

UNIVERSIDADE FEDERAL DO GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL

**INQUERITOS SOROEPIDEMIOLÓGICO  
EM EQUINOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL PARA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS ANTI-*FLAVIVIRUS* DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA**

Ricardo da Silva Teixeira Vianna  
Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA  
2010

RICARDO DA SILVA TEIXEIRA VIANNA

**INQUERITOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS  
EM EQUINOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL PARA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS ANTI-*FLAVIVIRUS* DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal junto à Escola  
de Veterinária da Universidade  
Federal de Goiás

**Área de Concentração:**

Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade - UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria de Sá Jayme - UFG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wília Marta E.D.de Brito - UFG

GOIÂNIA

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

V614i Vianna, Ricardo da Silva Teixeira.  
Inquéritos soroepidemiológicos em eqüinos da região Sul do Brasil para detecção de anticorpos anti-*flavivírus* de interesse em saúde pública [manuscrito] / Ricardo da Silva Teixeira Vianna. - 2010.

xv, 49 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade; Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Valéria de Sá Jayme.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

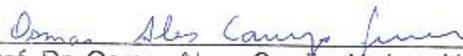
1. Arbovírus 2. Eqüinos 3. Inibição de Hemaglutinação 3. Flavivírus 4. Rocio 5. Saint Louis. I. Título.

CDU: 578.883.1

**RICARDO DA SILVA TEIXEIRA VIANNA**

Dissertação defendida e aprovada em **02/07/2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade  
(ORIENTADOR (A))

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Osmar Alves Carrizo Junior - UnB/DF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jurij Sobestiansky

Dedico este trabalho às vítimas das arboviroses na  
busca de uma ferramenta efetiva para o controle  
destes agravos em nosso país.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela sabedoria, disposição e saúde;

Aos meus familiares pela compreensão e amor, em especial ao meu pai Walter, mãe Celestina, avó Hilda e irmãs Roberta e Renata.

Ao meu grande presente de Deus, minha esposa Karina e meu filho Rafael, por me inspirarem a lutar por um mundo melhor;

Ao grande amigo e orientador Francisco Anilton Alves Araújo, que com certeza foi o grande responsável pela concretização de mais esta etapa da minha vida;

Aos amigos Geovani San Miguel Nascimento, Alessandro Pecego, meu cunhado Gustavo Poppius e cunhada Kátia Moura e demais pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram e deram força para a consolidação deste mestrado;

Ao Comitê de orientação e em especial as Prof<sup>as</sup>. Maria Auxiliadora Andrade e Valéria de Sá Jayme pela disponibilidade, amizade e orientação pertinente para a consolidação deste projeto;

À Secretaria de Vigilância em Saúde, Seu Secretário, seus diretores e Coordenadores, pela oportunidade;

Ao Exército Brasileiro, em especial ao 11º Depósito de Suprimento, seu Comandante e os demais veterinários do quadro de Oficiais pelo apoio e companheirismo;

À Escola de Veterinária-UFG e a todos os educadores e tutores que nos orientaram durante o curso.

"Há homens que lutam um dia, e são bons;  
Há outros que lutam um ano e são melhores;  
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;  
Mas há aqueles que lutam toda a vida, e esses são os imprescindíveis"

Bertolt Brecht

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>RESUME</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1. Família Flaviviridae .....	17
2.1.1. Saint Louis .....	19
2.1.2. Vírus Rocio .....	21
2.1.3. Vírus Ilhéus .....	22
2.1.4. Febre Amarela .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	26
3.1. Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivos específicos .....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1. Seleção da área .....	27
4.2. Cálculo da amostra .....	29
4.3. Seleção da amostra .....	29
4.4. Coleta de amostras .....	29
4.5. Variáveis estudadas .....	30
4.6. Teste de inibição de hemaglutinação .....	30
4.7. Análise estatística .....	31
<b>5. RESULTADOS</b> .....	32
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	43
<b>ANEXO 1</b> .....	49

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Localização dos municípios onde foram realizados inquéritos sorológicos em equinos para detecção de anticorpos anti- <i>Flavivirus</i> , Região Sul, Brasil.....	33
FIGURA 2 – Frequência de animais reagentes para <i>Flavivirus</i> , no período de março de 2007 a dezembro de 2008, Região Sul, Brasil .....	35
FIGURA 3 – Números de animais reagentes segundo o tipo de <i>Flavivirus</i> .....	35
FIGURA 4 – Frequência de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e sexo .....	37

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Identificação da unidade da federação, municípios onde foram realizados os inquéritos sorológicos em equinos, categoria números de animais. Região Sul, 2007 e 2008.....	30
TABELA 2 – Números de animais que participaram do estudo, segundo município, UF e ano. Região Sul, 2007 e 2008 .....	35
TABELA 3 – Frequência de animais reagentes segundo a faixa etária. Região Sul, 2007 e 2008 .....	38
TABELA 4 – Número de animais e percentuais de reagentes e negativos e odds ratio, segundo a UF. Região Sul, 2007 e 2008.....	40
TABELA 5 – Frequência de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e ano. Região Sul, 2007 e 2008.....	41
TABELA 6 – Números de animais e percentuais de reagentes, segundo o tipo de vírus e utilidade. Região Sul, 2007 e 2008.....	41
TABELA 7 – Frequência de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e faixa etária. Região Sul, 2007 e 2008.....	41
TABELA 8 – Números de animais e percentual de positividade segundo o tipo de <i>Flavivirus</i> e a titulação.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	Centro de Controle de Doenças de Atlanta
CF	Fixação do complemento
CTG	Centro de Tradição Gaúcha
DENG	Dengue
DGV	Dextrose, Gelatina, Veronal
EPIINFO	Epidemiologia e Informação
FA	Febra Amarela
HI	Inibição da Hemaglutinação
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IEC	Instituto Evandro Chagas
ILH	Ilhéus
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
NT	Neutralização
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
ROC	Rocio
SL	Saint Louis
TABWIN	Tabulador de Informações de Saúde para ambiente Windows
UFG	Universidade Federal de Goiás

UTRs	Região Não Traduzida
VDENG	Vírus da Dengue
VFA	Vírus da Febre Amarela
VILH	Vírus Ilhéus
VROC	Vírus Rocio
VSL	Vírus Saint Louis

## RESUMO

As arboviroses são enfermidades que acometem o homem, equinos e outras espécies animais causando na sua maioria das vezes infecções que vão desde assintomáticas até neurológicas. Os *Flavivirus* são importantes arbovírus encontrados no Brasil. Foi realizado um estudo descritivo a partir de inquéritos sorológicos em 1775 equinos para detecção de anticorpos anti-*Flavivirus* no Estado do Paraná (Foz do Iguaçu, Maringá e Barracão), Santa Catarina (São Miguel do Oeste, Guaraciaba, Iraceminha, Dionísio Cerqueira, Guarujá do Sul e São Jose do Cedro) e Rio Grande do Sul (Uruguaiana, São Borja, Itaqui, Alegrete e Porto Alegre) nos anos de 2007 e 2008. Por meio de testes de inibição da hemaglutinação (IH) foram detectados anticorpos IH de Saint Louis e Ilhéus e outros *Flavivirus* incluídos nos testes, assim como reações cruzadas para *Flavivirus*. Pelo teste de IH, 14,3% (254/1775) dos animais foram reagentes para *Flavivirus*, reações monoespecíficas foram observadas em 42,9% (109/254) amostras de soro, sendo que 78,9% (86/109) para *Saint Louis*, 17,4% (19/109) para *Ilhéus* e 3,7% (4/109) para *Rocio* e reações cruzadas foram detectadas em 57,1% (145/254). Dentre os animais reagentes, não foi observada diferença entre os sexos. A faixa etária  $\geq 10$  anos foi a mais acometida com 35,4% (73/206). Os animais utilizados para a prática do esporte foram reagentes em 34,3% (87/254). O Paraná apresentou 16,3% (107/657) dos animais reagentes, seguido do Rio Grande do Sul com 15,1% (142/939) e Santa Catarina com 2,8% (5/179). Este estudo traz novos dados a respeito da imunidade de equinos contra *Flavivirus* no Brasil, e confirma a ampla distribuição de Saint Louis e Ilhéus e a diversidade de *Flavivirus* no País, bem como a aparente ausência de doenças em equinos infectados pelos vírus estudados.

Palavras-chave: Arbovírus, Equinos; Inibição de Hemaglutinação; *Flavivirus*, Rocio; Saint Louis.

## ABSTRACT

The arboviruses are diseases that affect humans, horses and other animal species causing in the majority of cases an asymptomatic infection to neurological disorders. The *Flaviviruses* are important arbovirus found in Brazil. A descriptive study was conducted from serological surveys in 1775 horses for detection of anti-*Flavivirus* antibodies in the State of Paraná (Foz do Iguaçu, Maringá and Barracão), Santa Catarina (São Miguel do Oeste, Guaraciaba, Iraceminha, Dionisio Cerqueira, Guarujá do Sul and São José do Cedro) and Rio Grande do Sul (Uruguaiana, São Borja, Itaqui Alegrete and Porto Alegre) in the years of 2007 and 2008. By testing hemagglutination inhibition (HI) were detected HI antibodies of Saint Louis and Ilhéus and other *Flaviviruses* included in the tests, as well as cross-reactivity for *Flaviviruses*. By HI test, 14.3% (254/1775) of animals were positive for *Flavivirus*, monospecific reactions were observed in 42.9% (109/254) serum samples, being that 78.9% (86/109) for St. Louis, 17.4% (19/109) for Ilhéus and 3.7% (4 / 109) for Rocio and cross-reactions were detected in 57.1% (145/254). Among the positives, there was no difference between the sexes. The age group  $\geq 10$  years old was the most affected with 35.4% (73/206). The animals used for the practice of sport were positive in 34.3% (87/254). The state of Paraná showed 16.3% (107/657) of reacting animals, followed by Rio Grande do Sul with 15.1% (142/939) and Santa Catarina with 2.8% (5/179). This study brings new data regarding the immunity of horses against *Flaviviruses* in Brazil, and confirms the wide distribution of St. Louis and Ilhéus and the diversity of *Flavivirus* in the country, as well as the apparent absence of clinical disease in horses infected with the virus studied.

Keywords: Arbovirus; *Flavivirus*; Hemagglutination Inhibition; Horses; Rocio; Saint Louis.

