

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

**INQUÉRITOS SOROLÓGICOS EM EQUÍDEOS E AVES
SILVESTRES PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS *ANTI-
ARBOVÍRUS* DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA NO
BRASIL**

Francisco Anilton Alves Araújo
Orientadora: Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA
2011

FRANCISCO ANILTON ALVES ARAÚJO

**INQUÉRITOS SOROLÓGICOS EM EQUÍDEOS E AVES
SILVESTRES PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS *ANTI-
ARBOVÍRUS* DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA NO
BRASIL**

Tese apresentada para obtenção de
grau de Doutor em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade – UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares - UFG

Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme – UFG

GOIÂNIA
2011

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

Araújo, Francisco Anilton Alves.
A663i Inquéritos sorológicos em equídeos e aves silvestres para
detecção de anticorpos *anti-arbovírus* de importância em
saúde pública no Brasil [manuscrito] / Francisco Anilton
Alves Araújo. - 2011.

149 f. : figs., tabs.


Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.
Bibliografia.

1. Arboviroses – Goiás (Estado) 2. Equídeos. I. Título.

CDU: 619:616.34-008.314.4

FRANCISCO ANILTON ALVES ARAÚJO

Tese defendida e aprovada em **06/12/2011** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:




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



Dra. Sabrina Castilho Duarte



Dr. Marcos Takashi Obara - Ministério da Saúde



Dr. Leonardo Aparecido G. Tomaz - AGRODEFESA/GO (memoria)



Prof. Dr. Jurij Sobestiansky

AGRADECIMENTOS

As minhas amigas e orientadoras Maria Auxiliadora Andrade e Valéria de Sá Jayme, pela atenção e presteza durante todo o curso.

Ao meu amigo e colega de doutorado Alessandro Romano, pela presença constante e colaboração na confecção deste feito.

As amigas de luta Mariana Pelissari e Silvana Leal pela determinação em me ver atingir este feito.

Aos amigos de trabalho, Daniel Ramos e Daniele Pelissari pelas sugestões e correção da tese, e em especial a Daniele pela inesquecível ajuda em um momento crucial.

Aos meus antigos estagiários e hoje colegas Arthur L. Santos e Pedro Passos e aos atuais estagiários Arthur Nery e Tatiane Souza que me suportaram e em muito me ajudaram na confecção das planilhas e da tese;

Aos Coordenadores de Zoonoses das Secretarias de Saúde dos Estados, aos colegas dos Órgãos de Defesa Sanitária Animal, dos CCZs e das Secretarias de Saúde dos Municípios onde foram realizados os inquéritos sorológicos pela ajuda e presteza no repasse das informações.

Ao Instituto Evandro Chagas, Instituto Adolfo Lutz, Instituto Pasteur e Instituto Biológico de São Paulo que foram responsáveis pelo processamento das amostras.

Ao Pedro Vasconcelos, Sueli Rodrigues, Livia Caricio, Elenice Cunha, Luiz Roberto e os colegas dos laboratórios a quem não citei nominalmente, mas que jamais serão esquecidos.

Aos que foram citados na referência bibliográfica e que são meus amigos pessoais, pela contribuição literária.

Aos amigos e companheiros Ricardo Vianna, Késio de Paula, Geovani San Miguel entre outros pela ajuda e apoio durante todos os trabalhos de campo para coleta de amostras.

Ao meu especial companheiro e ornitólogo Pedro Lima com quem muito aprendi sobre a ecologia das aves e muito me ajudou nos inquéritos com aves que fiz nestes anos de trabalho.

À banca examinadora, pelas sugestões e contribuições para melhoria da qualidade do trabalho.

E por fim, um agradecimento especial àqueles que aqui não citei e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

RESUMO

Este estudo determinou a prevalência de anticorpos inibidores de hemaglutinação para alfavírus em equídeos durante uma epizootia pelo vírus da Encefalite Equina do Leste na Paraíba, em 2009 e comparou os resultados obtidos entre as técnicas de inibição de hemaglutinação e teste de soroneutralização em microplacas. Analisou os resultados obtidos para arbovírus em 15 inquéritos sorológicos realizados em equídeos no Brasil, entre 2007 a 2009 e analisou os resultados para os arbovírus encontrados em dois inquéritos sorológicos realizados em aves silvestres no Pará, entre 2007 a 2008. Na Paraíba, foi realizada coleta de sangue de 188 equídeos, nos outros inquéritos de 4.402 animais e de 544 aves silvestres. O material foi testado pela técnica de inibição de hemaglutinação, soroneutralização em microplacas e foi feita tentativa de isolamento viral. Na Paraíba, obteve-se uma prevalência real de 62,2% para Encefalite Equina do Leste e o teste de inibição por hemaglutinação apresentou uma sensibilidade de 79,5% e especificidade de 87,3%. No Brasil, a prevalência observada foi de 33,3% para os arbovírus, sendo 20,6% para os flavivírus, 14,1% para os alfavírus e 10,1% para bunyavírus. Nas aves, a positividade foi de 28,4%, sendo 14,7% para os alfavírus, 9,5% para os flavivírus e 7,4% para os bunyavírus. Observou-se uma elevada circulação de anticorpos do vírus da Encefalite Equina do Leste em animais portadores inaparentes e que o teste de inibição por hemaglutinação pode ser recomendado como de triagem. Os outros arbovírus pesquisados foram encontrados em animais dos nove estados, havendo diferença na prevalência a partir da motivação do inquérito. As aves migratórias demonstraram ser importantes amplificadores desses agentes.

PALAVRAS-CHAVE: arboviroses, encefalomielite, meningites, prevalência, soroneutralização

ABSTRACT

This study determined the prevalence of hemagglutination-inhibition antibodies against alphaviruses in horses during an epizootic event by Eastern Equine Encephalitis virus in the state of Paraíba, Brazil, in 2009 and compared the results between the techniques of hemagglutination inhibition and serum neutralization test in microplates. The results of 15 arboviruses obtained from serological surveys on horses in Brazil from 2007 to , as well as the results for the arboviruses found in two serological surveys on wild birds in the state of Paraíba, between 2007 and 2008 2009 were analyzed. In Paraíba, blood was collected from 188 horses during other surveys of 4.402 animals and 544 wild birds. The material was tested by the hemagglutination inhibition technique, neutralization was performed in microplates aiming at virus isolation. In Paraíba, we obtained a true prevalence of 62.2% for Eastern Equine Encephalitis and hemagglutination inhibition test had 79.5% sensitivity and 87.3% specificity . In Brazil, the prevalence rate was 33.3% for arboviruses, 20.6% for flaviviruses, 14.1% for alphavirus and 10.1% for bunyavirus. In birds, the positivity was 28.4%, being 14.7% for alphaviruses, 9.5% for flaviviruses and 7.4% for bunyavirus. There was a high circulation of antibodies against Eastern Equine Encephalitis in inapparent-host animals and the hemagglutination inhibition test can be recommended as screening method. The other arboviruses surveyed were found in animals of the nine states with a significant difference in the prevalence from the motivation of the survey. Migratory birds have proved to be important amplifiers of these agents .

KEYWORDS: arbovirose, surveys, serum neutralization, meningitis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	2
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Fontes de infecção e principais vetores.....	5
2.2 A importância dos equídeos e aves silvestres na disseminação das arboviroses de importância em saúde pública.....	6
2.3 Principais arbovírus de importância em saúde pública.....	8
2.3.1 Família <i>Togaviridae</i>	8
2.3.2 Família <i>Flaviviridae</i>	17
2.3.3 Família <i>Bunyaviridae</i>	26
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2.....	46
SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-ALFAVÍRUS EM EQUÍDEOS EM UM SURTO DE ENCEFALITE EQUINA, PARAÍBA, 2009	46
RESUMO	46
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
Área de Estudo.....	50
Instrumentos utilizados.....	51
Características dos animais.....	52
Coleta de material	52
Teste de Inibição de Hemaglutinação	53

Teste de soroneutralização em microplacas	54
Variáveis estudadas	55
Análise Estatística	55
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 3.....	71
SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS “ANTI-ARBOVÍRUS” DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM EQUÍDEOS, NO BRASIL – 2007 A 2009. 71	
RESUMO.....	71
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	75
Área de Estudo.....	75
Instrumentos utilizados.....	78
Características dos animais.....	78
Coleta de material	78
Teste de Inibição de Hemaglutinação	79
Variáveis estudadas	80
Tamanho da Amostra	81
Análise estatística.....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS	109

CAPÍTULO 4.....	114
SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS “ANTI-ARBOVÍRUS” DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM AVES SILVESTRES, EM SALINÓPOLIS/PARÁ, BRASIL – 2007 E 2008.	114
RESUMO.....	114
1 INTRODUÇÃO.....	116
2 MATERIAL E MÉTODOS	118
Área de estudo	118
Instrumentos utilizados.....	119
Características dos animais.....	119
Coleta de material	119
Isolamento de vírus	120
Teste de Inibição de Hemaglutinação	121
Variáveis estudadas	121
Análise Estatística	122
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
4 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS	132
CAPÍTULO 5.....	137
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	137
Anexo 1 – Ficha de notificação de epizootia	141
Anexo 2 – Ficha de investigação de epizootia.....	142
Anexo 3 - Resenha.....	145
Anexo 4 – Planilha de aves	146

