, Silva EE da 2010. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses

- in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 829–833.
- Petersen L., Hayes EB 2008. West Nile virus in the Americas. *Med. Clin. North Am.* 92: 1307–1322.
- Pfeffer M, Dobler G 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit. Vectors* 3: 35.
- Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa APA, Leite OF 1981. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 145–148.
- Pinheiro F, Schatzmayr H, Travassos da Rosa A, Homma A, Bensabath G 1975. Arbovirus antibodies in children of rural Guanabara, Brazil. *Intervirology* 5: 93–96.
- Ratterree MS, Gutierrez RA, Travassos APA, Rosa D, Dille BJ, Beasley DWC, Bohm RP, Desai SM, Didier PJ, Bikenmeyer LG, Dawson GJ, Leary TP, Schochetman G, Phillippi-Falkenstein K, Arroyo J, Barrett ADT, Tesh RB 2004. Experimental Infection of Rhesus Macaques with West Nile Virus: Level and Duration of Viremia and Kinetics of the Antibody Response after Infection. *Source J. Infect. Dis.* 189: 669–676.
- Reed KD, Meece JK, Shukla SK 2003. Birds , Migration and Emerging Zoonoses : West Nile Virus , Lyme Disease , Influenza A and Enteropathogens. *Clin. Med. Res.* 1: 5–12.
- Reisen KW 2012. Human Demography, Environmental Change and the Emergence of Arboviruses. *J. Earth Sci. Clim. Change* 3: 1–2.
- Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP 2005. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. *47: 281–285.*
- Rodrigues S, Araujo FAA, Silva EVP, Oliva OP, Vasconcelos PFDC 2010. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul , Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 1: 81–86.
- Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT 2008. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 21: 123–132.
- Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MRQ, Teixeira MM, Paixão TA, Santos RL 2013. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a

- Horse with Neurological Disease in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souarès Y 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections. An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012 - 2014. *Eurosurveillance* 19: 1–8.
- Rulli MC, Santini M, Hayman DTS, D’Odorico P 2017. The nexus between forest fragmentation in Africa and Ebola virus disease outbreaks. *Sci. Rep.* 7: 41613.
- Saegerman C, Alba-Casals A, García-Bocanegra I, Dal Pozzo F, Galen G van 2016. Clinical Sentinel Surveillance of Equine West Nile Fever, Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 63: 184–193.
- Shortridge, KF, Burrows D 1997. Prevention of entry of avian influenza and paramyxoviruses into an ornithological collection. *Vet. Rec.* 140: 373–374.
- Sick H 1997. Espécies, visitantes, migrações. In: *Ornitol. Bras. uma introdução*, Universidade de Brasília, Brasília, pp. 129–131.
- Silva JR 2010. Pesquisa de infecções por Flavivírus da encefalite de Saint Louis , Rocio e Oeste do Nilo em cavalos , por inquérito sorológico e isolamento viral.
- Silva JR, Romeiro MF, Souza WM De, Munhoz TD, Borges GP, Augusto O, Soares B, Henrique C, Campos C De, Machado RZ, Luana M, Rodrigues C, Lara J, Faria M, Chávez JH, Figueiredo LTM 2014. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47: 414–417.
- Simmonds, P., Becher, B., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T. and IRC 2017 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 98: 2–3.
- T N, Hathaway D, Jennings N, Champ D, Chiang Y, Chu H 2003. Equine vaccine for West Nile virus. *Dev Biol* 114: 221–227.
- Tanizaki-Fonseca K, Moulton T. 2000. A fragmentação da mata atlântica no estado do Rio de Janeiro. In: *A fauna ameaçada extinção do Estado do Rio Janeiro*, EdUERJ, pp. 23–35.
- Terzian ACB, Mondini A, Bronzoni RVDM, Drumond BP, Ferro BP, Cabrera EMS, Figueiredo LTM, Chiaravalloti-Neto F, Nogueira ML 2011. Detection of Saint Louis encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11: 291–300.
- Travassos da Rosa, APA, Travassos da Rosa, JFS, Pinheiro, FP, Vasconcelos P 1997. Arboviroses. In: Leão RNQ (Ed.), *Doenças Infecç. e parasitárias – enfoque Amaz.*, CEJUP; UEPA; Instituto Evandro Chagas, Belém, pp. 207–225.

- Travassos da Rosa APA, Shope RE, Pinheiro FP 1989. Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: Uren M, Blok J, Manderson LH (Eds.), *Proc. fifth Symp. arbovirus Res. Aust.*, Brisbane: University of Queensland Medical School, pp. 4–8.
- Trock SC, Meade BJ, Glaser AL, Ostlund EN, Lanciotti RS, Cropp BC, Kulasekera V, Kramer LD, Komar N 2001. West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis* 7: 745–747.
- Tsai T, Popovici F, Cernescu C, Campbell G, Nedelcu N 1998. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352: 767–771.
- Urbinnati PR, Sendacz S, Natal D 2001. Imaturos de mosquitos (Diptera : Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. *Rev. Saude Publica* 35: 461–466.
- Valente RM, Silva JMC, Straube FC, Nascimento JLX 2011. *Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil* (F Segtowick, Ed.). Belém.
- Valle D, Pimenta DN, Aguiar R 2016. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 25: 419–422.
- Vasconcelos PF da C, Travassos da Rosa AP de A, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS 2001. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cad. Saude Publica* 17: 155–164.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, Travassos AP a, Pinheiro FP, Rodrigues SG 1998. An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries. : 1998.
- Vasconcelos PFC, Travassos AP a, Pinheiro FP, Travassos da Rosa JFS 2005. Arboviroses. In: FOCACCIA R (Ed.), *Tratado Infectol.*, Atheneu, São Paulo, pp. 289–302.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA 1991. *Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal*.
- Vianna R da ST 2010. Inquéritos soropidemiológicos em equinos da região sul do Brasil para detecção de anticorpos anti-flavivirus de interesse em saúde pública.
- Vieira MAC e S, Aguiar A de AX, Borba A de S, Guimarães HCL, Eulálio kelsen D, Albuquerque-Neto LL, Salmito M do A, Lima OB 2015. West Nile fever in Brazil: Sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57: 276.
- ViralZone 2016. Flavivirus. *Swiss Inst. Bioinforma.*