## RESUME

Los arbovirus son las enfermedades que afectan a los humanos, caballos y otras especies animales haciendo que en su mayoría de los casos de infecciones que van desde forma asintomáticas hasta neurológicas. Los Flavivirus son importantes arbovirus encontrados en Brasil. Fue un estudio descriptivo de las encuestas sorológicas en 1775 los caballos para la detección de anticuerpos anti-Flavivirus en la Provincia del Paraná (Foz de Iguacu, Maringá y Barracão) Santa Catarina (São Miguel do Oeste, Guaraciaba, Iraceminha, Dionísio Cerqueira, Guarujá do Sul y São José do Cedro) y Rio Grande do Sul (Uruguayana, São Borja, Itaqui, Alegrete y Porto Alegre) para los años 2007 y 2008. Por medio de pruebas de inhibición hemaglutinación (IH) fueron detectados anticuerpos IH de Saint Louis, Ilheus y otros *Flavivirus* incluso en las pruebas, así como reacciones cruzadas para Flavivirus. En pruebas de IH, el 14,3% (254/1775) de los animales fueron reagentes para las reacciones *Flavivirus* monoespecíficas se observaron en el 42,9,9% (109/254), las muestras de suero, y el 78,9% (86/109) para Saint Louis, el 17,4% (19/109) para Ilheus y el 3,7% (4/109) para Rocio y reacciones cruzadas fueran detectadas en 57,1% (145/254). Entre los suero reagentes no se demostraron diferencia entre los sexos. En el rango de edad 10 años fue la más afectada con 35,4% (73/206). Los animales utilizados para la práctica del deporte fueron reagentes en el 34,3 (87/254). El Paraná presentó un 16,3% (107/657) de los animales reagentes seguido del Rio Grande do Sul con 15,1% (142/939) y Santa Catarina con 2,8% (5/179). Este estudio aporta nuevos datos con respecto a la inmunidad de caballos contra el *Flavivirus* en el Brasil, y confirma su amplia distribución de Saint Louis y Ilheus, y la diversidad de *Flavivirus* que hay en el País, bien como la aparente ausencia de enfermedad en caballos infectados por el virus estudiado.

Palabra clave: Arbovirus; Caballos; *Flavivirus*; Inhibición Hemaglutinación; Rocio; Saint Louis.

## 1. INTRODUÇÃO

A evolução humana teve origem a partir do surgimento do *Homo sapiens*, como espécie distinta de outros hominídeos, grandes macacos e dos mamíferos placentários, enquanto que a evolução dos artrópodes no mundo é mais antiga considerando sua diversidade e onipresença do que a recente evolução dos humanos (MARCONDES, 2009).

Dentre os artrópodes, vários tipos de insetos desenvolveram a capacidade de sugar sangue, adquirindo esta importante fonte de proteína. Assim, numerosos agentes patogênicos foram se adaptando à transmissão entre vertebrados por este mecanismo que, apesar de ser mais complexo, apresenta grande capacidade de dispersão e multiplicação.

Os vírus são encontrados no meio ambiente, no solo, na água e no ar. São, basicamente, encontrados em qualquer lugar onde existam células para infectar. Evoluíram e apresentam capacidade de contaminar toda forma de vida, do animal ao vegetal e dos fungos às bactérias. No entanto, os vírus tendem a ser pouco exigentes quanto ao tipo de células que infectam, sendo que um vírus pode infectar um animal e não fazer nenhum agravo, mas causa danos quando penetra em um indivíduo diferente.

Os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, predominando nas regiões tropicais, onde encontram condições ecológicas favoráveis para a sua propagação. Apesar do grande número de tipos distintos de vírus isolados, existem poucas informações relativas aos mesmos (FARHAT et al., 2007).

As arboviroses são enfermidades causadas por vírus pertencentes a diversas famílias, na maioria das vezes transmitidas e perpetuadas na natureza entre animais suscetíveis por meio de vetores hematófagos infectados, ou entre estes através da via transovariana. Na década de 90, haviam sido identificados pelo menos 100 tipos diferentes de vírus causadores de doença em humanos (PINHEIRO, 1996).

Os agentes patogênicos, os reservatórios, os hospedeiros susceptíveis, os vetores e o meio ambiente participam de uma interação que, compartilhada com os seres humanos e animais, leva ao aparecimento de doenças, com conseqüências

para a sanidade animal e a saúde pública e se convertem em sérios problemas para o bem estar destas populações (PINHEIRO, 1996).

A transmissão dessas enfermidades para o homem e animais domésticos ocorre sob duas premissas diferentes: ciclo silvestre ou rural e ciclo de transmissão urbana. No primeiro caso, as pessoas e animais se infectam ao entrarem em áreas enzoóticas que seriam áreas silvestres com circulação viral ou quando ocorre uma extensão da atividade viral destas áreas para os locais próximos ocupados pelo homem. No segundo caso, o hospedeiro infectado, pode iniciar um ciclo "urbano" envolvendo um vetor doméstico capaz de infectar pessoas ou animais, domésticos ou sinantrópicos, em alguns casos causando epizootias ou epidemias (VASCONCELOS et al., 2001b).

As aves e alguns mamíferos são apontados como hospedeiros vertebrados mais importantes para manutenção de um grande número de arboviroses e em alguns casos, répteis e anfíbios estão associados com a sua transmissão (FIGUEIREDO, 2007).

Assim como outras enfermidades causadas por vírus, a Febre do Nilo Ocidental, as Encefalites Eqüinas, de Saint Louis e Rocio são zoonoses que se perpetuam na natureza graças a hospedeiros invertebrados e vertebrados, com um ciclo epizoótico onde participam mosquitos, aves e equinos e outro ciclo que é epizoótico ou natural, no qual participam mosquitos, roedores, morcegos e aves entre outras espécies silvestres.

Para a vigilância dessas enfermidades, hoje tem sido preconizada em todo o mundo a realização de inquéritos sorológicos em espécies animais susceptíveis, como equinos e aves, objetivando a detecção precoce da evidência de circulação desses agentes ainda nestas populações antes do aparecimento de casos humanos.

Tendo em vista a importância de algumas espécies de animais domésticos, em especial os eqüídeos, como reservatórios susceptíveis e hospedeiros de vírus de encefalites, o presente estudo tem como objetivo detectar anticorpos anti-*Flavivirus* de interesse em saúde pública nesta espécie, para a partir dos resultados obtidos definir as medidas de prevenção e controle de epizootias e o risco de ocorrência de casos em humanos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo MARCONDES (2009), arboviroses são grupos de doenças causadas por diversos vírus ecologicamente bem definidos chamados arbovírus. Estes, segundo a definição da OMS (1985), “são vírus transmitidos em natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros suscetíveis por meio de artrópodes hematófagos ou de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode, através da via transovariana e, possivelmente, da via venérea. São repassados a novos vertebrados suscetíveis através da picada do inseto, após um período de incubação extrínseca”.

Segundo FARHAT et al. (2007), as manifestações clínicas em seres humanos decorrentes de infecções por arbovírus podem ser reunidas em quatro categorias: doença febril (vírus Mucambo, vírus Oropouche e outros), doença febril exantemática (vírus Dengue e Mayaro), febre hemorrágica (vírus da Febre Amarela e Dengue) e encefalite (vírus da Encefalite Equina do Leste, Encefalite Equina do Oeste, vírus do Nilo Ocidental, da encefalite Saint Louis e Rocio), que varia em gravidade desde meningite asséptica até casos fatais.

No Brasil, são reconhecidos atualmente aproximadamente 37 tipos diferentes de arbovírus relacionados com infecções humanas adquiridas na natureza ou em laboratório, dos quais 34 já foram isolados na Amazônia. Destas, são relevantes, pelo poder patogênico para o homem, os vírus do dengue, da febre amarela, Rocio, Oropouche e Mayaro (PINHEIRO et al., 1996).

Os arbovírus estão taxonomicamente distribuídos em diversas famílias, como *Picornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae* (OMS, 1985). Atualmente, os arbovírus estão taxonomicamente classificados de acordo com o 8º International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), referência padrão e definitiva para a taxonomia viral (KARABATSOS, 1985; FAUQUET et al., 2005).

## 2.1. Família Flaviviridae

A família *Flaviviridae* é taxonomicamente composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus* e possui partículas esféricas envelopadas de 40 a 60 nm de diâmetro, com genoma RNA fita simples de polaridade positiva (ACKERMANN & BERTHEAUME, 1995). De acordo com o ICTV, no gênero *Flavivirus* estão classificadas aproximadamente 50 espécies virais de difícil identificação morfológica e taxonomicamente divididas em dez grupos antigenicamente relacionados (FAUQUET et al., 2005; SCHATZMAYR & BARTH, 2005).

As diferentes espécies de vírus classificados no gênero *Flavivirus* são mais divergentes entre si quando comparadas com a divergência existente entre os membros dos gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus*. No entanto, as estruturas secundárias nas regiões UTRs 5' e 3' do RNA genômico são conservadas entre as espécies desse gênero. De acordo com essas características, os vírus do gênero *Flavivirus* podem ser divididos em três grupos genômicos, segundo FLORES (2007):

- a) *Flavivirus* transmitidos por carrapatos compreendem: vírus Gadget Gully, Kyasanur Forest, Langat, Louping Ill, febre hemorrágica Omsk, Powassan, Royal Farm, *Tick-borne encephalitis*, Seabird tick-borne, Kadam, Meaban, Saumarez Reef e vírus Tyuleniy.
- b) *Flavivirus* transmitidos por mosquitos: vírus Aroa, dengue, Kendougou, Cacicapore, encefalite japonesa, Koutango, encefalite Murray Valley, Nilo Ocidental, Yaounde, Kokobera, Ntaya, Bagaza, Ilhéus, Israel turkey, Tembuso, Zika, Banzi, Bouboui, Edhe Hill, Jugra, Saboya, Sepid, Uganda, Wesselbron e vírus da febre amarela.
- c) *Flavivirus* sem vetor artrópode conhecido: vírus Entebbe dos morcegos, Yokose, Modoc, Apoi, Cowbone Ridga, Sal Vieja, San Perlita, Rio Bravo, Bukalasa dos morcegos, Carey Island, Dakar Bat, Montana Myotis, Phnom Pehn Bat.

No Brasil, os principais *Flavivirus* já reportados como agentes etiológicos em arboviroses humanas febre amarela (FA), dengue (DENG), Saint Louis (SL) e Rocio (ROC) estão taxonomicamente agrupados de acordo com suas características antigênicas em grupo do vírus da febre amarela, grupo do vírus dengue e o grupo do vírus da encefalite japonesa (IVERSSON et al., 1989; ROCCO et al., 2005).

Enquanto os *Flavivirus*, como gênero, apresentam uma ampla distribuição geográfica, as espécies virais são restritas a certas regiões e estão relacionadas com a presença da espécie de vetor envolvida na transmissão. O vírus da FA é encontrado apenas em regiões tropicais e subtropicais da África e da América do Sul. O vírus da Dengue é encontrado somente em áreas tropicais da Ásia, Oceania, África, Austrália, América do Sul e do Norte. O vírus da Encefalite Japonesa é restrito ao sudoeste da Ásia, enquanto o vírus da Encefalite do Carrapato é encontrado na Europa e Norte da Ásia (FLORES, 2007).