LISTA DE ABREVIATURAS

BLMV – Vírus Belém

BSQV – Vírus Bussuquara

CARV – Vírus Caraparu

CATV – Vírus Catú

CHIKV- Vírus Chykungunya

CPCV – Vírus Cacicaporé

DENV – Vírus da Dengue

ECV – Encefalite da Califórnia

EE – Encefalite Equina

EEE – Encefalite Equina do Leste

EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste

GETV – Vírus Getah

GUAV – Vírus Guaroa

IC – Intervalo de Confiança

ICOV – Vírus Icoaraci

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IGUA – Vírus Iguape

IH – Inibição de Hemaglutinação

ILHV – Vírus Ilhéus

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

MAGV – Vírus Maguari

MAYV – Vírus Mayaro

MUCV – Vírus Mucambo

ONNV – Vírus O'nyong-nyong

OROV – Vírus Oropouche

PIXV – Vírus Pixuna

POWV – Vírus Powassan

PRNT – Teste de Neutralização por Redução de Placas

RA – Risco Absoluto

RC – Reação Cruzada

RM – Reação Monotípica

ROCV – Vírus Rocio

RR – Risco Relativo

RRV – Vírus Ross River

RT-PCR – Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis

SLV – Vírus Saint Louis

SN – Soroneutralização

TCMV – Vírus Tacaiuma

UTIV – Vírus Utinga

VEE – Encefalite Equina Venezuelana

VEEV-Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

WEE – Encefalite Equina do Oeste

WEEV – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

WNV – Vírus da Febre do Nilo Ocidental

YF – Febre Amarela

YFV – Vírus da Febre Amarela

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O termo “*arthropod-borne virus*” foi instituído, em 1942, para definir um grupo de vírus que se difundem entre artrópodes e são transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados e para designar os vírus que são mantidos na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados (KIRCHNER, 1979; OMS, 1985; PAUVOLID-CORREA & VARELLA, 2008).

As alterações ambientais introduzidas pelo homem como o excessivo desmatamento, a exploração do subsolo, a construção de hidrelétricas, a colonização humana e a urbanização não planejada entre outras, têm sido associadas à emergência ou reemergência de arbovírus (GUBLER, 1998; KOTAIT et al., 2006; CRUZ et al., 2009).

As arboviroses emergentes são frequentemente de origem antropogênica e podem invadir novas regiões do mundo causando epidemias devido a mudanças na composição genética desses vírus ou nos reservatórios naturais, na composição da dinâmica da população de vetores ou ambientes (FIGUEIREDO, 2007; WEAVER & REISEN, 2010).

Muitas vezes, os surtos de arboviroses emergentes podem estar relacionados a alterações relativamente pequenas na genética viral ou devido à introdução de novas variedades desses vírus que têm aumentado os níveis de viremia nos vertebrados, ampliando sua gama de hospedeiros e a capacidade de amplificação nos reservatórios (CHOMEL et al., 2007; MORENS et al., 2008; GOLD & HIGGS, 2009).

Segundo CALISHER et al., (1982), CAUSEY & CAUSEY (2002) e FIGUEIREDO (2007), do total de arbovírus conhecidos, cerca de 40 causam febre, encefalites, artralgias, mialgias, exantemas ou febres hemorrágicas nas Américas. Alguns deles, como o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e o vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV) são

considerados importantes agentes etiológicos de doenças neuroinvasivas humanas e em equídeos, com exceção do SLEV que não causa doença nos equinos (CALISHER et al., 1990; BURKE & MONARTH, 2001; VASCONCELOS et al., 2001; CHADWICK, 2005; PFEFFER & DOBLER, 2010).

Alguns arbovírus têm caráter epidêmico, como o WNV que, desde 1999 na América do Norte, vem anualmente desencadeando surtos como o de 2003 nos Estados Unidos, quando foram confirmados 9.858 casos com 262 mortes humanas. Na Ásia, a incidência anual por encefalite japonesa é estimada entre 30.000 a 50.000 casos com uma mortalidade de 10.000 pessoas. Além disso, a dengue acomete mais de 50 milhões de pessoas no mundo a cada ano (BECKWITH et al., 2002; KUNO & CHANG, 2005; CHOMEL et al., 2007; MORENS et al., 2008; WEAVER & REISEN, 2010).

TRAVASSOS DA ROSA et al. (1997) e VASCONCELOS et al. (1998) relataram a existência de cerca de trinta e seis arbovírus isolados no Brasil e que têm sido incriminados como causadores de doença em humanos. Destes, cinco são importantes em termos de saúde pública, pois estão associados com epidemias: o vírus Dengue (DENV), Mayaro (MAYV), Oropouche (OROV), Rocio (ROCV) e Febre Amarela (YFV). Os DENV e OROV estão associados com doença humana epidêmica em áreas urbanas, enquanto que os MAYV, ROCV e YFV especialmente em áreas rurais. Basicamente, o OROV determina um quadro febril e em algumas vezes acompanhado por meningite asséptica. MAYV e DENV são responsáveis por quadros exantemáticos, sendo que o DENV tem sido associado com quadros de febre hemorrágica, o que sabidamente é o mecanismo pelo qual o YFV determina a sua apresentação clínica clássica. O ROCV está associado com severo quadro de encefalite (VASCONCELOS et al., 2001).

O maior risco para a ocorrência de emergências causadas por arboviroses vem da urbanização extensiva e a colonização deste habitat pela expansão do mosquito altamente antropofílico, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762. Estes fatores levaram ao aparecimento de permanentes ciclos de DENV em áreas urbanas e do vírus Chikungunya (CHIKV). O surgimento nas Américas, Europa e África do *Aedes albopictus* Skuse, 1894, um importante vetor secundário do DENV e do

CHIKV, tem aumentado a transmissão urbana destes vírus (CHOMEL et al., 2007; MORENS et al., 2008; GOLD & HIGGS, 2009; WEAVER & REISEN, 2010).

Desta forma, se faz necessário maiores conhecimentos sobre esses agentes e do real risco de disseminação e da capacidade de causar grandes epizootias e epidemias, além da implantação de uma política mundial de vigilância e controle das arboviroses efetiva e de resposta rápida, objetivando um menor impacto para a saúde da população e dos animais.

Diante da importância das arboviroses, este estudo visou determinar a magnitude da ocorrência de anticorpos das principais arboviroses de importância em saúde pública que circulam na população de equídeos e aves silvestres em território brasileiro e definir a importância da vigilância veterinária nestas espécies animais como instrumento de prevenção e controle dessas doenças, além de comparar os resultados obtidos para o EEEV, frente a uma epizootia em equinos ocorrida na Paraíba, mediante uso das técnicas sorológicas de inibição de hemaglutinação (IH) e teste soroneutralização em microplacas (SN).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fontes de infecção e principais vetores

As arboviroses são mantidas na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos) que, após a infecção, transmitem estes microrganismos durante o repasto sanguíneo em animais (principalmente aves e mamíferos). O ciclo se completa quando um grupo de novos artrópodes se alimenta de animais virêmicos. A transmissão vertical também pode ocorrer, por uma rota transovariana, no qual o artrópode transmite o vírus à sua progênie. Grandes porções de genomas *Flaviviridae* foram observadas dentro de mosquitos *Aedes* sp., indicando que estes vírus latentes podem surgir a partir daí. No entanto, esta é uma suposição de que ainda necessita de confirmação (OMS, 1985; FIGUEIREDO, 2007)

Considerando o descrito acima, WEAVER & REISEN (2010), corroboraram detalhando que a transmissão biológica entre os vetores pode ser vertical, envolvendo a passagem do vírus de uma fêmea infectada para seus descendentes de ambos os sexos. A transmissão horizontal pode ser venérea, de um macho infectado verticalmente diretamente para uma fêmea, bem como por via oral a partir de um vetor para um hospedeiro vertebrado por meio da saliva durante a alimentação de sangue.

Na Amazônia brasileira, coabitam grande diversidade de espécies de dípteros hematófagos (mosquitos e flebotomíneos) e vertebrados silvestres. Esta diversidade de espécies e seu número elevado constituem um achado único no mundo e propiciam condições ambientais bastante favoráveis à manutenção de vírus, em particular dos arbovírus, na natureza (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2001).

O papel de reservatório e vetores é significativo, devido a três fatores básicos. Primeiro, existem vários registros de isolamento de vírus como o EEEV, La Crosse, Encefalite Japonesa, SLEV e WNV em mosquitos durante o inverno em regiões temperadas e subtropicais, quando a cessação de atividade do vetor é claramente marcada. Segundo, há um número crescente de registros de transmissão vertical em vetores no campo e por fim, a persistência em longo prazo

por meio da transmissão viral transestadial em carrapatos foi documentada diversas vezes (KUNO & CHANG, 2005; WEAVER & REISEN, 2010).

O *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são os mais importantes vetores de arbovírus para o homem. Ambas são espécies exóticas que chegaram ao Continente Americano após desenvolverem, em seus ambientes primários, grau significativo de sinantropia (DEGALLIER et al., 1989; GOMES, 1998; CAUSEY & CAUSEY, 2002).

Mosquitos do gênero *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827 (LOPES et al., 1978) presentes na Amazônia, as espécies *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) e *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), testados experimentalmente com sucesso por MITCHELL et al. (1981), MITCHELL & FORATTINI (1984) e MITCHELL et al. (1986) são considerados como vetores potenciais do ROCV. Segundo CRUZ et al. (2009), é importante assinalar que o OROV é, após o vírus da dengue, o arbovírus mais prevalente que infecta humanos, sendo associado com epidemias, e tem como seu transmissor o *Culicoides paraensis* Goeldi, 1905.

Os mosquitos do gênero *Culex* são os principais vetores mantenedores do WNV no Velho Mundo, sendo as espécies *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 e *Culex restuans* Theobald, 1905, frequentes vetores ornitofílicos do SLEV no nordeste dos Estados Unidos, espécies infectadas com maior frequência neste país (PETERSON & ROHRIG, 2001).