- Vogel P, Kell WM, Fritz DL, Parker MD, Schoepp RJ 2005. Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis virus in mice. *Am J Pathol* 166: 159–171.
- Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, Murray KO 2006. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. 118: 255–259.
- Weaver SC 2006. Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 299: 285–314.
- Weaver SC, Barrett ADT 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 789–801.
- Weaver SC, Powers ANNM, Brault AC, Barrett ADT 1999. Molecular Epidemiological Studies of Veterinary Arboviral Encephalitides. *Vet. J.* 157: 123–138.
- Weaver SC, Reisen WK 2010. *Present and Future Arboviral Threats*.
- Wen B, Lampe JN, Roberts AG, Atkins WM, Rodrigues AD, Nelson SD 2007. Relationships Between Host Viremia and Vector Susceptibility for Arboviruses. *October* 454: 42–54.
- Whately M 2008. *Parques urbanos municipais de São Paulo: Subsídios para a gestão*. São Paulo.
- WHO-World Health Organization 1985. *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores*. Geneva.
- WHO-World Health Organization 2007. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. : 26.
- WHO - World Health Organization 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec. Program. Res. Train. Trop. Dis.*: x, 147.
- Yanoviak S, Paredes J, Lounibos L, Weaver S 2006. Deforestation alters phytotelm habitat availability and mosquito production in the Peruvian Amazon. *Ecol Appl.* 16: 1854–64.
- Zeinad AK, Novaretti MCZ, Chamone DAF 2004. Vírus do Nilo Ocidental – Nova ameaça à segurança transfusional? *Ecologia* 26: 114–121.

9 ANEXOS

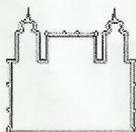
ANEXO A

QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE AMOSTRAS

Data da coleta									
Fazenda									
Região									
Município									
Rural/Urbano									
Criações									
Avifauna									
Florestas									
Presença de vetores									
Controle de vetores									
Residências no local									
Doenças na propriedade									
Observações									
Identificação do Animal								Quadro clínico	
Nome	Modalidade	Regime criação	Raça	Sexo	Idade	Pelagem	Tempo resid RJ	Sintomatologia	Material coletado

ANEXO B

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE E SIGILO



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Flavivírus
Laboratório de Referência para Dengue e Febre Amarela
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, 1º andar.
21040-900 - Rio de Janeiro - RJ - BRASIL
Tel/fax: (21) 2562-1779 e 2562-1707.

LABFLA

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE E SIGILO

Atendendo aos requisitos de confidencialidade das normas de gestão da qualidade aplicáveis ao Laboratório de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ, o profissional Flávia Löwen Levy Chalhoub, médica veterinária, inscrita no CPF: 092607177-79 RG: 11432120-1 matrícula: 15.02.2.7.003, compromete-se a assumir o compromisso de manter confidencialidade e sigilo sobre todas as informações relativas às atividades de coleta no campo, incluindo dados da amostragem (identificação dos animais) assim como da propriedade, relacionadas aos resultados da pesquisa de mestrado intitulado “Investigação da circulação do vírus da Encefalite de Saint Louis e do Oeste do Nilo em equinos do estado do Rio de Janeiro”, a que tiver acesso nas dependências e/ou nos trabalhos de coletas de campo do Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Pelo não cumprimento do presente Termo de Confidencialidade e Sigilo, fica o abaixo assinado ciente de todas as sanções judiciais que poderão advir.

Rio de Janeiro,

Flávia Löwen Levy Chalhoub

Assinatura do profissional

08/12/15

Ana Maria Bispo de Filippis

Assinatura da Chefe do Laboratório

08/12/15

Dra. Ana Maria Bispo de Filippis
Pesquisador Titular
Chefe LABFLA
IOC - FIOCRUZ
Mat. SIAPE 01435000

ANEXO C

DEFINIÇÕES DOS TERMOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DOS RESULTADOS:

A partir do teste sorológico, obtivemos os seguintes resultados:

- Reatividade inespecífica para flavivírus, onde foram incluídas todas as amostras que obtiveram reação positiva, incluindo as reações específicas, as monotípicas, aos dois antígenos (WNV e SLEV), mais as cruzadas;
- Reatividade para WNV onde foram incluídas todas as amostras que reagiram especificamente ao antígeno de WNV,
- Reatividade monotípica ao WNV onde foram incluídas as amostras que reagiram somente ao antígeno de WNV;
- Reatividade para SLEV onde foram incluídas todas as amostras que reagiram especificamente ao antígeno de SLEV,
- Reatividade monotípica ao SLEV onde foram incluídas as amostras que reagiram somente ao antígeno de SLEV;
- Reatividade para WNV e SLEV onde foram incluídas todas as amostras que reagiram ao antígeno WNV e SLEV,
- As reatividades descritas foram analisadas dentro de cada variável; segundo a sua localização geográfica, sexo, idade e função.