A maioria dos *Flavivirus* é mantida na natureza por meio da replicação alternada em hospedeiros invertebrados (artrópodes hematófagos) e em vertebrados. Os vetores invertebrados se infectam ao ingerir o sangue de um vertebrado infectado. O vírus replica nos tecidos do vetor e, após alguns dias, pode ser transmitido a outros hospedeiros vertebrados pela picada do inseto que inocula o agente juntamente com a saliva. Os principais hospedeiros vertebrados, para a maioria dos *Flavivirus*, são diferentes espécies de pássaros ou de mamíferos silvestres. A infecção de humanos ou de animais domésticos é tipicamente incidental e não é necessária para a manutenção do vírus na natureza. No entanto, esporadicamente, pode-se observar transmissão do agente entre humanos e entre animais domésticos. A exceção é o vírus da dengue, que é mantido em populações humanas pela transmissão por mosquitos (FLORES, 2007).

A epidemiologia dos *Flavivirus* é diferente entre os diferentes gêneros e mesmo entre os membros de um mesmo gênero e é bastante complexa para alguns vírus. Ou seja, vários fatores precisam estar presentes para que ocorra a infecção em um indivíduo ou em um rebanho. Alguns *Flavivirus* dependem de diferentes espécies de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Para outros, o ciclo de transmissão permanece não esclarecido. Enquanto muitos requerem artrópodes como vetores, 12% das espécies de *Flavivirus* conhecidos são agentes com potencial zoonótico transmitidos entre roedores e morcegos, não se tendo conhecimento de nenhum vetor artrópode. A infecção dos vetores artrópodes é geralmente crônica e vitalícia (FLORES, 2007).

### 2.1.1. Saint Louis

A Encefalite Viral de Saint Louis é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo vírus Saint Louis (VSL). O primeiro isolamento do VSL ocorreu durante um surto em 1933, na cidade de St. Louis em Kansas, Estados Unidos, e desde então relatos de casos e surtos têm ocorrido na América do Norte (SÃO PAULO, 2006).

São reportados casos de VSL em todo o continente americano, entretanto o maior número de casos vem sendo registrado na América do Norte e principalmente nos Estados Unidos, onde reportam-se epidemias por VSL em todas as regiões geográficas daquele país. Entre 1964 e 2006 foram reportados nos Estados Unidos mais de 4600 casos da doença (SPINSANTI et al., 2003; CDC, 2007).

O vírus VSL está distribuído amplamente da Argentina ao Canadá. Na América do Sul, a infecção humana por VSL também foi relatada, destacando-se uma epidemia envolvendo em 2005, 47 casos clínicos confirmados que foi descrita na província argentina de Córdoba (ACHA & SZYFRES, 2003; SPINSANTI et al., 2008).

No Brasil diversos trabalhos têm demonstrado a circulação de VSL em população humana, desde a década de cinquenta (SHOPE et al., 1964). Em 2006, durante uma epidemia de DENG-3 na cidade de São José do Rio Preto em São Paulo, a presença de vírus identificados como VSL foi detectada em seis pacientes negativos e um reagente para DENG, demonstrando a possibilidade de uma reação cruzada no diagnóstico de dois *Flavivirus* ou ainda de uma infecção pelos dois vírus ao mesmo tempo. O seqüenciamento nucleotídico dos oligonucleotídeos específicos detectados por Multiplex Nested RT-PCR revelou seqüências idênticas entre si e homologia de 96% ao isolado argentino AY6-32544 (MONDINI et al., 2007).

Dos animais silvestres, as aves são consideradas o mais importante grupo de manutenção e amplificação do vírus na natureza (TSAI et al., 1988). Na Amazônia, através de um estudo sorológico realizado em mais de 11 mil espécimes de aves, 54 espécies foram consideradas hospedeiras, inclusive com isolamento viral em 18 delas (VASCONCELOS et al., 1991).

Entre os animais domésticos, a circulação de VSL tem sido identificada principalmente em eqüinos em prevalências discrepantes. Em um inquérito soropidemiológico para arbovírus realizado em cavalos na Argentina entre 1977 e 1980, a presença de anticorpos neutralizantes para VSL foi identificada em 58% dos animais (MONATH et al., 1985).

Em 2006, anticorpos para o vírus Saint Louis foram encontrados em primatas não-humanos (*Aloutta fusca clamitans* – bugio ruivo e *Alouatta caraya* – bugio negro) em quatro municípios do Rio Grande do Sul. Dados recentes mostram que equinos da região do Pantanal apresentam anticorpos para o vírus Saint Louis, faltando, porém, mais dados sobre a circulação do agente em outras regiões do País (MARCONDES, 2009).

O ciclo de manutenção do vírus VSL parece essencialmente um ciclo do tipo aves-mosquitos. Além de numerosos isolamentos a partir de aves, inúmeras amostras foram obtidas a partir de mosquitos *Culex declarator* e *Culex coronator*, duas espécies fortemente ornitofílicas, mas, também primatófilas. A passagem do vírus por outros mamíferos (incluindo o homem) é relativamente freqüente. É nesse nível do ciclo que podem intervir outros vetores como *Aedes*, *Mansonia* e *Sabethes*, cujas preferências tróficas são muito diversificadas. Assim, ciclos secundários existem certamente em níveis diferentes da floresta. Participam roedores e marsupiais no solo, e macacos, na copa (HERVÉ et al., 1986).

Quanto aos hospedeiros invertebrados, atribui-se a transmissão de VSL basicamente a insetos, principalmente culicídeos identificados a *Culex*, *Aedes*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Trichoprosopon* e *Wyeomyia* (FIGUEIREDO, 2007).

Encefalite de Saint Louis pode confundir-se clinicamente com outras enfermidades febris ou com encefalite ou meningite asséptica causada por diferentes agentes (ACHA & SZYFRES, 2003).

À infecção sintomática pelo vírus da Encefalite de Saint Louis (VSL), *Flavivirus* antigenicamente associado ao grupo do vírus da encefalite japonesa, são atribuídas zoonoses acometendo principalmente aves no Novo Mundo. Ocasionalmente, a infecção sintomática por VSL é reportada em seres humanos em

quadros clínicos que normalmente envolvem febre aguda e encefalite (MONATH & HEINZ, 1996).

O controle do vetor tem sido o método mais utilizado na prevenção e controle da enfermidade. A experiência dos estados da Flórida e Texas, nos Estados Unidos, tem sido da recomendação para o uso de inseticida a partir da soroconversão em aves domésticas utilizadas como sentinelas e do isolamento do vírus em mosquitos, respectivamente (ACHA & SZYFRES, 2003).

A viremia é rápida e, por conseqüência, o isolamento e a aplicação de métodos moleculares para o diagnóstico, como a reação de PCR, podem apresentar resultados negativos mesmo em casos agudos. O isolamento do vírus em casos fatais pode ser obtido a partir do SNC, fígado, baço e rins (MARCONDES, 2009).

O método de diagnóstico mais seguro é a titulação de anticorpos neutralizantes, em duas amostras de soro colhidas no início e em fase mais avançadas do quadro clínico, técnica que fica, contudo, restrita a laboratórios de referência. A determinação de anticorpos do tipo IgM indica uma infecção recente pelo vírus. Em locais com circulação de outros *Flavivirus* deve-se realizar sorologias com outros antígenos do grupo (MARCONDES, 2009).

### 2.1.2. Vírus Rocio

A encefalite do Rocio é uma zoonose emergente, que se apresentou pela primeira vez em março de 1975 no litoral do sul do estado de São Paulo, Brasil. Em março de 1975 e julho de 1978 ocorreram 821 casos humanos, com 10% de letalidade; desde então não ocorreram mais casos. A epidemia se propagou por 20 municípios do Vale do Ribeira e Baixada Santista. A região é baixa, muito úmida e quente, coberta de florestas residuais, própria para acúmulo de águas paradas e cria de mosquitos (ACHA & SZYFRES, 2003 apud IVERSSON, 1980).

Ao vírus Rocio (VROC), foram atribuídas muitas epidemias de meningoencefalites em comunidades costeiras da região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo, durante a década de 1970 (MARCONDES, 2009; TIRIBA et al., 1976). Após a epidemia de 1975, apesar da detecção de infecções sintomáticas por VROC até o início da década de 1980, em 80 casos notificados de encefalite

entre 1978 e 1983 a infecção por VROC foi confirmada em apenas um (IVERSSON & COIMBRA, 1984).

O ciclo natural de transmissão do VROC não é bem conhecido, contudo estudos ecológicos e experimentais sugerem que as aves silvestres constituem os principais hospedeiros vertebrados e que aves domésticas podem atuar como hospedeiros amplificadores. Durante a epidemia de 1975, a circulação em aves foi confirmada através de isolamento viral em um espécime silvestre identificado a *Zonotrichia capensis*, popularmente conhecido como tico-tico. Com relação a hospedeiros invertebrados, a principal espécie envolvida no ciclo de transmissão ainda não é conhecida, entretanto o único isolamento viral em grupos de artrópodes ocorreu em espécimes de culicídeos identificados a *Psorophora ferox* coletados durante a epidemia de 1975 (LOPES et al., 1981).

A alta taxa de aves silvestres com anticorpos para o vírus Rocio faz suspeitar que elas atuem como reservatório natural da infecção, enquanto os mamíferos são descartados devido à escassa detecção de anticorpos desse vírus (ACHA & SZYFRES, 2003).

Após o episódio original, o vírus nunca mais foi encontrado associado a casos clínicos humanos, porém em 1989 o exame de dois soros humanos coletados no Vale do Ribeira demonstrou a presença de anticorpos recentes para o vírus, sendo registrada também sua presença no Pará e na Bahia (MARCONDES, 2009).

### 2.1.3. Vírus Ilhéus.

O vírus Ilhéus (VILH) tem um genoma RNA, já foi isolado de diferentes espécies de aves e primatas sentinelas (*Cebus spp.*) e a infecção no homem transcorre da forma clinicamente inaparente na maioria dos casos ou produz uma enfermidade febril indiferenciada e leve (ACHA & SZYFRES, 2003).

Em 1944, durante investigação epidemiológica em área endêmica de febre amarela no nordeste do Brasil, a tentativa de isolamento viral de grupos de culicídeos compostos predominantemente pelas espécies *Aedes serratus* e *Psorophora ferox* detectou a presença de um novo vírus neurotrópico. Além do isolamento viral, a detecção de soropositividade em trabalhadores locais e a

demonstração experimental da capacidade de transmissão viral pelos culicídeos *Aedes serratus*, *Psorophora ferox* e *Aedes aegypti* confirmaram a circulação na Bahia de um arbovírus ainda não previamente detectado, então denominado vírus Ilhéus (VILH) (LAEMMERT & HUGHES, 1947).