Dado o enorme número de artrópodes sugadores de sangue e a diversidade de espécies de reservatórios disponíveis nos numerosos e variados ambientes que ocupam, os arbovírus evoluíram de forma independente em associação com um conjunto exclusivo de reservatórios competentes disponíveis, usando um vetor para a sua replicação, sobrevivência e transporte entre os hospedeiros vertebrados (DEGALLIER et al., 1989; KUNO & CHANG, 2005).

2.2 A importância dos equídeos e aves silvestres na disseminação das arboviroses de importância em saúde pública.

A maioria dos arbovírus tem seus ciclos de transmissão considerados essencialmente zoonóticos. Além dos animais doentes existem aqueles

cronicamente infectados ou portadores sadios, em especial animais silvestres, que assumem uma importância significativa na transmissão desses vírus. Assim, a inclusão de vertebrados reservatórios é fundamental quando se descrevem esquemas de transmissão de arbovírus (PETERSON & ROEHRIG, 2001).

As três principais informações utilizadas para a identificação de reservatórios vertebrados para as arboviroses são o isolamento do vírus de animais suspeitos, a prevalência de anticorpos relativamente elevada nos animais capturados no campo e a demonstração de viremia (vírus de maior titulação e duração) normalmente obtidos nos animais suspeitos, em condições de laboratório (KUNO & CHANG, 2005).

Segundo CASALS (1957), TRAVASSOS DA ROSA et al. (1986) e ZELLER et al. (1989) os arbovírus encontrados nas aves silvestres são classificados em diversos grupos sistemáticos e os que têm importância para a saúde pública, como seguramente associados às aves, pertencem aos gêneros *Alfavirus* (WEEV, EEEV, MAYV e PIXV), *Flavivirus* (ILHV, SLEV, CPCV e ROCV) e *Bunyavirus* (OROV e MAGV).

O WEEV é patogênico para equídeos e humanos, é transmitido endemicamente na Amazônia entre aves silvestres (67 espécies distintas) e por mosquitos dos gêneros *Culex* Linnaeus, 1758 e *Aedes* Meigen, 1818 (DEGALLIER et al., 1992). Enquanto que o ILHV apresenta um ciclo tipicamente ave-mosquito-ave, apesar de já terem sido detectados anticorpos ou isolados vírus de outros vertebrados como roedores, marsupiais, desdentados e morcegos (VASCONCELOS et al., 1991; VASCONCELOS et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2001).

Aves silvestres como perdizes, pardais, marrecos, corvos e aves domésticas como frangos, perus e pombos podem infectar-se com um vírus e apresentar viremia por vários dias (CORRÊA & CORREA, 1992; BECKWITH et al., 2002), desempenhando dessa maneira papel importante no ciclo de transmissão e manutenção das encefalites equinas (TOMASSIAN, 1996).

Estudos realizados em várias partes do mundo demonstram a presença de anticorpos e isolamento viral em equídeos dos mais diversos arbovírus de importância em saúde pública, como WNV, EEEV, WEEV, VEEV, SLEV, MAYV, OROV. Entretanto somente nos quatro primeiros, esta espécie animal apresenta

manifestação clínica e, somente no caso do VEEV, os equídeos apresentam-se como amplificadores do vírus, demonstrando assim, ser na maioria dos casos um hospedeiro acidental (KOTAIT et al., 1992; ACHA & SZYFRES, 2003; FLORES, 2007; RIET-CORREA et al., 2007; CDC, 2010).

O ROCV somente foi isolado no homem, aves e mosquitos na região do Vale do Ribeira/SP, conforme descrito LOPES et al. (1978) e IVERSSON et al. (1989). Entretanto, TAVARES-NETO (1986) e STRAATMANN et al. (1997) e FIGUEIREDO (2000) relataram a presença de anticorpos para o ROCV na Bahia e Ribeirão Preto/SP. A detecção de anticorpos contra o ROCV em aves da Região Amazônica, descrita por DEGALLIER et al. (1992) foi a primeira evidência da possível circulação desse vírus nessa região.

Segundo PETERSON & ROHRIG (2001), a experiência existente com o WNV no Velho Mundo e com o SLEV na América permite pensar que o WNV pode alcançar uma ampla distribuição geográfica no continente americano e chegar a ter uma grande variedade de mosquitos vetores e de espécies de aves silvestres como reservatórios do vírus. Por apresentarem uma viremia elevada, centenas de espécies de pássaros e mosquitos, são os grandes responsáveis pela manutenção do ciclo da WNV no continente norte-americano (BECKWITH et al., 2002; ZEINAD et al., 2004).

2.3 Principais arbovírus de importância em saúde pública

2.3.1 Família *Togaviridae*

A família *Togaviridae* abrange um grupo de vírus envelopados que possuem uma molécula de RNA de cadeia simples. A denominação *Toga* deriva de aparência frouxa de envelope viral, lembrando uma vestimenta romana, observada nas primeiras imagens obtidas por microscopia eletrônica, ou ainda devido ao envelope deste vírus estar intimamente associado ao nucleocapsídeo. Esses vírus medem de 60 a 70 nm de diâmetro (KOTAIT et al., 2006; FLORES, 2007; SELLON & LONG, 2007), possui duas glicoproteínas denominadas E1 e E2 imunodominantes que induzem a produção de anticorpos neutralizantes. A glicoproteína E2 induz a

resposta mais forte de anticorpos neutralizantes (ambos policlonal e monoclonal) e tem propriedades hemaglutinantes, cuja atividade é altamente modulada por pH (ICTV, 2005; SELLON & LONG, 2007).

Essa família é composta por dois gêneros: *Alfavirus* e *Rubivirus*. O primeiro abriga vários patógenos humanos e animais, cuja principal característica é a transmissão por vetores. O gênero *Rubivirus* abriga apenas o vírus da rubéola, um patógeno exclusivo de humanos e que não é transmitido por vetores (DAM et al., 1999; FLORES, 2007; SELLON & LONG, 2007).

Segundo CALISHER et al. (1980), pelo menos onze tipos que já foram associados com doença em humanos e dos quais oito têm sido responsáveis por grandes epidemias: EEEV, WEEV, VEEV, MAYV, vírus O'nyong-nyong (ONNV), vírus Ross River (RRV), vírus Chikungunya (CHIKV) e vírus Getah (GEV).

Alguns dos alfavírus têm importância especial por serem causadores de artrites, como: O'nyong-Nyong, Chikungunya, Ross River, Mayaro, Ibo-Ora, Barmah Floresta, Sindbis, Pogosta, Ockelbo, entre outros, conhecidos por causar no ser humano doenças em que as queixas reumáticas são uma característica principal. As mais proeminentes manifestações clínicas são febre, fadiga, erupções cutâneas e inflamação articular (CALISHER et al., 1980; LAINE et al., 2004).

Os vírus das Encefalites do Leste, do Oeste e Venezuelana, e as respectivas infecções possuem certa distribuição geográfica limitada às Américas (FLORES, 2007). Evidências da existência de um vírus causador de EEE e um da do Oeste, antigenicamente distintos, foram descritas pela primeira vez, em 1933. Equinos imunizados com cepas de vírus isolados de equinos infectados com o EEEV e WEEV obtiveram proteção diferenciada quando vacinados com o vírus atenuado de um local e expostos ao vírus de outro local (BERTONE, 2000; SELLON & LONG, 2007, PFEFFER & DOBLER, 2010).

As observações de surtos epidêmicos em equinos nos EUA, na década de 1930, já faziam suspeitar que houvesse mais de um vírus causador da enfermidade, pois no leste do país a letalidade era ao redor de 90% e no oeste era de 50%, ainda que os aspectos clínicos fossem muito similares (SELLON & LONG, 2007)

Em 1963, foram realizados estudos epidemiológicos em aves silvestres, na Amazônia brasileira, tendo sido isolado o EEEV e detectados anticorpos para o WEEV em 72 espécies de aves (VASCONCELOS et al., 1991). Também naquela região foram isolados os subtipos III e IV do VEEV, em macaco-sentinela do gênero *Cebus* e em grupo de mosquitos da espécie *Anopheles nimbus*, respectivamente (VASCONCELOS et al., 1991; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996).

O ciclo de transmissão dessas arboviroses, conforme observado na Figura 1 está intrinsecamente ligado primariamente ao ambiente silvestre, seus vetores e reservatórios, aonde se torna endêmico, e em segundo lugar a aproximação com o homem, animais domésticos e vetores periurbanos, na qual pode causar grandes epidemias e epizootias (FLORES, 2007; PFEFFER & DOBLER, 2010).

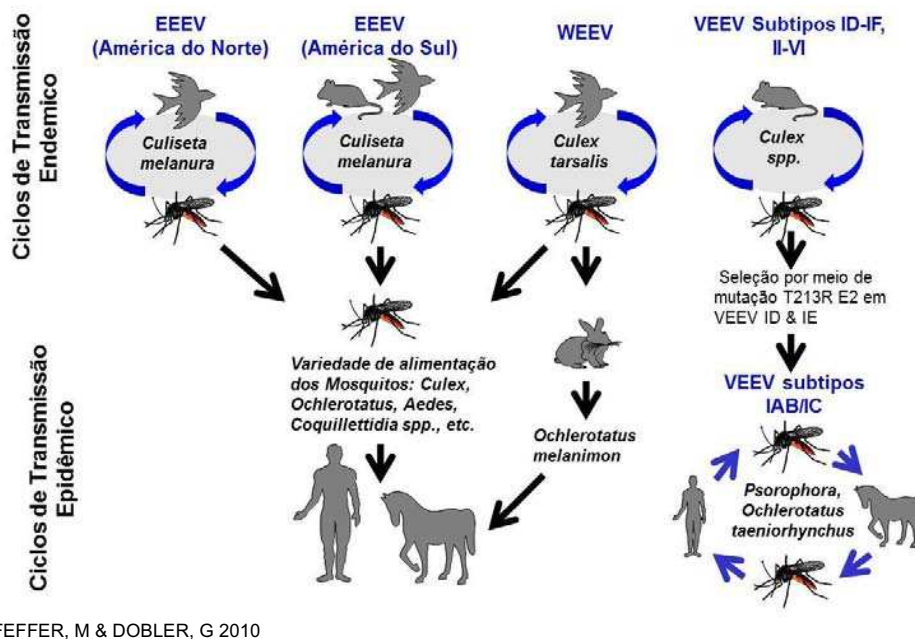


FIGURA 1 - Ciclo de transmissão das Encefalites Equinas adaptado de PFEFFER & DOBLER, 2010.

As consequências da infecção natural nas espécies hospedeiras variam desde infecções sub-clínicas agudas ou crônicas (aves, equídeos, insetos) até enfermidades fatais. A capacidade de hospedeiros vertebrados servirem de fonte de infecção e participarem do ciclo de transmissão do agente depende dos níveis de

viremia e da preferência específica dos insetos hematófagos (CORREA & CORREA, 1992; FLORES, 2007).

Nos humanos, além da transmissão naturalmente conhecida, por via vetorial, existe a contaminação por meio de transfusão sanguínea e transplante de órgão. Nos vetores pode ocorrer a transmissão vertical (FIGUEIREDO, 2007; PFEFFER & DOBLER, 2010) (Figura 2).

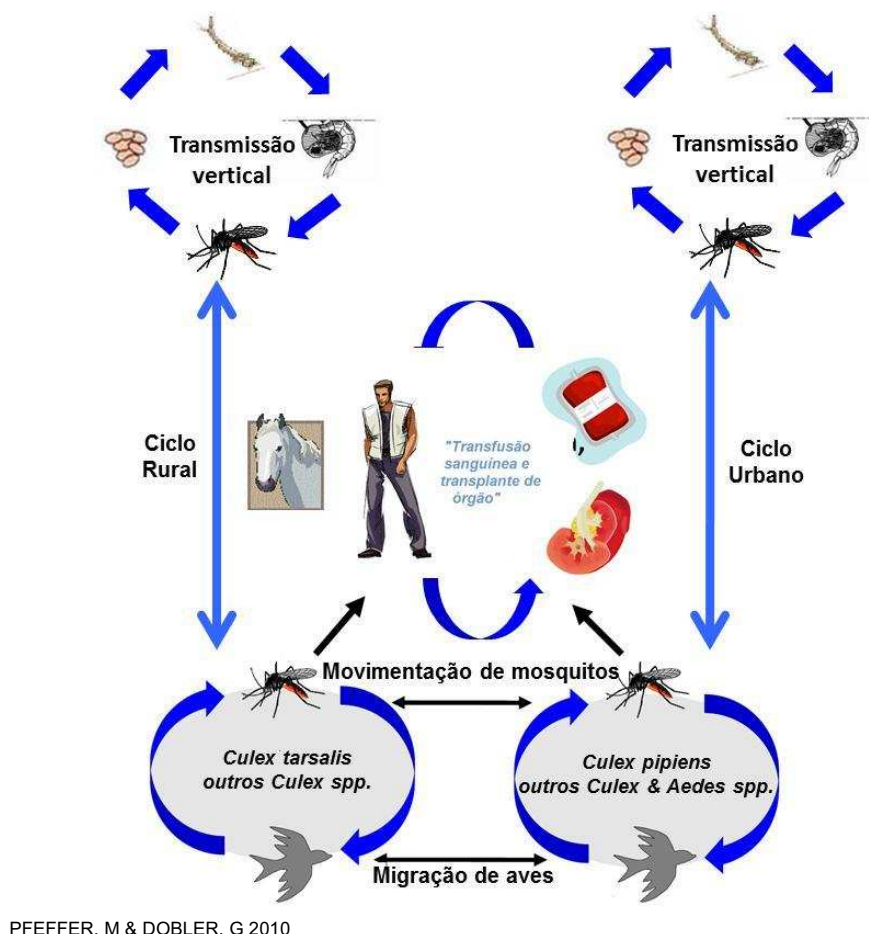


FIGURA 2 - Formas de contaminação e de transmissão das Encefalites Equinas adaptado de PFEFFER & DOBLER, 2010.

Embora a vacinação em larga escala nas Américas, tenha reduzido a magnitude e o número de surtos de EEE, WEE e EEV nos equídeos, o impacto de doença ainda é significativo devido à natureza fulminante dos sinais clínicos e elevada taxa de letalidade em cavalos afetados (SELLON & LONG, 2007).

A EEE foi a primeira, entre as EE a ser detectada, em equinos da região leste dos Estados Unidos (Massachusetts), em 1831. Este foco foi o maior que ocorreu em humanos, com 38 casos. Possui uma letalidade em equinos de 80% a 90% e em humanos de 65%. Tem quatro grupos antigênicos e geneticamente distintos, sendo: Grupo I, Grupo II, Grupo IIA e Grupo III (ACHA & SZYFRES, 2003; KOTAIT et al., 2006).

A infecção por EEE, em humanos, pode cursar em manifestações clínicas de uma doença sistêmica ou encefálica. A primeira infecção sistêmica tem início abrupto e é caracterizada por calafrios, febre, mal-estar, artralgia e mialgia. A doença dura de uma a duas semanas, sua recuperação é completa quando não há envolvimento do sistema nervoso central. Em crianças e adultos, a forma encefálica caracteriza-se por início abrupto e a encefalite se manifesta após alguns dias de doença sistêmica. Os pacientes com a forma severa da doença apresentam: febre, dor de cabeça, irritabilidade, agitação, sonolência, anorexia, vômitos, diarreia, cianose, convulsões e coma (FLORES, 2007; CDC, 2010).

Nos equídeos, a infecção pode cursar com uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde infecção inaparente, doença sistêmica sem sinais neurológicos, até doença neurológica fatal. O período de incubação é de cinco dias, após o qual surgem hipertermia, depressão, anorexia, sonolência e fraqueza. A fase neurológica é mais severa que nas infecções pelo WEEV e VEEV e cursa com distúrbios visuais (cegueira total ou parcial), fotofobia, bruxismo, disfagia, incoordenação motora, pressionamento da cabeça contra anteparos, andar em círculos, ataxia, paralisia, coma e morte (BLOOD, 1991; CORREA & CORREA, 1992; FLORES, 2007; SILVA FILHO, 2007). Irritabilidade também pode acontecer (BERAN & STEEEE, 1994).

Essa enfermidade tem uma grande importância para humanos nos Estados Unidos e Canadá. Durante o período de 1955-1976 foram registrados cerca de 900 casos nos EUA. Uma média de seis casos humanos de EEE é relatada a cada ano nos Estados Unidos (CDC, 2010). A incidência mais elevada correspondeu a 1965, com 172 casos. Segundo a OPAS (1983), o único caso registrado na América Latina e Caribe foi diagnosticado a partir de dados clínicos e sorológicos no Rio de Janeiro em 1961. Entretanto, ROMANO-LIEBER & IVERSSON (2000)

demonstraram uma prevalência de infecções por alfavírus, representados pelos EEEV e VEEV em 21,4% das pessoas avaliadas da zona rural do Vale do Ribeira. FERNÁNDEZ et al., 2000, detectaram em estudo realizado no Paraná, anticorpos neutralizantes contra o EEEV em 22 equinos daquele estado.

SANTOS et al. (2011) relataram uma epizootia de EEEV envolvendo 74 equinos ocorrida durante dois meses e 13 dias, em 2009, atingindo 16 municípios do oeste da Paraíba, na qual os animais apresentaram uma taxa de letalidade de 48,6%.

Além do envolvimento de equídeos, surtos pelo EEEV têm sido descritos em criações de faisões, emas, frangos de corte, marrecos-de-pequim e de algumas aves silvestres ameaçadas de extinção (FLORES, 2007). O EEEV possui ciclos secundários de manutenção, envolvendo além das aves, macacos, roedores, marsupiais e répteis (DEGALLIER et al., 1992).

A Encefalite Equina do Oeste (WEE) é uma enfermidade causada por um vírus antigenicamente relacionado com o EEEV (84% de homologia de aminoácidos) e pertence ao mesmo grupo antigênico do Sindbis (SIN), possui uma elevada frequência de mutações e recombinações. Há identificação de diversos subtipos, porém, somente o subtipo clássico apresenta importância epidemiológica. Sua caracterização sugere que se originam de isolados enzoóticos e mutações, sendo, portanto não virulentos para equídeos (KOTAIT et al., 2006; FLORES, 2007).

Nas Américas, essa enfermidade é rara, porém severa. Foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1930. Em 1941, ocorreu uma grande epidemia que acometeu cerca de 3.000 pessoas simultaneamente a uma epizootia que atingiu 30.000 cavalos. No norte do hemisfério, a taxa de letalidade dos casos clínicos se aproxima de 70%. Fora dos Estados Unidos, se registrou um surto na República Dominicana, entre 1948 e 1949, outro na Jamaica em 1962, dois casos em Trinidad e Tobago e um no Brasil, na década de 50. Também se têm registrado vários surtos em equídeos, codornizes, faisões, patos e perdizes. Entre as aves exóticas, as taxas de ataque têm sido de até 50% com perdas graves econômicas na América do Norte (OPAS, 1983; FLORES, 2007).

Na América do Sul, o vírus já foi isolado na Argentina, Brasil, Guiana, Equador e Uruguai, onde tem sido responsável por morbidade em equinos. Casos

humanos associados têm sido raros ou ausentes. O WEEV ainda não foi isolado na América Central, onde inquéritos sorológicos também indicam que infecções humanas são raras (OLITSKY & CASALS, 1959; THEILER & BOWNS, 1973; CALISHER et al., 1985; KARABATSOS, 1985, FERNÁNDEZ et al., 2000).