A manutenção de VILH na natureza é atribuída ao ciclo silvestre envolvendo a espécie *Psorophora ferox* como principal hospedeiro invertebrado (TURELL et al., 2005). Entretanto partículas virais identificadas a VILH também já foram isoladas em espécimes identificados a *Psorophora albipes*, *Aedes fulvus* e *Haemagogus leucocelaenus* (VASCONCELOS et al., 1991).

Com relação aos animais silvestres, um programa de vigilância epidemiológica para arbovírus realizada em região de Mata Atlântica em São Paulo entre 1978 e 1990 avaliou mais de 39 mil espécimes de aves silvestres, identificando anticorpos para VILH em 20 espécies, entre residentes e migratórias (FERREIRA et al., 1994).

Em 2001, em outro estudo de vigilância realizado com animais silvestres do Parque Ecológico do Tietê na cidade de São Paulo, a circulação de VILH na avifauna local foi detectada através de isolamento viral e sorologia. Além das aves, a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação por VILH também foi detectada em primatas não humanos identificados às espécies *Callithrix jacchus* (sagüi-de-tufo-branco) e *Callithrix penicillata* (sagüi-de-tufo-preto) e, em um carnívoro da espécie *Nasua nasua* (quati) (PEREIRA et al., 2001).

O isolamento inicial do vírus ILH foi obtido a partir da mistura (pool) de mosquitos *Aedes sp.* e *Psorophora sp.* capturados em Ilhéus, Bahia, em 1944 (KARABATSOS, 1985). Este agente é amplamente distribuído nas Américas do Sul e Central e se mantêm endemicamente através de ciclos de transmissão e possuindo diversas espécies de artrópodes como vetores. Na Amazônia, Colômbia, Panamá e Trinidad, a *Psorophora ferox*, é um dos vetores mais importantes, e com referência aos hospedeiros vertebrados os morcegos, aves silvestres, macacos e equinos (LEÃO, 1997).

O vírus é relacionado antigenicamente ao vírus ROC. Ambos são vírus encefalitogênicos, sendo o ILH o mais distribuído no Brasil, em particular na

Amazônia brasileira onde tem sido isolado sistemicamente de diversas espécies de animais silvestres e artrópodes vetores, bem como de modo esporádico de seres humanos. A prevalência de anticorpos neutralizantes para esse agente em seres humanos na Amazônia tem variado de 3 a 36% (PINHEIRO et al., 1986).

#### 2.1.4. Febre Amarela

A febre amarela é definida como uma doença infecciosa febril aguda de curta duração causada por um arbovírus, cuja forma clássica se caracteriza por um quadro ícterohemorrágico. Possui dois ciclos epidemiológicos distintos (silvestre e urbano) e grande importância epidemiológica, por sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação em áreas urbanas. Apresenta-se como infecções sub-clínicas e/ou leves, até formas graves e fatais (NASSAR et al., 1997; CASALI et al., 2004).

Essa doença se mantém endêmica e enzoótica em diversas regiões tropicais da América e da África e é responsável por surtos e epidemias periódicas, de maior ou menor magnitude devido ao potencial de disseminação e transmissão bastante elevado, é potencialmente epidêmica, sendo controlável por vacinação (CASALI et al., 2004).

Já o vírus da Febre Amarela se mantém na natureza principalmente através de ciclos enzoóticos silvestres, envolvendo hospedeiros invertebrados como vetores e reservatórios e primatas não-humanos (PNH) como hospedeiros vertebrados susceptíveis (BRASIL, 1999).

De acordo com a ecologia da doença são reconhecidas duas modalidades epidemiológicas da febre amarela, a silvestre e a urbana. Entre elas não existem diferenças etiológicas, clínicas e fisiopatológicas, mas sim nos elementos que formam o ciclo de manutenção (BRASIL, 1999). Atualmente, em virtude da expressiva diminuição do ciclo urbano, a febre amarela é essencialmente uma zoonose endêmica sazonal em florestas africanas e sul-americanas delimitadas pelo paralelo 12 das latitudes norte e sul (BRASIL, 2004).

Em um ciclo silvestre os elementos envolvidos são primatas silvestres como hospedeiros vertebrados susceptíveis e culicídeos como vetores e reservatórios do

vírus amarelo, enquanto na modalidade urbana o homem é o hospedeiro vertebrado susceptível e culicídeos antropofílicos são os vetores (BRASIL, 2004).

Epizootias atribuídas à infecção por FA envolvendo PNH neotropicais são comumente reportadas e demonstram coeficientes de morbidade e letalidade maiores que os observados na África (VASCONCELOS et al., 1998). Entre os primatas não-humanos neotropicais, espécies identificadas aos gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e *Ateles* apresentam alta susceptibilidade ao vírus com coeficientes de letalidade elevados, enquanto *Cebus* spp. apresenta baixos coeficientes de letalidade e geralmente desenvolvem imunidade (BRASIL, 1999).

As principais espécies envolvidas são *Aedes aegypti* em ciclo urbano e *Aedes africanus* em ciclo silvestre no continente africano e *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes chloropterus* em ciclo silvestre na América do Sul (VARMA, 1989; VASCONCELOS et al., 2001). Atualmente restrito a alguns países africanos, a manutenção viral em ambiente urbano não é detectada no Brasil desde 1942, entretanto, alguns casos isolados não autóctones vêm sendo esporadicamente reportados em cidades brasileiras (BRASIL, 2008).

Entre 2000 e 2004, foram reportados 3.208 casos de febre amarela no mundo. Dos 2.579 casos registrados no continente africano, mais da metade foi reportada em Guiné e Costa do Marfim. No mesmo período foram reportados 629 casos na América do Sul, sendo 385 notificados em Brasil e Colômbia. Em 2004, apesar do menor número de casos sul-americanos em relação a África, o coeficiente de letalidade da febre amarela na América do Sul foi de 47%, superando os 11% reportados no continente africano (OMS, 2005a; 2005b; 2007).

A possibilidade do surgimento de novos casos humanos é real e deve ser monitorada pelos sistemas de vigilância epidemiológica (MARCONDES, 2009).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Realizar inquéritos soropidemiológicos em eqüinos da região Sul do Brasil para detecção de anticorpos anti-*Flavivirus* de interesse em saúde pública.

#### 3.2. Objetivos específicos

- 1- Pesquisar a presença de anticorpos anti-*Flavivirus* em soros de eqüinos oriundos dos estados da região Sul;
- 2- Caracterizar os animais que participaram dos inquéritos, considerando, sexo, idade e utilidade do animal;
- 3- Identificar possíveis áreas de risco da ocorrência dos *Flavivirus* de interesse em saúde pública;
- 4- Determinar a prevalência da infecção considerando o perfil dos animais e a sua localização geográfica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

No período de março de 2007 a dezembro de 2008 conduziu-se um estudo epidemiológico transversal descritivo, com realização de 15 inquéritos sorológicos em equinos para detecção de anticorpos de *Flavivirus* de interesse em saúde pública em 14 municípios do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Para identificação dos animais que participaram do inquérito foi elaborada uma resenha (anexo 1) contendo as informações consideradas de relevância e preenchida com os dados de cada animal incluído no estudo para criação de um banco de dados composto por: município, estado, nome do proprietário, nome e/ou número do animal, local de realização do inquérito, local de moradia do animal, idade, sexo, utilidade, histórico vacinal contra raiva, encefalites eqüinas, influenza equina e tétano, além de história de viagem para países de ocorrência da Febre do Nilo Ocidental e outros indicadores considerados importantes.

### 4.1. Seleção da área

Para seleção dos municípios dos três estados da Região Sul, onde foram realizados os inquéritos, foram pré-definidas duas categorias amostrais, a primeira formada por municípios de fronteira que obtivessem capacidade logística/estrutural e limítrofes com os países da América do Sul com ocorrência de casos de Febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses e a segunda por municípios onde ocorrem feiras agropecuárias, festas do laço, cavalgadas, ou aglomerações de animais de diversas regiões do estado ou País, registrados na Tabela 1.

TABELA 1 – Identificação da unidade da federação, municípios onde foram realizados os inquéritos soropidemiológicos em equinos, categoria números de animais. Região Sul, 2007 e 2008.

<b>UF</b>	<b>Município</b>	<b>Categoria</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>% de animais</b>
PR	Foz do Iguaçu	Fronteira	374	21,0
	Maringá	Evento	283	15,9
	Barracão	Fronteira	14	0,8
<b>Sub-total</b>			<b>671</b>	<b>37,8</b>
SC	São Miguel do Oeste	Fronteira	34	1,9
	Guaraciaba	Fronteira	33	1,8
	Iraceminha	Fronteira	21	1,2
	Dionisio Cerqueira	Fronteira	32	1,8
	Guarujá do Sul	Fronteira	24	1,3
	São Jose do Cedro	Fronteira	21	1,2
<b>Sub-total</b>			<b>165</b>	<b>9,3</b>
RS	Uruguaiana	Fronteira	417	23,5
	São Borja	Fronteira	84	4,7
	Itaqui	Fronteira	81	4,5
	Alegrete	Fronteira	37	2,0
	Porto Alegre	Evento	320	18,0
<b>Sub-total</b>			<b>939</b>	<b>52,9</b>
<b>Sub-total evento</b>			<b>603</b>	<b>34,0</b>
<b>Sub-total fronteira</b>			<b>1172</b>	<b>66,0</b>
<b>Total</b>			<b>1775</b>	<b>100,0</b>

#### 4.2. Cálculo da amostra

O tamanho da amostra foi calculado considerando-se grau de confiança de 95%, erro máximo tolerado de 5% e para a prevalência estimada de sorologia positiva que não foi ainda estabelecida, sendo, portanto atualmente desconhecida, o valor de 50%. O número da amostra representativa calculada foi de 384 animais por inquérito. Entretanto, este número por inquérito variou de acordo com o município e região, tendo como limite inferior de 174 animais e limite superior de 374 animais, em decorrência da capacidade de análise do laboratório, o número de animais existentes nas localidades e os recursos financeiros disponíveis.

#### 4.3. Seleção da amostra

Como critérios para seleção dos animais que participaram do inquérito incluem-se: o animal ter proprietário e o mesmo dar anuência para coleta de sangue; ter conhecimento da idade estimada do animal, priorizando-se a coleta de sangue de animais jovens; aparente bom estado de saúde e como critérios de exclusão não foram aceitas para participar do estudo éguas prenhas ou recém paridas, devido ao stress dos animais no momento da coleta do sangue.

#### 4.4. Coleta de amostras

Coletaram-se 5 mL de sangue da veia jugular que foram vertidos para tubos de ensaio, os quais foram identificados e colocados em repouso em superfície inclinada para ocorrer a retração do coágulo e posteriormente centrifugados por cinco minutos a uma rotação de 68.8 (g).

Após a centrifugação, o soro foi separado e colocado em flaconetes devidamente numerados com o mesmo número do vacuteiner, lacrados e conservados sob refrigeração em balões de nitrogênio líquido. As amostras criopreservadas foram transportadas para os LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública), que foi responsável pela conservação da amostra e deslocamento para o laboratório de referência. As amostras coletadas foram distribuídas em dois laboratórios de referência do Ministério da Saúde, evitando assim acarretar sobrecarga a um só laboratório. As amostras provenientes do Rio Grande do Sul e do Paraná foram processadas no Instituto Evandro Chagas/PA e as amostras de Santa Catarina no Instituto Adolfo Lutz/SP.

#### 4.5. Variáveis estudadas

A prevalência de anticorpos para *Flavivirus* determinada pela taxa de ocorrência de anticorpos dividida pelo número de animais sob risco.

Estabeleceram-se as seguintes faixas etárias: < de 1 ano, de 1 a < 5 anos, de 5 a < 10 anos e  $\geq$  10 anos. A idade do animal foi calculada no momento da coleta de sangue.

Foi catalogado o sexo, a utilidade do animal: trabalho, esporte, passeio e reprodução. Também consideradas as variáveis município de residência do animal e município de coleta de sangue do animal.

#### 4.6. Teste de inibição de hemaglutinação

O teste de inibição da hemaglutinação (IH) foi inicialmente empregado por CLARK & CASALS (1958) e adaptado para microplacas por SHOPE (1964) e com modificações descritas a seguir: 50  $\mu$ L do soro foram colocados em um tubo 13/100mm, onde acrescentaram-se 0,45 mL de cloreto de sódio a 0,85%; 6 mL de acetona a 100%. Após agitação os tubos foram incubados a 4°C por 5 min, centrifugado a 2.52 (g) por 1 min. O sobrenadante foi desprezado e 6 mL de acetona a 100% foram acrescentados e a placa foi incubada a 4°C por 1 hora, centrifugada a 37,8 (g) por 5 min, desprezada o sobrenadante. O tubo com o depósito foi colocado para secar em bomba de vácuo por 1 hora. Após esse tempo, foi hidratado com 0,5 mL de solução de borato salina pH 9,0, adicionados 0,6 mL de suspensão de hemácias de ganso em albumina bovina 0,4% em pH 9,0 (1:6), centrifugado a 37,8 (g) por 15 min e transferido o sobrenadante para um outro tubo 13/100mm de ensaio e desprezados o sedimento de hemácias.

Os soros depois de tratados foram diluídos de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280 em microplacas e submetidos à pesquisa de anticorpos anti*Flavivirus*: *Febre Amarela*, *Ilhéus*, *Encefalite Saint Louis* e *Rocio*.

Para a titulação, foram adicionados no 1º e no 2º orifício da microplaca 25  $\mu$ L do soro tratado; sendo acrescentados 25  $\mu$ L de albumina bovina 0,4% em pH 9,0 do

2º ao 10º orifício da microplaca; transferido 25 µL do 2º ao 10º orifício e adicionados 25 µL do antígeno diluído. A placa foi incubada a 4º C por 12 horas, adicionado 50 µL de hemácia de ganso em DGV (Dextrose, Gelatina, Veronal) 1:5 diluído em pH 6,0 a 7,0; posteriormente foi agitada e incubada por 30 min em estufa a 37ºC.

A leitura do teste foi feita observando-se a sedimentação das hemácias de ganso nos soros, considerando que os anticorpos específicos presentes no soro inibem a atividade hemaglutinante do vírus.

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados obtidos nas diferentes etapas do estudo foram avaliados pelo teste de qui-quadrado e variância de prevalência e processados no Epi-Info, com produção dos mapas no TABWIN (Tabulador de Informações de Saúde para ambiente Windows) versão 3.

## 5. RESULTADOS

No período de março de 2007 a dezembro de 2008, foi coletado sangue de 1.775 animais de 12 municípios dos três estados da Região Sul do Brasil, localizados na região de fronteira com a Argentina e em animais dos municípios de Maringá e Porto Alegre, conforme demonstrado na Figura 1.

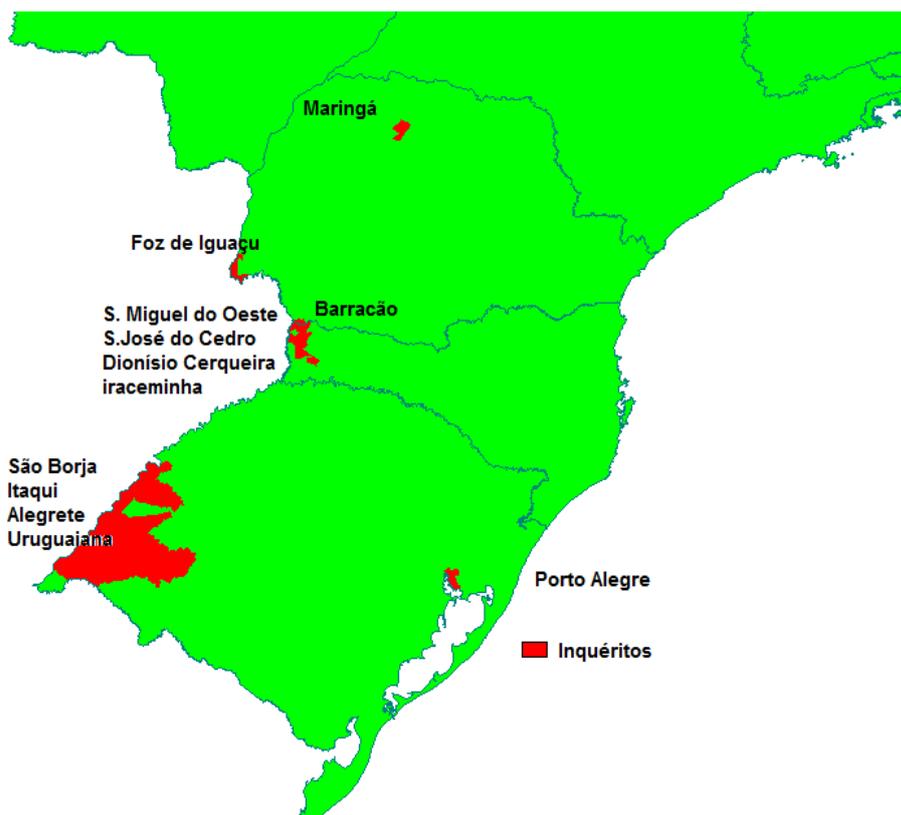


FIGURA 1 – Localização dos municípios onde foram realizados inquéritos sorológicos em equinos para detecção de anticorpos anti-*Flavivirus*, Região Sul, Brasil.

Em 2007 foi coletado sangue de 53,9% (957/1775) dos animais que participaram do estudo, provenientes do Rio Grande do Sul e Paraná e em 2008 em 46,1% (818/1775), sendo 639 do Rio Grande do Sul, 165 de Santa Catarina e 14 do Paraná (Tabela 2).

TABELA 2 – Números de animais que participaram do estudo, segundo UF, município e ano. Região Sul, 2007 e 2008

UF	Município	Ano	Número animais	Total UF	% Total UF
RS	Uruguaiana (fronteira)	2007	98	939	52,9
	São Borja (fronteira)	2007	84		
	Itaqui (fronteira)	2007	81		
	Alegrete (fronteira)	2007	37		
	Uruguaiana (fronteira)	2008	319		
	Porto Alegre (evento)	2008	320		
SC	São Miguel do Oeste (fronteira)	2008	34	165	9,3
	Guaraciaba (fronteira)	2008	33		
	Iraceminha (fronteira)	2008	21		
	Dionísio Cerqueira (fronteira)	2008	32		
	Guarujá do Sul (fronteira)	2008	24		
	São José do Cedro (fronteira)	2008	21		
PR	Barracão (fronteira)	2008	14	671	37,9
	Maringá (evento)	2007	283		
	Foz de Iguaçu (fronteira)	2007	374		
<b>Total</b>			<b>1775</b>	<b>1775</b>	<b>100,0</b>

Considerando o número de animais por UF, pode-se observar que 37,8% (671/1775) dos animais avaliados eram provenientes do Paraná, 52,9% (939/1775) do Rio Grande do Sul e somente 10,2% (165/1775) do estado de Santa Catarina. Quando observada a categoria dos animais, 66,1% (1117/1775) eram provenientes de municípios de fronteira e 33,9% (603/1775) de feiras agropecuárias (eventos), Tabela 2.

Dos 1775 animais que participaram do estudo, 14,3% (254/1775) foram reagentes para algum dos *Flavivirus*, diferindo de observação feita por RODRIGUES et al., (2010) quando da realização de estudo semelhante na região Amazônica encontrou 44,8% de animais reagentes, sugerindo uma ampla circulação dos vírus estudados nas duas regiões geográficas (Figura 2).

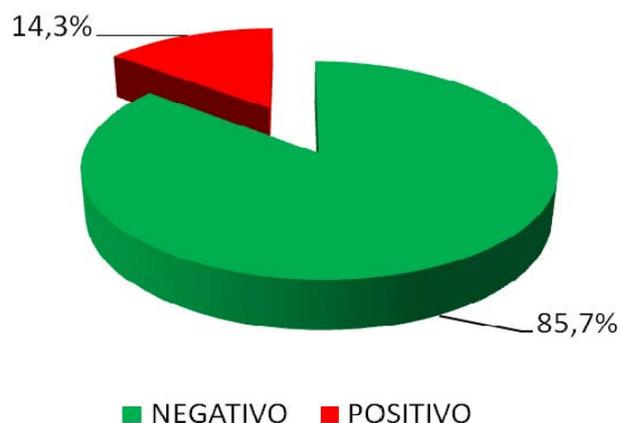


FIGURA 2 – Frequência de animais reagentes para *Flavivirus*, nos anos de 2007 a 2008, Região Sul, Brasil.

Quando considerado o número de animais testados pode-se observar que 254 foram reagentes para um ou mais tipos de *Flavivirus*, sendo que 28,3% (72/254) apresentaram anticorpos poliespecíficos, 57,4% (146/254) anticorpos monoespecíficos para Saint Louis, seguido de 31,4% (80/254) para Ilhéus, 11,0% (28/254) para Rocio e 4,7% (12/254) para Febre Amarela, conforme já descrito por RODRIGUES et al., (2010) (Figura 3). Apesar das altas taxas de anticorpos para os *Flavivirus* estudados, os equinos não desenvolvem viremia suficiente para infectar mosquitos (PFEFFER & DOBLER, 2010).