No Brasil, o WEEV foi isolado pela primeira vez em equinos, no Rio de Janeiro e foi sorologicamente relacionado à espécie SIN do complexo antigênico WEE (BRUNO-LOBO et al., 1961). Em 1963, foram realizados estudos epidemiológicos em aves silvestres, na Amazônia brasileira, tendo sido isolado o EEEV e detectados anticorpos para o WEEV em 72 espécies de aves (VASCONCELOS et al., 1991). Já foi isolado em vetores, na Floresta da Tijuca, no Rio de Janeiro, e em algumas oportunidades foram encontrados anticorpos em equinos e humanos (IVERSSON et al., 1982, KOTAIT et al., 2006).

O vírus da encefalomielite equina venezuelana (VEEV) foi primeiro caracterizado por KUBÉS & RIOS (1939), que isolaram o vírus do cérebro de um equino coletado na Venezuela. Desde então, outras cepas foram isoladas e caracterizadas na Colômbia, Trinidad e Equador (SHOPE et al., 2002).

Os agentes causadores das EE são os alfavírus mais importantes que circulam em equídeos e humanos nas Américas. Os primeiros casos foram descritos no norte da América do Sul e afetaram equídeos da região. Entre 1938 e 1973, vários surtos de proporções consideráveis ocorreram em intervalos de 10 anos. Entre 1969 e 1972, ocorreu uma grande epidemia entre a América Central e México, afetando milhares de equídeos e centenas de pessoas (ACHA & SZYFRES, 2003; FLORES, 2007).

O VEEV é endêmico na parte setentrional da América do Sul, América Central, Trinidad e Tobago, México e Flórida/EUA (GONZALEZ-SALAZAR et al., 2003). Periodicamente se manifesta com epizootias e epidemias, como as observadas durante 1967-1971, quando o vírus se propagou desde a América do Sul até a América Central e nos Estados Unidos. Calcula-se que neste período ocorreram mais de 100.000 mortes de equídeos e centenas de milhares de infecções em humanos. Em torno de 1% das pessoas infectadas apresentaram quadro de encefalite com a taxa de letalidade em torno de 3,6% (OPAS,1983;

FLORES, 2007). O vírus tem permanecido latente nos últimos anos devido a programas intensivos de vacinação em equídeos (FLORES, 2007).

O ciclo de transmissão do VEEV envolve equídeos que servem como a principal fonte do vírus, porque diferentemente dos EEEV e WEEV, ele se replica em altos títulos durante a fase virêmica nesta espécie animal, servindo assim de fonte de infecção para novos mosquitos hematófagos. Já a infecção de seres humanos é um evento final, enquanto bovinos e suínos quando infectados desenvolvem infecções inaparentes, mas podem servir como fonte potencial de infecção para mosquitos hematófagos (GONZALEZ-SALAZAR et al., 2003; SCOTT & JACOBSON, 2003).

O VEEV pertence a um grupo de alfavírus que abrange seis diferentes subtipos (I, II, III, IV, V e VI) e subdivididos em várias espécies (VEEV, Mosso das Pedras, Everglades, Mucambo, Tonate, Pixuna, Cabassou e Rio Negro) e variantes (AB, A, B, C, D, E e F), agrupados de acordo com a sua relação antigênica e cada grupo apresenta virulência e potencial epizootico diferentes (SHOPE et al., 2002; WEAVER et al., 2004; FLORES, 2007).

Em 1990, IVERSSON et al. (1990) relataram a presença de anticorpos neutralizantes, para a variedade IF (Mosso das Pedras) do complexo EEV, em 24% (6/25) dos soros de soldados que haviam retornado de treinamento em área silvestre do Vale do Ribeira, São Paulo. Vinte desses soldados tiveram doença febril por volta do sétimo dia após o retorno. Em dois deles detectaram-se anticorpos IgM para esse arbovírus, constituindo-se no primeiro relato de doença humana, naturalmente adquirida, causada por esse agente, no Brasil. No mesmo período, ROMANO-LIEBER & IVERSSON (2000) demonstraram prevalência de infecções por alfavírus, representados pelos EEEV e VEEV, de 21,4% em pessoas da zona rural do Vale do Ribeira.

Pelo menos dez espécies de mosquitos podem participar da epidemiologia e transmissão dos vírus da EEV, incluindo os gêneros *Culex* sp. e *Aedes* sp. e a eficiência de transmissão varia entre as diferentes espécies de vetores e de vírus (FLORES, 2007).

O vírus da febre de Mayaro (MAYV) é um membro da família *Alfavirus*, do gênero *Togaviridae*, e está intimamente relacionado com o vírus Chikungunya,

O'nyong-Nyong, Ross River, Barmah Forest e o vírus Sindbis. A infecção por estes vírus produzem doenças clínicas similares em humanos. É tipicamente uma doença febril aguda como a dengue com três a cinco dias de duração, caracterizada por cefaléia, dor retro-orbitária, artralgias, artrite, mialgias, vômitos, diarreia e erupções cutâneas. No entanto, uma característica proeminente da doença é a poliartrite, ocasionalmente incapacitante, podendo ser de moderada a severa e persistir por meses (OPAS, 1983; TORRES et al., 2004).

Os primeiros isolamentos do MAYV foram obtidos em Trinidad & Tobago, em 1954, a partir do sangue de cinco indivíduos com quadro febril (ANDERSON et al., 1957). No ano seguinte o vírus foi isolado no Brasil, durante uma epidemia em uma localidade situada às margens do rio Guamá, cerca de 200 Km a leste de Belém. Estudos subsequentes demonstraram que a imunidade para o agente é amplamente disseminada em populações humanas da região Amazônica e Centro-Oeste do Brasil (PINHEIRO & LEDUC, 1986). Anticorpos para o agente também têm sido assinalados em residentes de outros países da América do Sul, como Colômbia, Guiana, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela, da América Central, como Costa Rica, Guatemala e Panamá.

A imunidade contra o MAYV é frequente na população das zonas rurais da América do Sul. Em algumas localidades até 60% dos habitantes têm anticorpos contra os alfavírus. Entretanto, existem poucos surtos relacionados, sem relatos de mortes, porém os pacientes apresentam artralgias severa, particularmente nas extremidades, com incapacitação temporária (OPAS, 1983).

No Brasil, embora o maior número de casos tenha sido reportado na região amazônica, existem relatos de detecção de anticorpos em Goiás, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo, sugerindo que a circulação viral ocorre em outras regiões do País (NEEE et al., 1968; VASCONCELOS et al., 1998; COIMBRA et al., 2007).

Embora o ciclo silvestre principal do vírus MAY seja bastante semelhante ao da YF (HERVE et al., 1986), envolvendo macacos e mosquitos do gênero *Haemagogus* Williston, 1896 e surgindo em forma de epidemias simultâneas (HOCH et al., 1981; PINHEIRO et al., 1986). O vírus também tem sido isolado em aves (41 espécies), marsupiais e répteis. Assim, estudos entomológicos acerca das

preferências tróficas do vetor serão necessários para avaliar o papel relativo de cada um desses hospedeiros vertebrados no ciclo de manutenção desse importante patógeno humano (DEGALLIER et al., 1992; CRUZ et al., 2009).

2.3.2 Família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é composta pelos gêneros *Hepacivirus*, causador da Hepatite “C” em humanos; *Pestivirus* que inclui o vírus da peste suína clássica e o vírus da diarreia viral bovina que infectam exclusivamente animais e o gênero *Flavivirus* (FAUQUET et al., 2005; ICTV, 2005).

Os flavivírus estão divididos em cerca de 60 espécies virais de difícil identificação morfológica. Taxonomicamente estão distribuídos em dez grupos antigenicamente relacionados e são transmitidos primariamente por insetos (SCHATZMAYR & BARTH, 2005; LINDENBACH et al., 2007). O protótipo deste gênero é o YFV (vírus da febre amarela), responsável por doença severa em humanos e primatas não humanos nas regiões tropicais e equatoriais. Além deste, o WNV, SLEV e o JEV são também vírus zoonóticos de importância em sanidade animal.

Os flavivírus incluem vários vírus de grande importância epidemiológica por causarem doenças em humanos e/ou animais de interesse econômico e por apresentarem ampla distribuição geográfica. Pelo menos 40 flavivírus já foram associados à infecção humana, dentre os quais, o YFV, o DENV, o SLEV, o JEV, o WNV e o ROCV estão associados a grandes epidemias (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997, VASCONCELOS et al., 1998; FLORES, 2007).

Os flavivírus podem ser transmitidos para humanos e outros animais por meio da picada de artrópodes hematófagos (mosquitos e carrapatos) ou por via transovariana, entre os hospedeiros artrópodes. A transmissão para os artrópodes frequentemente necessita que o vírus produza elevada viremia no hospedeiro vertebrado e replique nos tecidos dos artrópodes infectados (KARABATSOS, 1985; GUBLER et al., 2007).

GOULD et al. (2003) referiram sobre a presença dos flavivírus em todos os continentes, com exceção da Antártida. Estes vírus apresentam uma distribuição

geográfica distinta e sua dispersão está diretamente relacionada a: (i) infecção de diferentes hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados; (ii) ecologia do habitat natural em que cada vírus é encontrado; (iii) condições climáticas; e (iv) impacto da urbanização e do sistema de transporte. Os dados filogenéticos ilustram claramente como a adaptação de cada vírus em hospedeiros vertebrados e invertebrados específicos influenciam na evolução viral, dispersão, epidemiologia e, possivelmente, na patogênese dos flavivírus.