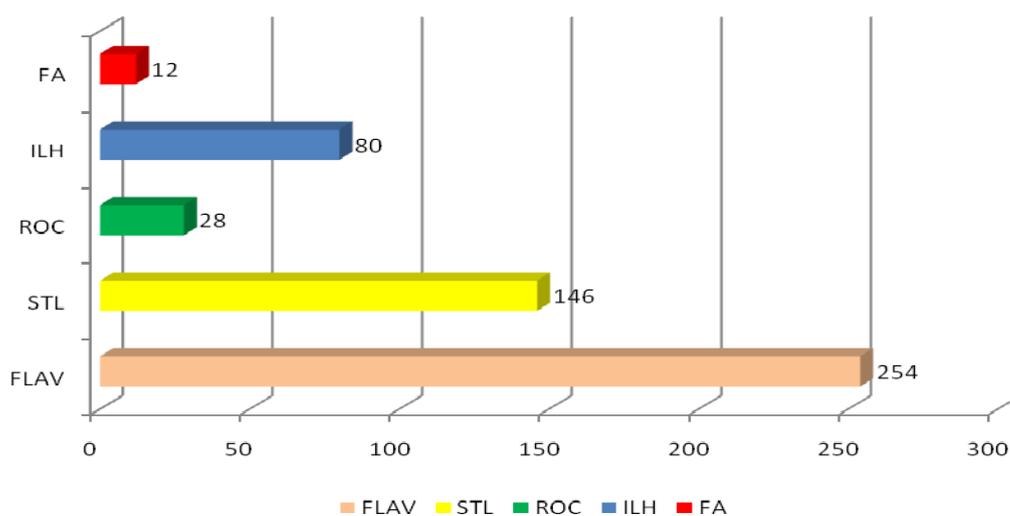


FIGURA 3 – Números de animais reagentes segundo o tipo de *Flavivirus*.

Dos 254 animais reagentes, 42,9% (109/254) foram reagentes para somente um *Flavivirus*, a considerar: *Saint Louis* 78,9% (86/109), *Ilhéus* com 17,4% (19/109) e *Rocio* 3,7% (4/109), sugerindo uma maior circulação do vírus *Saint Louis* na região do estudo, considerando a hipótese do clima relativamente similar ao dos países que possuem a circulação viral.

Considerando os resultados obtidos por ano de realização de inquérito, constatou-se que em 2007, 17,1% (164/957) dos animais foram reagentes para um ou mais tipos de *Flavivirus* e em 2008 este percentual foi somente de 11% (90/818), com média de 14,3% (254/1775) nos dois anos de estudo. Do total de animais reagentes verificou-se que 64,6% (164/254) foram reagentes no ano de 2007, enquanto que 35,4% (90/254) em 2008, indicando que no primeiro ano ocorreu uma maior reatividade dos animais que participaram dos inquéritos, sugerindo a necessidade de estudos mais aprofundados que possam determinar fatores para melhor inferir esta informação.

O *odds ratio*, ou chance de risco, observada para os *Flavivirus* no período de estudo foi de 1,67. Considerando o nível de confiança de 95% o *odds ratio* teve o limite entre  $1,25 < OR < 2,23$  dando a entender que a chance de uma amostra ser reagente ao teste foi maior em 2007, podendo a coleta em diferente época do ano ter acarretado esta diferença de amostras reagentes entre os anos estudados.

Dos 1775 animais que participaram do inquérito 1571 tiveram o sexo identificado nas resenhas, e destes 14,8% (232/1571) foram reagentes para um ou mais tipos de *Flavivirus*. Dentre os reagentes 55,6% (129/232) eram fêmeas. Do total, 774 machos que participaram do estudo 13,3% (103/774) foram reagentes e das 797 fêmeas 16,2% (129/797) foram reagentes para um ou mais *Flavivirus*, demonstrando que o sexo não é um fator de risco para o contato com os *Flavivirus* estudados. Na Figura 4 observa-se que o sexo também não é um fator de risco para nenhum dos *Flavivirus* monoespecíficos estudados, tendo em vista em que ambos foram reagentes.

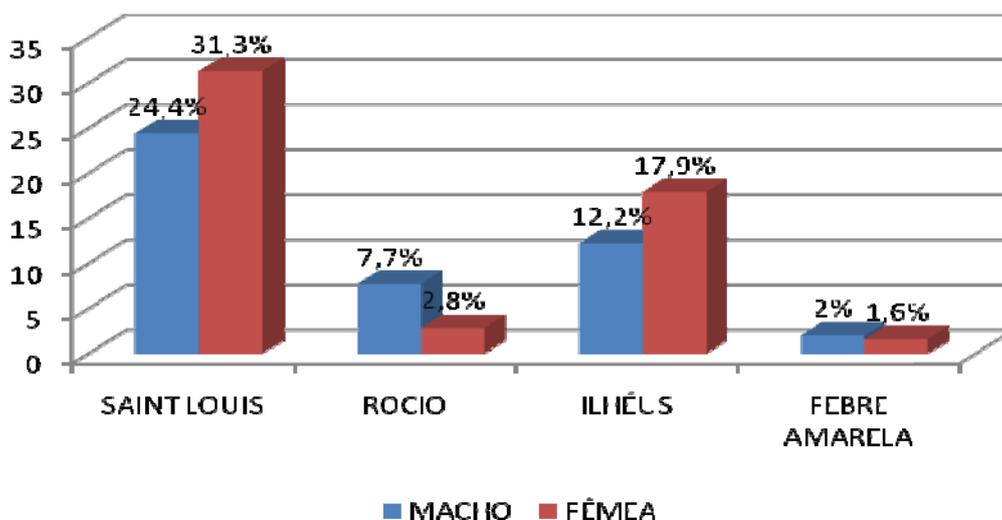


FIGURA 4 – Frequência de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e sexo.

Todos os animais reagentes para detecção de anticorpos poliespecíficos para *Flavivirus* ao teste de IH tinham idade acima de um ano. Dentre as faixas etárias estudadas, a de  $\geq 10$  anos foi reagente em 35,4% (73/206), seguido da de 1 a < 5 anos com 33,5% (69/206) e 5 a < 10 anos com 31,1% (64/206) (Tabela 3).

Considerando a reatividade em cada faixa etária para anticorpos poliespecíficos para *Flavivirus*, pode-se observar que na faixa etária de 1 a < 5 anos 8,1% (69/848) foram reagentes, na de 5 a < 10 anos 21,9% (64/292) e na de  $\geq 10$  anos 25,7% (73/284), sugerindo que quanto maior a idade, maior a chance de ser reagente ao teste (Tabela 3).

TABELA 3 – Frequência de animais reagentes segundo a faixa etária. Região Sul, anos 2007 e 2008.

IDADE	REAGENTE	% REAG* NA F. ETÁRIA**	% REAG* POR F. ETARIA**	TOTAL
< 1 ANO	0	0,0	0,0	41
1 A < 5 ANOS	69	8,1	33,5	848
5 A < 10 ANOS	64	21,9	31,1	292
$\geq 10$ ANOS	73	25,7	35,4	284
TOTAL	206	14,1	100,0	1465

\*Reagente

\*\* Faixa etária

Ao comparar os animais utilizados na prática do esporte com os de trabalho, reprodução e passeio, nota-se um percentual de positividade para *Flavivirus* de 11,7% (87/744) nesta utilidade. Entretanto dos 254 reagentes, 34,3% (87/254) eram utilizados na prática do esporte. Nestas condições, o *odds ratio*, ou chance de risco foi de OR= 0,48, determinado que a utilidade do animal não foi um fator de risco para a infecção pelos *Flavivirus* estudados.

Quando considerada somente a prática do trabalho, 14,8% dos animais (263/1775) que participaram do inquérito, 18,6% (49/263) foram reagentes no teste de IH para *Flavivirus*. Dos 254 animais reagentes que participaram do inquérito, 19,3% (49/254) eram utilizados para o trabalho. Nesse caso o *odds ratio* foi de OR=1,46, com o nível de confiança de 95% os seus limites variaram entre  $1,02 < OR < 2,09$ .

Do total de animais estudados, 9,4% (166/1775) eram utilizados para a prática do passeio e destes, 7,8% (13/166) foram reagentes para *Flavivirus* poliespecíficos. Todavia, a positividade dentre os animais de passeio quando comparados com as outras utilidades descritas no estudo, foi de 5,1% (13/254). Neste caso o *odds ratio* foi de OR=0,48, com o nível de confiança de 95% os seus limites variaram entre  $0,26 < OR < 0,89$ , determinando que o animal ser utilizado para a prática do passeio não constitui um fator de risco para se ter o contato com um dos *Flavivirus* estudados.

Os dados relativos aos animais de reprodução mostraram que dos 118, 16,9% (20/118) foram reagentes ao teste de IH para *Flavivirus* poliespecíficos e que dentre todos os reagentes, 7,9% (20/254) eram utilizados para reprodução. Entretanto, o *odds ratio* foi de 1.24 com o nível de confiança de 95% os seus limites variaram entre  $0.72 < OR < 2.11$ , indicando que os animais que tinham esta utilidade tiveram maior risco de se infectar por um dos *Flavivirus* estudados. Estudos mais aprofundados são necessários para melhor evidenciar a ligação entre animais de reprodução e o risco de se infectar pelos arbovírus citados, no entanto a hipótese de o feromônio da fêmea, e a proximidade no qual são criados estes animais são pontos a serem analisados, por serem fatores estritamente ligados ao vetor.

Considerando que o percentual de animais reagentes para *Flavivirus* poliespecíficos no Paraná foi de 16,3% (107/657, no Rio Grande do Sul de 15,1% (142/939) e Santa Catarina 2,8% (5/179), observou-se uma variação entre os percentuais encontrados nos três estados, corroborando o que RODRIGUES et al., (2010) observou em estudo semelhante realizado na região Norte do País, onde o autor descreve uma freqüência de 44,8% para os vírus supracitados.

O *odds ratio* nestes estados variou de 1,29 no Paraná, 1,15 no Rio Grande do Sul e 0,16 em Santa Catarina (Tabela 4), sugerindo que os animais do Rio Grande do Sul e Paraná estavam sobre o risco de se infectar, enquanto que estes animais ser de Santa Catarina não apresentou um fator de risco para o contato com os *Flavivirus* estudados, podendo justificar devido ao número de amostras ter sido menor, época divergentes com os demais estado ou até espécie de artrópode existente na região.

TABELA 4 – Número de animais e percentuais de reagente e não reagentes e *odds ratio*, segundo a UF. Região Sul, 2007 e 2008.

UF	Nº DE ANIMAIS REAG*	% DE REAG*	Nº DE ANIMAIS NÃO REG*	% DE NEG*	ODDS RATIO**
PR	107	16,3	550	83,7	1.29
SC	5	2,8	174	97,2	0.16
RS	142	15,1	797	84,9	1.15
TOTAL	254	14,3	1521	85,7	

\*Reagente

\*\* Chance de risco

Considerando o ano de realização do inquérito e percentual de positividade segundo o tipo de anticorpo específico, pode-se observar que a resposta sorológica para anticorpos anti-Saint Louis teve um percentual de positividade em 2007 de 77,4% (113/146), enquanto que em 2008 foi de somente 22,6% (33/146), fato já observado por MONATH et al. (1985) e SABATTINI et al. (1965) na Argentina.

Com relação aos vírus Rocio, IVERSSON et al., (1984) e (1989) relata a presença de equinos reagentes em locais de ocorrência de epidemias em humanos,

corroborando com os resultados sorológicos encontrados neste estudo que foram de 64,3% (18/28) em 2007, e 35,7% (10/28) em 2008, de animais reagentes para este vírus. Anticorpos para o vírus Ilhéus obtiveram resultados semelhantes, sendo em 2007 e 2008 respectivamente com 63,8% (51/80) e 36,3% (29/80) nestes anos (Tabela 5), confirmando observação realizada por IVERSSON et al., (1993) no Pantanal.

TABELA 05 – Frequência de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e ano. Região Sul, 2007 e 2008.

ANO	SAINT LOUIS		ROCIO		ILHÉUS		FEBRE AMARELA		TOTAL	
	POS	%	POS	%	POS	%	POS	%	POS	%
2007	113	77,4	18	64,3	51	63,8	4	33,3	186	69,9
2008	33	22,6	10	35,7	29	36,3	8	66,7	80	30,1
TOTAL	146	100,0	28	100,0	80	100,0	12	100,0	266	100,0

Do total de animais reagentes, 66,5% (169/254) apresentaram a sua utilidade definida a partir do inquérito. Destes, 42% dos animais (71/169) apresentaram resultado sorológico reagente para um *Flavivirus* específico (Tabela 6).

Dos 99 animais em que foram detectados anticorpos para Saint Louis 57,6% (57/99) conforme MONATH et al. 1985 onde relata a ocorrência de casos do de Saint Louis na Argentina, eram utilizados para a prática do esporte, enquanto que 26,3% (26/99) para o trabalho, 9,1% (9/99) para reprodução e 7,1% (7/99) para passeio. Com relação aos 66 animais em que foram detectados anticorpos contra o vírus Ilhéus, 50% (31/66) eram utilizados para o esporte seguido de 32,3% (20/66) para o trabalho, 11,3% (7/66) para reprodução e 6,5% (4/66) passeio (Tabela 6).

TABELA 6 – Percentuais de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e utilidade. Região Sul, 2007 e 2008.

Utilidade	Saint Louis		Rocio		Ilhéus		Febre Amarela	
		%		%		%		%
<b>Trabalho</b>	26	26,3	4	26,7	20	32,3	2	50,0
<b>Esporte</b>	57	57,6	7	46,7	31	50,0	2	50,0
<b>Passeio</b>	7	7,1	2	13,3	4	6,5	0	0,0
<b>Reprodução</b>	9	9,1	2	13,3	7	11,3	0	0,0
<b>TOTAL</b>	99	100,0	15	100,0	62	100,0	4	100,0

Dos 122 animais em que foram detectados anticorpos para Saint Louis 36,9% (45/122) tinham a idade entre 1 a < 5 anos, enquanto que 35,2% (43/122) eram ≥ de 10 anos e 27,9% (34/122) entre 5 a < 10 anos. Com relação aos 65 animais reagentes ao teste para detecção de anticorpos contra o vírus Ilhéus, 36,9% (24/65) tinham a idade entre 1 a < 5 anos, enquanto que 33,8 (22/65) eram ≥ 10 de anos e 29,2% (19/65) entre 5 a < 10 anos, sugerindo não haver relação entre a idade do animal e o tipo de vírus estudado (Tabela 7).

TABELA 07 – Frequência de animais reagentes, segundo o tipo de vírus e faixa etária. Região Sul, 2007 e 2008.

Faixa Etária	Saint Louis		Rocio		Ilhéus		Febre Amarela	
		%		%		%		%
< 1 ANO	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1 A < 5 ANOS	45	36,9	9	40,9	24	36,9	1	25,0
5 A < 10 ANOS	34	27,9	4	18,2	19	29,2	0	0,0
≥ 10 ANOS	43	35,2	9	40,9	22	33,8	3	75,0
<b>TOTAL</b>	122	100,0	22	100,0	65	100,0	4	100,0

Considerando a titulação obtida a partir dos testes realizados, pode-se observar que para anticorpos de *Flavivirus* poliespecíficos a titulação de 1:160 foi

observada em 33,3% (24/72) dos animais reagentes para estes vírus, seguido da titulação 1:320 e 1:80 com 27,8% (20/72) cada uma. Ao se analisar os resultados obtidos a partir da detecção de anticorpos para Saint Louis, a titulação de 1:80 foi a que teve maior representatividade com 42,5% (62/146), seguida da 1:160 com 25,3% (37/146) (Tabela 8).

TABELA 08 – Números de animais reagentes e percentual segundo o tipo de *Flavivirus* e a titulação.

TITULAÇÃO	FLAV*		STL**		ROC***		ILH****		FA*****		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1:20	0	0,0	0	0,0	9	32,1	27	33,8	3	25,0	39	11,5
1:40	0	0,0	19	13,0	10	35,7	19	23,8	5	41,7	53	15,7
1:80	20	27,8	62	42,5	4	14,3	22	27,5	3	25,0	111	32,8
1:120	0	0,0	18	12,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	18	5,3
1:160	24	33,3	37	25,3	3	10,7	11	13,8	1	8,3	76	22,5
1:320	20	27,8	7	4,8	2	7,1	1	1,3	0	0,0	30	8,9
1:640	6	8,3	1	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	7	2,1
1:1280	2	2,8	2	1,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	1,2
TOTAL	72	100,0	146	100,0	28	100,0	80	100,0	12	100,0	338	100,0

\*Flavivirus  
 \*\* Saint Louis  
 \*\*\* Rocio  
 \*\*\*\*Ilhéus  
 \*\*\*\*\*Febre Amarela

Os animais reagentes apresentaram titulação variando entre 1:20 a 1:160, quando considerados os resultados obtidos a partir do diagnóstico laboratorial para detecção de anticorpos dos vírus Ilhéus, Rocio e Febre Amarela. Entretanto ocorreu variação entre a titulação considerada no teste, quando observado os quatro vírus observados, sugerindo não haver relação entre a titulação de anticorpos e o tipo de vírus estudados (Tabela 8).

## 6. CONCLUSÃO

As frequências obtidas segundo a Unidade Federada apontou que o maior risco de se infectar pelos *Flavivirus* estudados foi observado no Paraná seguido do Rio Grande do Sul.

O estudo demonstrou não haver preferência dos vírus entre o sexo dos animais. A faixa etária demonstrou ser um fator de risco para o contato com os *Flavivirus*. Nenhum animal menor de um ano foi reagente ao teste, sugerindo que não ocorreu circulação dos vírus estudados no último ano.

Considerando a variável utilidade do animal, o trabalho apresentou um *Odds ratio* > 1 sugerindo que existe uma relação entre esta utilidade e o risco de se infectar por um *Flavivirus*.

Este estudo confirma a ampla distribuição de Saint Louis e Ilhéus bem como a aparente ausência de doenças em equinos infectados pelos vírus estudados.

Na maioria dos casos de arboviroses emergentes, as formas de introdução permanecem obscuras. Pesquisas futuras devem ter por objetivo explorar as circunstâncias destes eventos. Um melhor entendimento de como eles se desloca e como se estabeleceram em outras áreas geográficas será de grande utilidade para o ser humano e saúde pública veterinária, pois pode ajudar a prevenir surtos devastadores causados por estes arbovírus em seres humanos e animais.

A implementação da vigilância veterinária sentinela é de suma importância, tendo em vista estes arbovírus não causarem doença clínica em equinos, vindo a fortalecer a teoria da necessidade de utilização desta espécie na prevenção e controle de doenças em humanos.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y Doenças Transmisíveis Comunes al Hombre y a los Animales. Organización Panamericana de Salud. Tercera Edición. Vol.II. clamidiosis, rickettsiosis y virosis. p. 175-186. Publicación Científica y Técnica N° 580. OPS. 2003. Washington, DC, EUA.
2. ACKERMANN , H.; BERTHEAUME, L. Atlas of virus diagrams. Florida: CRC Press; p. 199. 1995.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela. 1999. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/noticias.php>. Acessado em 14.02.2010.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos. 2004. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/profissionais.php>. Acessado em 13.02.2010.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2007 e 2008. 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/noticias.php>. Acessado em 13.02.2010.
6. CASALI, C.G.; PEREIRA, M.R.R.; SANTOS, L.M.J.G.; PASSOS, M.N.P.; FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O.; ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2004; 37(4): 296-299.
7. CASALS, J. New developments in the classification of arthropod-borne viruses. *Ann Microbiol*. 1963; n.11, p.1-34.
8. CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Saint Louis Encephalitis. Department of Health an Human Service. 2007. [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/sle/Sle\\_FactSheet.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/sle/Sle_FactSheet.html). Acessado em 13.02.2010.

9. CLARKE, D.H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutinationinhibition. with arthropod-borne viruses. 1958. ***America Jornal Tropical Medicine and Hygiene***. n.7. p-561-573
- 10.FARHAT, C. K.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M.. Arboviroses. ***Infectologia Pediátrica***. Ed Atheneu. 3 ed., p -533-551. Sao Paulo. 2007
- 11.FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. Virus Taxonomy: The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier/Academic Press; 2005; p. 1259.
- 12.FERREIRA, I.B.; PEREIRA, L.E.; ROCCO, I.M.; MARTI, A.T.; SOUZA, L.T.M.; IVERSSON, L.B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil: Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. ***Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo***. 1994; v.36; n.3; p.265-274.
- 13.FIGUEIREDO, L.T.M. Arboviroses emergentes no Brasil. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***. 2007; v.40; c.2; p.- 224-229.
- 14.FLORES, E.F. Virologia Veterinária. Ed. UFSM. Universidade Federal de Santa Maria, 2007. p. 568 – 570.
- 15.HERVÉ, J.P.; DEGALIER, N.; ROSA, A.P.A.T.; PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G.C. Aspectos Ecológicos *In*: Instituto Evandro Chagas 50 anos de Contribuição Biológica a Medicina Tropical. Fundação Serviços de Saúde Pública. Belém; v.1; p. 409 – 438, 1986.
- 16.IVERSSON, L.B.; COIMBRA, T.L.M. Encefalite na região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, no período pós-epidêmico de 1978 a 1983: Situação do diagnóstico etiológico e características epidemiológicas. ***Revista Saúde Publica***. 1984; v.18; c.4; p.- 323-332.
- 17.IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; ROSA, M.D.B. Ocorrência recente de infecção humana por arbovírus Rocio na região do Vale do Ribeira. ***Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo***. 1989; v.31; n.1; p. 28-31.
- 18.IVERSON, L.B.; SILVA, R.A.M.S; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A; BARROS, V.L.R.S. Circulation of eastern equine encefalitis, western equine encephalitis, ilhéus, maguari and tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. ***Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo***; v.35; n.4; p.355-359; julho-agosto 1993.