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, acompanhada de meningoencefalite (WNV, ROCV e SLEV); os associados com febre, artralgia e eritemas (DENV) e aqueles associados com febre hemorrágica (YFV) (FLORES, 2007; LINDENBACH et al., 2007).

A Febre do Nilo Ocidental (WNV) é causada por um vírus RNA, membro da família *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), enquadrado no complexo antigênico do vírus da encefalite japonesa, que inclui os vírus St. Louis, Rocio, Ilhéus, entre outros (PETERSEN & ROEHRIG, 2001; ZEINAD et al, 2004, DIAZ et al., 2008; BRASIL, 2010; BRASIL, 2011).

Em 1940, o WNV foi isolado de uma mulher procedente do Distrito de West Nile, província do Nordeste de Uganda, na África Oriental. A partir desta data, existem relatos de infecção por esse vírus, causando ou não a doença clínica em várias regiões da África, Europa e Ásia (BERNOKOPK et al., 1953; TAYLOR et al., 1956; FILIPE & PINTO, 1969; OSTLUND et al., 2001, BRASIL, 2011).

Na história recente, o WNV marcou a introdução de um flavivírus vindo do Velho para o Novo Mundo quando, em agosto de 1999 foi detectada a sua presença nos Estados Unidos, onde se instalou e vem causando epidemias desde então (NASH et al., 2001, ACHA & SZYFRES, 2003, PAUVOLID-CORREA & VARELLA, 2008). O vírus disseminou-se em seguida ao Canadá, México e América Central, acometendo humanos, equinos e aves. Na variante encontrada a partir dos EUA foi observada uma estreita relação com o vírus encontrado em Israel, porém a forma

como ele foi introduzido ainda é desconhecida (ACHA & SZYFRES, 2003, BRASIL, 2010).

Na América do Sul, em especial na Colômbia, em 2004, foi considerada uma evidência indireta da presença do WNV, encontrado a partir de sorologia positiva em aves domésticas e equinos; em 2005 e 2006 na Argentina foi isolado vírus em equinos e detectada a presença de anticorpos e na Venezuela em 2006 foram também detectados anticorpos em equinos (MORALES et al., 2006; BOSCH et al., 2007; MATTAR et al., 2007; DIAZ et al., 2008).

No Brasil, PAUVOLID-CORRÊA et al. (2011), relatam a detecção de anticorpos neutralizantes obtidos em 3,0% dos equinos amostrados na região de Nhecolândia, no pantanal sul mato-grossense. BRASIL (2011) refere a importância da detecção de anticorpos recentemente achados a partir de inquéritos sorológicos, assim como as recentes comunicações científicas, que demonstraram evidências de presença de anticorpos contra o WNV em animais e ressaltaram a importância da manutenção da vigilância da circulação do vírus no Brasil. A Nota Técnica nº 28/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), reforça que embora tenham sido obtidos resultados sorológicos positivos em duas pesquisas publicadas e em algumas amostras coletadas em ações de vigilância animal, ainda não foram registrados casos confirmados em nenhuma espécie animal, nem em humanos no Brasil. A detecção de anticorpos, embora sugestiva da circulação viral, não permite concluir sobre a presença do vírus no País, sendo necessário, para tal, o isolamento do vírus em animais, vetores ou em humanos.

O homem, assim como cavalos, cães e outros animais domésticos são hospedeiros incidentais do WNV, que apresentam baixa viremia, não estando envolvidos com o ciclo do parasita no meio ambiente (ZEINAD et al., 2004, HAYES et al., 2005). Assim, o vírus é mantido na natureza por meio de ciclos alternados de infecção em aves silvestres e mosquitos hematófagos. A infecção de mamíferos silvestres e domésticos, de aves domésticas e de humanos é ocasional e aparentemente não contribui para a manutenção do vírus na natureza (KOMAR, 2003, PAUVOLID-CORREA & VARELLA, 2008).

A transmissão do WNV para humanos, equinos e outros animais depende da abundância de mosquitos vetores, dos padrões de alimentação e ecológicos

locais e do grau de exposição destes hospedeiros a insetos hematófagos (KOMAR, 2003; HAYES et al., 2005)

As aves migratórias foram responsáveis pela disseminação desse vírus para o México, Caribe, América Central e do Sul. O padrão de disseminação do WNV dos EUA para o Norte da América do Sul, entre 1999 e 2004, em etapas, é compatível com a disseminação por pássaros migratórios (KOMAR & CLARK, 2006; LADEAU et al., 2007).

Segundo BRASIL (2010), as infecções nos humanos pelo WNV, de forma geral, causam uma infecção clinicamente inaparente, sendo que 20% dos casos desenvolvem uma doença leve. Os primeiros sinais e/ou sintomas da forma leve da doença são: febre de início abrupto, acompanhada de mal-estar, anorexia, náusea, vômito, dor nos olhos, dor de cabeça, mialgia, exantema máculo-papular e linfadenopatia. Uma em cada 150 infecções resulta em doença neurológica severa, cujo maior fator de risco é a idade avançada. A encefalite é mais comumente relatada do que a meningite. Ambas apresentam-se com febre, fraqueza, sintomas gastrointestinais e alteração no “padrão mental”. Podem apresentar exantema, fraqueza muscular severa e paralisia flácida. São incluídas as apresentações neurológicas, como ataxia e sinais extrapiramidais, anormalidades dos nervos cranianos, mielite, neurite ótica, polirradiculite e convulsão. Há relato de miocardite, pancreatite e hepatite fulminante (PAUVOLID-CORREA & VARELLA, 2008).

Nos equinos, os sinais observados com maior frequência são anorexia, fraqueza, depressão, incoordenação, ataxia e decúbito. Febre nem sempre está presente. Bruxismo, andar em círculos, hiperexcitabilidade, pressionamento da cabeça contra anteparos e convulsões também têm sido relatados. A taxa de letalidade em equinos varia entre 25 e 45% (BUNNING et al., 2002; WARD et al., 2006; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011).

A susceptibilidade do WNV entre as aves difere de acordo com a espécie. Entre as silvestres, os corvídeos, passeriformes e chaladriiformes são as mais susceptíveis (KOMAR et al., 2006). Estas espécies desenvolvem elevados níveis de viremia e excretam grandes quantidades de vírus. Os sinais clínicos característicos da doença incluem depressão, letargia, plumas eriçadas e sinais neurológicos como ataxia, paralisia, movimentos de pedlagem, torcicolo, opistótomo e incoordenação.

As taxas de mortalidade são geralmente elevadas e os óbitos geralmente ocorrem em 24 horas (FLORES & WEIBLEN, 2009; BRASIL, 2010).

Como estratégia de vigilância dessa enfermidade tem-se por base a perspectiva de vigilância ecológica e de casos humanos, que deve ser implantada a partir de necessidade e condição do local, considerando a mortandade aviária, epizootias em equinos, a vigilância sentinela, a vigilância entomológica e a detecção precoce de casos humanos (MARTINEZ et al., 2002; BRASIL, 2010)

O vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) está intimamente relacionado ao complexo antigênico do Vírus da Encefalite Japonesa, grupo que contém também outros patógenos de importância médica, como os WNV e o Vírus da Encefalite de Murray Valley, além do ROCV e ILHV (RICE, 1996, ZEINAD et al., 2004).

Os mosquitos, principalmente os do gênero *Culex*, são infectados quando fazem o repasto sanguíneo em aves infectadas pelo SLEV. Estes mosquitos transmitem o vírus para os seres humanos e animais durante o processo de alimentação. O vírus se replica nas aves e nos mosquitos, mas nenhum deles adoce (TSAI & MITCHELL, 1988; DIAZ et al., 2005; CDC, 2009). Na América Central e do Sul, o ciclo de transmissão aparenta ser mais variado, incluindo outros gêneros de mosquitos como *Sabethes* Humboldt, 1819; *Mansonia* Blanchard, 1901 e *Haemagogus* (VASCONCELOS et al., 1998; CHARREL et al., 1999; REISEN, 2003).

Ainda que o SLEV esteja muito difundido no hemisfério sul, somente na América do Norte se considera a enfermidade como um problema de saúde pública. Estima-se que desde o isolamento do vírus em 1933, existem registros de cerca de 10.000 casos com 10% de letalidade. A maioria dos casos foi relatada nos Estados Unidos. A maior epidemia registrada na história da enfermidade ocorreu em 1975 neste país, com 1.815 casos. Além dos Estados Unidos e Canadá, somente foi registrado um surto no México em 1974, com 51 casos diagnosticados. Entre 1953 a 1965 a Argentina, Jamaica, Suriname e Trinidad Tobago, notificaram sete casos com prova sorológica de infecção pelo SLEV (OPAS, 1983).

Em 2005, foram confirmados 47 casos humanos e nove óbitos na Província de Córdoba, Argentina e feito isolamento do vírus a partir de *Cx. quinquefasciatus*, capturados na mesma época dos casos (DIAZ et al., 2005; SPINSANTI et al., 2005).

Os poucos casos confirmados por isolamento do agente na América Central e do Sul foram clinicamente caracterizados por acessos febris relativamente benignos. A incidência nas pessoas com mais de 60 anos de idade é de cinco a 40 vezes maior que no grupo de zero a nove anos (OPAS, 1983; TSAI & MITCHELL, 1988; ACHA & SZYFRES, 2003; CDC, 2009).