- 19.KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3 ed. San Antonio: **American Society of Tropical Medicine & Hygiene**, 1985. p. 1141.
- 20.LAEMMERT, H.W.; HUGHES, T.P. The virus of Ilhéus encephalitis. **Journal Immunology**. 1947; v.55; p.- 61-67.
- 21.LEÃO, R. N. Q. Arboviroses. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Ed CEJUP. Universidade do Estado do Pará. Instituto Evandro Chagas.1997. p.207-225.
- 22.LOPES, O.S.; SACCHETTA, L.A.; FRANCO, D.B.; JAKOB, W.L.; CALISHER, C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation of *Rocio virus* from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. 1981; v.113; c.2; p.-122-125.
- 23.MARCONDES, C. B. Doenças Transmitidas e Causadas por Artrópodes. Ed. Atheneu. São Paulo, p.:557. 2009.
- 24.MONATH, T.P.; HEINZ, F.X. *Flaviviruses*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Virology. Philadelphia: Lippicott-Raven Publishers; 1996. p 961-1034.
- 25.MONATH, T.P.; SABATTINI, M.S.; PAULI, R.; DAFNER, J.F.; MITCHELL, C.J.; BOWEN, G.S.; CROPP, B. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 1985; v.34; c.5; p.- 966-975.
- 26.MONDINI, A.; CARDEAL, I.L.; LÁZARO, E.; NUNES, S.H.; MOREIRA, C.C.; RAHAL, P.; MAIA, I.L.; FRANCO, C.; GÓNGORA, D.V.; GÓNGORA-RUBIO, F.; CABRERA, E.M.; FIGUEIREDO, L.T.; FONSECA, F.G.; BRONZONI, R.V.; CHIARAVALLI-NETO, F.; NOGUEIRA, M.L. *Saint Louis encephalitis virus*, Brazil. **Emergence Infective Disease**. 2007; v.13; c.1; p.- 176-178.
- 27.NASSAR, E.S.; COIMBRA, T.L.M.; ROCCO, I.M.; PEREIRA, L.E.; FERREIRA, I.B.; SOUZA, L.T.M.; SOUZA, D.M.; UEDA-ITO, M.; BERGO, R.C.F. Human disease caused by an arbovirus closely related to *Ilheus virus*: Report of five cases. *Intervirology*. 1997; v.40; p. 247-252.
- 28.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Virosis transmitidas por artrópodos y roedores. Informes técnicos. 1985; n. 719, p.126.
- 29.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). The yellow fever situation in Africa and South America in 2004. *Weekly Epidemiological Record*. 2005 (b); v.80; c.29; p.- 249-256.

30. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Epidemiological trends and current situation of yellow fever. Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). 2005 (a). Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/surveillance/en/index.html>. Acessado em 21.02.2010.
31. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Yellow fever overview. Regional Office for Africa. 2007. Disponível em: <http://www.afro.who.int/yellowfever>. Acessado em 21.02.2010.
32. PEREIRA, L.E.; SUZUKI, A.; COIMBRA, T.L.M.; SOUZA, R.P.; CHAMELET, E.L.B. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). **Revista Saúde Pública**. 2001; v.35; c.2, p.- 119-123.
33. PFEFFER, M.; DOBLER, G. REmergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration, *Parasites & Vectors* 2010, v.3; n.35 p.1-5 <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/35>.
34. PINHEIRO, P.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In : VERONESI, R. Tratado de Infectologia. São Paulo:Ed. Atheneu, 1996; v 1; c. 9; p. 169-179.
35. ROCCO, I.M.; SANTOS, C.L.S; BISORDI, I.; PETRELLA, S.M.C.N; PEREIRA, L.E.; SOUZA, R.P.; COIMBRA, T.L.M.; BESSA, T.A.F.; OSHIRO, F.M.; LIMA, L.B.Q.; CERRONI, M.P.; MARTI, A.T.; BARBOSA, V.M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. *St. Louis encephalitis virus*: First isolation from a human in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2005; 47(5): 281-285.
36. RODRIGUES, S.G; OLIVA, O.P; ARAÚJO, F.A.A; MARTINS, L.C; CHIANG, J.O; HENRIQUES, D.F; SILVA, L.V.P; RODRIGUES, D.S.G; PRAZERES, A.S.C; TAVARES-NETO, J; VASCONCELOS, P.F.C. 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-Amaz Saude* v.1 n.1 Belém mar. 2010. [http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S217662232010000100012&lng=pt&nrm=isso](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232010000100012&lng=pt&nrm=isso) Acessado em 27.05.2010

- 37.SABATTINI, M.S.; SHOPE, R.E.; VANELLA. J.M; Serological Survey for Arboviruses in Córdoba Province, Argentina. ***American Journal Tropical Medicine y. Hygiene.***,v.6, n.14, 1965, p.1073-1078.
- 38.SÃO PAULO. Investigação de casos de Encefalite Viral de Saint Louis, notificados no município de São José do Rio Preto/SP.2006. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Nota Técnica 2, 8 p. 2006. [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/pdf/nt2\\_encefa.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/pdf/nt2_encefa.pdf) - Acessado em 13.02.2010
- 39.SCHATZMAYR, H.C.; BARTH, O.M. Características gerais dos vírus patogênicos para o homem. In: Coura JC. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. v 2. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005; p. 1645-1660.
- 40.SHOPE, R.E.; CAUSEY, O.R.; ANDRADE, A.H.P.; THEILER, M. The Venezuelan Equine Encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13(5): 723-727. In: Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. p 191-202.
- 41.SPINSANTI L, BASQUIERA AL, BULACIO S, SOMALE V, KIM SCH, RÉ V, RABBAT D, ZÁRATE A, ZLOCOWSKI JC, QUIROGAMAYOR C, CONTIGIANI M, PALACIO S. St. Louis Encephalitis in Argentina: the first case reported in the last seventeen years. ***Emergence Infective Disiese.*** 2003; v.9; c.2; p. 271-273.
- 42.SPINSANTI, L.I.; DÍAZ, L.A.; GLATSTEIN, N.; ARSELÁN, S.; MORALES, M.A.; FARÍAS, A.A.; FABBRI, C.; AGUILAR, J.J.; RÉ, V.; FRÍAS, M.; ALMIRÓN, W.R.; HUNSPERGER, E.; SIIRIN, M.; DA ROSA, A.T.; TESH, R.B.; ENRÍA, D.; CONTIGIANI, M. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. ***Journal Clinica Virology.*** 2008; v.42; c.1; p.27-33.

43. TIRIBA, A.C.; MIZIARA, A.M.; LOURENÇO, R.; COSTA, C.R.B.; COSTA, C.S.; PINTO, G.H. Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do Estado de São Paulo. **Revista Associação Médica Brasileira**. 1976; v. 22; p.- 415-420.
44. TSAI, T.F.; CANFIELD, M.A.; REED, C.M.; FLANNERY, V.L.; SULLIVAN, K.H.; REEVE, G.R.; BAILEY, R.E.; POLAND, J.D. Epidemiological aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Harris County, Texas, 1986. **Journal Infective Disease**. 1988; v.157; c.2; p. 351-356.
45. VARMA, M.G.R. Japanese Encephalitis (JE) (Japanese B encephalitis, Russian autumnal encephalitis, summer encephalitis). Organização Mundial da Saúde (OMS). Vector biology and control division. Geographic distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors; 1989 . p 39-42.
46. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G.C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1991; v. 33; n.6; p. 465-476.
47. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE R.E.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; RODRIGUES, S.G.; DEGALIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses pathogenic for man in Brasil. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. p 72-99.
48. VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, A.P.; RODRIGUES, S.G.; ROSA, E.S.; MONTEIRO, H.A.; CRUZ, A.C.; BARROS, V.L.; SOUZA, M.R.; ROSA, J.F. Yellow fever in Pará State, Amazon region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and epidemiologic findings. **Emergence Infective Disease**. 2001; v.7; (3 Supl), p.- 565-569.

# ANEXO 1

COVEV/CGDT/DEVEP/SVS  
Ministério da Saúde  
07/03/2007

## Inquérito Sorológico Equino

Nº

Local	1	Proprietário	2	Município	3	UF
	4	Endereço				
	5	Distrito/ Bairro	6	(DDD) Telefone		
	7	Local de guarda do animal. Se diferente do endereço do proprietário, Endereço e Bairro:				
Dados do animal	7	Fazenda	8	Nº de animais na propriedade		
	9	Nome do animal				
	10	Utilidade do animal Trabalho <input type="checkbox"/> Passeio <input type="checkbox"/> Esporte <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Especificar: _____				
	11	Espécie Equina <input type="checkbox"/> Muar <input type="checkbox"/> Asinino <input type="checkbox"/>		12	Sexo 1-Macho 2-Fêmea <input type="checkbox"/>	
	13	Pelagem <input type="checkbox"/> 1-Castanha clara                      6-Tordilha                      11-Branco 2-Castanha escura                  7-Pampa de marrom          12-Palomina 3-Castanha marrom                  8-Pampa de preto              13-Rosilho 4-Alazã vermelha                    9-Baio                              14-Outra. Especificar 5-Alazã fígado                        10-Preto				
	14	Idade. Se souber, especificar: _____ < 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses a 1 ano <input type="checkbox"/> 1 a 2 anos <input type="checkbox"/> 2 a 5 anos <input type="checkbox"/> 5 a 10 anos <input type="checkbox"/> > 10 anos <input type="checkbox"/>				
	15	Outros sinais				
	16	Resenha				
	Dados epidemiológicos	17	Animal vacinado contra encefalite equina <input type="checkbox"/>		18	Se vacinado, qual data
1-Sim 2-Não 3-Não sabe		Se vacinado, informar fabricante e lote				
20		Viagem para exterior <input type="checkbox"/>		21	Se viajou, qual data	
1-Sim 2-Não 3-Não sabe		Se viajou para exterior, qual local				
20		Local de coleta do sangue				
1-fazenda 2-Festa agropecuária 3-Hípica 4-Cavalaria 5-CCZ 6-Outro. Especificar: _____						
Observação	Observações:					
Resp.	18	Nome do responsável		19	Data	
				20		Assinatura do responsável