No Brasil, a presença do SLEV tem sido encontrada em inquéritos sorológicos resultantes do trabalho de vigilância de arbovírus (VASCONCELOS et al., 1998). No Vale do Ribeira/SP, estudos de prevalência sorológica demonstraram a presença de anticorpo neutralizantes e IgG em humanos e em aves, respectivamente, sugerindo a circulação do vírus na região (FERREIRA et al., 1994; ROMANO-LIEBER & IVERSSON, 2000). Em 2006, foram detectados anticorpos IgG, monotípicos para SLEV em 88% das aves capturadas em Iguape/SP (BISORDI et al., 2006). Em humanos, existe relato de dois casos ocorridos em Belém/PA, sendo um caso na década de 70 e outro dez anos depois (PINHEIRO et al., 1981; PINHEIRO et al., 1986). Outro caso foi relatado em Registro/SP (COIMBRA et al., 1999) e depois em 2004, em São Pedro/SP foi caracterizado o primeiro isolamento desse vírus em humanos no Estado de São Paulo (ROCCO et al., 2005).

Além das aves, na Amazônia Brasileira, macacos, preguiças, tatus, marsupiais, morcegos e provavelmente quelônios terrestres do gênero *Chelonoidis* são suspeitos de também participar na manutenção do SLEV num nível endêmico (DEGALLIER et al., 1989). TSAI & MITCHELL, (1988) relataram a detecção de anticorpos para SLEV em mamíferos terrestres, como guaxinim (*Procyon lotor*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) na América do Norte e em macacos e roedores na América do Sul.

Segundo ACHA & SZYFRES (2003), em inquéritos sorológicos se tem comprovado a infecção em muitas espécies animais, inclusive em equídeos, existindo relato de alguns casos com manifestação clínica associada ao SLEV nesta espécie animal.

Cerca de 1% das infecções pelo SLEV são clinicamente aparentes e a grande maioria das infecções permanece sem diagnóstico. O período de incubação da doença varia de cinco a 15 dias. O início da doença geralmente é abrupto, com febre, dor de cabeça, tonturas, mal-estar e náuseas. Os sinais e sintomas se

intensificam ao longo de um período de vários dias a uma semana. Alguns pacientes se recuperam espontaneamente após este período, outros desenvolvem sinais de comprometimento neurológico, incluindo rigidez do pescoço, confusão, desorientação, tonturas, tremores e instabilidade. Coma pode se desenvolver em casos graves. A doença é geralmente mais branda nas crianças do que em adultos mais velhos. A proporção geral de letalidade é de cinco a 15%. O risco de doença fatal também aumenta com a idade (CDC, 2009).

A encefalite de Rocio é uma enfermidade focal observada pela primeira vez, em 1975, no litoral sul de São Paulo. Durante dois anos consecutivos ocasionou surtos, com cerca de 1000 casos clínicos diagnosticados e se propagou por 20 municípios do Vale do Ribeira e Baixada Santista. A taxa de letalidade foi em torno de 5% dos casos hospitalizados e cerca de 20% permaneceram com sequelas cerebrais. A transmissão está associada com fatores ecológicos e em pessoas com mais de 15 anos de idade (IVERSSON, 1980; OPAS, 1983; ACHA & SXYFRES, 2003).

Os reservatórios, hospedeiros e vetores do ROCV não são bem conhecidos, contudo vários estudos ecológicos e experimentais sugerem que as aves silvestres constituem os principais hospedeiros vertebrados e que aves domésticas podem atuar como hospedeiros amplificadores. Também foram encontradas elevadas taxas de animais reagentes em roedores e marsupiais. Entretanto, com base no isolamento do vírus e os dados de sorologia, o ROCV é mantido em um ciclo em que as aves selvagens, incluindo algumas espécies migratórias, são os reservatórios e mosquitos *Aedes* sp. e *Psorophora* sp. são os vetores. Ainda é desconhecido como este novo flavivírus surgiu em 1973 e desapareceu sete anos depois do Vale do Ribeira (LOPES et al., 1978; IVERSSON, 1988; ACHA & SZYFRES, 2003).

A presença de anticorpos neutralizantes para o ROCV tem sido detectada em pessoas e animais que vivem em áreas rurais do sudeste e nordeste do Brasil. É possível que este vírus circule em regiões distintas do Brasil e o ressurgimento do ROCV com consequentes surtos de encefalite severa representa uma ameaça permanente (ACHA & SZYFRES, 2003; FIGUEIREDO, 2007).

Fora do Estado de São Paulo, foram identificados cinco casos de infecção pelo ROCV no Paraná, numa região próxima ao Vale do Ribeira (IVERSSON, 1988) e oito casos como sorologia positiva para o ROCV em quatro municípios da Bahia (STRAATMANN et al., 1997).

O período de incubação dura em torno de 12 dias. As manifestações clínicas são muito variadas variando desde uma febre brusca e cefaléia, vômitos e dores abdominais. As manifestações neurológicas consistem em rigidez da nuca, confusão mental e perturbações motoras e de equilíbrio. Causam lesões histológicas no cérebro comuns a outras encefalites agudas víricas, com a particularidade de acometer principalmente a estrutura do tálamo, núcleo dentado e hipotálamo (ROSEMBERG, 1977).

O vírus da Febre de Ilhéus (ILHV) foi isolado pela primeira vez em Ilhéus/BA, em 1944, e novamente isolado de cinco pacientes de São Paulo/SP em 1995 (NASSAR et al., 1997). Está amplamente distribuído nas Américas Central e do Sul, em especial na Argentina, Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras, Panamá e Trinidad e Tobago (PINHEIRO et al., 1986; PRIAS-LANDINEZ et al., 1986; ACHA & SZYFRES, 2003). Exibe um ciclo característico, no qual o vírus circula entre aves e mosquitos, e que vários outros vertebrados foram encontrados sendo portadores de anticorpos ou dos quais se isolou o vírus, tais como roedores, marsupiais, desdentados morcegos, macacos e humanos (KARABATSOS, 1985; HERVÉ et al., 1986; DEGALLIER et al., 1989; NASSAR et al., 1997). No que se refere às aves hospedeiras, o ILHV parece bastante versátil, sendo encontrado em todos os tipos e estratos de vegetação.

O principal vetor é o *Psorophora ferox Didelphis marsupialis* Von Humboldt, 1819 (KARABATSOS, 1985; NASSAR et al., 1997), mas também já foi isolado em *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyard & Knab, 1908; em Juquitiba/SP (CHAMELET et al., 1996), além de *Aedes* que parece ser o principal vetor do vírus. Também já foi possível demonstrar de forma experimental que os mosquitos *Ae. aegypti*, *Ae. serratus* e *P. ferox* podem transmitir o vírus a ratos lactantes pela picada (ACHA & SZYFRES, 2003).

Segundo MEDEIROS (2009), o ILHV e ROCV apresentam possivelmente o mesmo vetor; entretanto a distribuição geográfica destes flavivírus é distinta,

sendo o ILHV detectado em diferentes regiões do Brasil e da América do Sul e Central, o ROCV está aparentemente restrito ao sudeste do país.

É provável que a infecção no humano transcorra na forma inaparente ou na maioria dos casos produza uma enfermidade febril diferenciada e leve. Os principais sintomas da febre de Ilhéus são: febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia, prostração, problemas respiratórios, fotofobia, encefalite e pleocitoses. Nos animais a doença é assintomática, entretanto existe viremia suficiente para infectar os vetores (ACHA & SZYFRES, 2003).

ILHV e ROCV são antigenicamente relacionados e apresentam potencial neuroinvasivo. O espectro clínico varia desde infecções assintomáticas até quadro de encefalite. No entanto, a maioria absoluta dos 83 casos de ILHV registrados caracterizou-se por quadros febris, com evolução média de três dias (VASCONCELOS et al, 1992; VASCONCELOS et al.,1998). Apresenta início súbito, com febre moderada ou elevada, acompanhada de cefaléia, calafrios, fotofobias, artralgia, mialgias e astenia, sendo a recuperação completa sem sequelas (VASCONCELOS, 1992; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; FIGUEIREDO, 2000).

PEREIRA et al. (2001) isolou o ILHV a partir de amostras de sangue de duas aves das espécies *Sporophila caerulescens* (papa-capim) e *Molothrus bonariensis* (chupim), e detectou a presença de anticorpos inibidores de hemaglutinação, monotípicos para o ILHV nas aves rolinha caldo-de-feijão (*Columbina talpacoti*), pombinha (*Geopelia cuneata*), chupim (*Molothrus bonariensis*) e canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), nos sagüis (*Callithrix jacchus* e *C. penicillata*) e no quati (*Nasua nasua*) do Parque Nacional do Tietê em São Paulo.

O vírus Cacicaporé (CPCV) foi isolado de uma ave na região amazônica, desconhece-se a doença humana causada por este vírus (FIGUEIREDO, 2000). Segundo estudos realizados por KUNO et al. (1998), BATISTA et al. (2001) e BALEOTTI et al. (2003) este vírus está intimamente relacionado com o vírus da Encefalite Japonesa, causando encefalite em humanos e animais.

O vírus Iguape (IGUV) foi isolado, em 1979, a partir de camundongo sentinela exposto à picada de artrópodes na Mata Atlântica do município de Iguape, São Paulo, (COIMBRA et al., 1999). Antigenicamente foi classificado como

integrante do Grupo B, sendo, portanto um flavivírus. Nenhum caso de infecção humana foi associado ao vírus até o momento (FIGUEIREDO, 2000; ICTV, 2005).

Anticorpos inibidores da hemaglutinação, monotípicos para o vírus Iguape, foram detectados em animais domésticos e silvestres na Região do Vale do Ribeira/SP. Anticorpos monotípicos têm sido também detectados em soros humanos, embora não haja evidência de doença clínica. Uma cepa de vírus foi obtida a partir de mosquitos *Na. cruzii* (BOCATO-CHAMELET et al, 2001).

2.3.3 Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae*, possui o maior número de vírus que afeta os animais, abriga centenas de espécies virais isoladas principalmente de insetos. É composto por vírions grandes e tem como genoma três moléculas de RNA de polaridade negativa. A maioria desses vírus foi isolada de insetos e vertebrados, sem estarem necessariamente associados a doenças (MERTZ, 1997; VOGEL, 2007).

Essa família possui cinco gêneros, compostos por mais de 300 vírus diferentes: *Orthobunyavirus*, *Phebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Tospovirus* (vírus de plantas). Com exceção dos hantavírus, os outros gêneros são arbovírus (FIGUEIREDO, 1999; TESH & VASCONCELOS, 2006; VOGEL, 2007).

Pelo menos 41 desses vírus têm sido associados com doenças humanas nos trópicos. Dentre estes, alguns produzem doenças severas e por vezes fatais o que ocorre, por exemplo, nas infecções pelo vírus da febre do Vale Rift, pelo vírus da febre hemorrágica do Congo e da Criméia e pelo vírus La Crosse da encefalite da Califórnia (MANGIAFICO et al., 1988; MERTZ, 1997; TESH & VASCONCELOS, 2006). Os outros bunyavirus patogênicos para humanos produzem doenças febris inespecíficas. Devido à sua natureza não-específica e a limitada capacidade de diagnóstico dos vírus em muitos países tropicais, essas infecções são frequentemente confundidas com outras doenças febris comuns como a malária ou dengue (TESH & VASCONCELOS, 2006).

A patogenia desses vírus varia, uma vez que existem diferentes grupos de vírus dentro da mesma família, mas geralmente a inoculação do agente com a

picada do inseto vetor determina uma viremia passageira, e a replicação e amplificação do vírus ocorre nos órgãos-alvo, que varia conforme o Bunyavirus. A patogenicidade e virulência também variam com o tipo de vírus (FIGUEIREDO, 1999; VOGEL, 2007).

O vírus Oropouche (OROV) é o principal bunyavírus causador de enfermidades em humanos com perfil epidêmico e com elevada capacidade de disseminação encontrada em nosso meio (VASCONCELOS, 2009).

Segundo PINHEIRO et al. (1962), o vírus foi isolado pela primeira vez na Região Amazônica, em 1960, a partir do sangue de uma preguiça (*Bradypus trydactylus*) capturada em uma área silvestre e de um lote de mosquitos *Ae. serratus*. No ano seguinte, a doença foi detectada em Belém/PA, ocasião em que o vírus causou uma grande epidemia, na qual cerca de 11.000 pessoas foram afetadas pela doença.

No Brasil, do ponto de vista clínico e epidemiológico, o OROV é o mais importante e está associado a epidemias na Região Amazônica, onde é superado somente pelo DENV. Ele infecta primariamente humanos, que apresentam febre, cefaléia, mialgias, artralgias, anorexia, tonturas, calafrios e fotofobia. Este vírus se mantém na natureza através do ciclo silvestre e urbano (VOGEL, 2007).

No ciclo silvestre, preguiças, macacos e aves são os hospedeiros vertebrados e o *Ae. serratus*, *Cx. quinquefasciatus* e *Culicoides paraensis* (maruim). No ciclo urbano, o vírus é transmitido de pessoa a pessoa por meio da picada do *Culicoides paraensis*, amplamente disseminado em áreas tropicais e subtropicais das Américas (DEGALLIER et al., 1989; VASCONCELOS et al., 1992; PINHEIRO, 1997).

O OROV está amplamente distribuído em vários estados amazônicos, incluindo o Acre (1996), Amapá (1981), Amazonas (1981), Rondônia (1991) e Tocantins (1988). Em 1988 foi observado no Maranhão, em um primata em Minas Gerais e em outros países, como Peru e Panamá. Além disso, entre 1980 e 2005, casos esporádicos ou pequenos surtos auto-limitantes têm sido relatados na região amazônica do Brasil e na região peruana de Iquitos. Mais recentemente, em 2006, com base na positividade para o OROV obtida por sorologia, isolamento de vírus e detecção do genoma viral por PCR, a incidência estimada para infecção por pelo

OROV foi de 76,9% em Magalhães Barata/PA e 73,3% na área rural de Maracanã/PA, indicando pelo menos 18.000 casos de infecções por OROV (NUNES et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2009). Além disso, estudos realizados em Juriti/PA entre 2006 e 2007, por CRUZ et al.(2009) demonstraram uma incidência de 1,5% (23/1597) em soro de humanos que indicou que houve circulação ativa do OROV no período do estudo, provavelmente sob forma de um micro surto.

O *bunyavirus* Maguari (MAGV) pertence ao sorogrupo Bunyamwera, tem hospedeiros de hábitos diurnos (*Ae. scapularis*, *Ae. serratus*, *Ae. fulvus* e *Ps. ferox*) e de hábitos noturnos (*An. nuneztovari* e *An. triannulatus*). Cavalos apresentando anticorpos para o MAGV foram descritos na Região do Pantanal (VASCONCELOS et al., 1992; IVERSON et al, 1993; FIGUEIREDO, 1999).

Segundo FIGUEIREDO (1999), o vírus Tacaiúma (TCMV) pertencente ao grupo sorológico Anopheles A, já foi isolado de seres humanos, macacos, animais sentinela e de mosquitos *Haemagogus*, *Ae. triannulatus* e *Anopheles cruzii*, vetores deste vírus na Região Amazônica e em São Paulo. Também já foi isolado de um paciente apresentando quadro febril em São Paulo. Além disso, já foram detectados anticorpos inibidores da hemaglutinação para Tacaiúma em um morador de zona rural de Ribeirão Preto/SP e em cavalos na Região do Pantanal (IVERSSON et al., 1993; IVERSSON, 1994).

Por fim, fica assim demonstrado a diversidade de arbovírus existentes em nosso meio que acometem humanos e animais vertebrados, apresentando diferentes manifestações clínicas de gravidade variadas, além da complexidade de vetores e reservatórios envolvidos nos ciclos de transmissão e o efeito das ações antrópicas, caracterizando, desta forma, a importância destas arboviroses para a saúde pública e animal.

REFERÊNCIAS

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonoses y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Volume II – Clamidirosis, rickettsiosis y virosis. Organización Panamericana de Saúde. Publicacion Cientifica y Tecnica. n.580. Washington/DC, EUA. 3 ed. 425p. 2003.
2. ANDERSON, C.R.; DOWNS, W.G.; WATTLE, G.H.; AHN N.W.; REESE, A.A. Mayaro virus: a new human disease agent. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n.6, p.1012, 1957.
3. BALEOTTI, F.G.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian *Flavivirus* phylogeny based on NS5. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 98, n.3, p. 379-382. abril. 2003.
4. BATISTA, W.C.; KASHIMA, S.; MARQUES, A.C.; FIGUEIREDO, L.T.M. Phylogenetic analysis of Brazilian *Flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3'non-coding regions. 2001. **Virus Research**. Londres, n.75, p. 35-42, 2001.
5. BECKWITH, W.H.; SIRPENSKI, S.; FRENCH, R.A.; NELSON, R.; MAYO, D. Isolation of eastern equine encephalitis virus and West Nile virus from crows during increased arbovirus surveillance in Connecticut, 2000. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; v.66, n. 4; p.422-426, abril, 2002.
6. BERAN, W. G.; STEEEE, J. H. Handbook of zoonoses. Section a: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic. Boca Raton: CRC Press, 545 p. 1994.
7. BERNKOPF, H.; LEVINE, S.; NERSON, R. Isolation of West Nile virus in Israel. **Journal Infectious Diseases**. v.93, n.3, p. 207-218. 1953.
8. BERTONE, J.J.. Encefalite causada por Togavírus. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. c. 9, p. 432- 436. 2000.
9. BISSORDI, I.; SUZUKI, A.; LIMA, L.B.Q.; PEREIRA, L.E.; SOUZA, R.P.; PETRELLA, S.M.C.N. et al. Saint Louis Encephalitis virus: High prevalence of antibodies in wild birds, Iguape – São Paulo State, Brazil, 2005-2006. **Journal of the Brazilian Society for Virology**. n.11 (suppl.01); p.129. 2006.

10. BLOOD, D.C. Patologia do Sistema Nervoso. **Clínica Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. c. 10, p. 761-767. 1991.
11. BOCATO-CHAMELET, E.I.; COIMBRA, T.L.M.; NASSAR, E.S.; PEREIRA, L.E.; FERREIRA, I.B.; SOUZA, L.T.M.; SUZUKI, A.. Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Juquitiba - Estado de São Paulo – Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.60, n.1, p.65-69, 2001.
12. BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO, J.C.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A.E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER, L. West Nile Virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases** v. 13, n.4, p. 651-563, abril 2007.
13. BRASIL. Esclarecimentos sobre a Febre do Nilo Ocidental, a detecção de anticorpos em animais e as recomendações para a Vigilância no Brasil – agosto de 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica N.º 28/2011-CGDT/DEVEP/SVS/MS. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_28_2011_febre_do_nilo_2011_revisada_2.pdf. Acessado em 02.10.2011.
14. BRASIL. Febre do Nilo Ocidental. Guia de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. Série A, Normas e Manuais Técnicos. 7 ed. Caderno 9, p.43-48. 2010.
15. BRUNO-LOBO, G.; BRUNO-LOBO, M.; TRAVASSOS, J.; PINHEIRO, F.; PAZIN, I.P. Estudos sobre arbovírus. III. Isolamento de vírus sorologicamente relacionado ao sub-grupo Western - Sindbis de um caso de encefalomielite equina no Rio de Janeiro. **Annals of Microbiology**; v.9, p.183-195. 1961.
16. BUNNING, M.L.; BOWEN, R.A.; CROPP, C.B.; SULLIVAN, K.G.; DAVIS, B.S.; KOMAR, N.; GODSEY, M.S.; BAKER, D.; HETTLER, D.L.; HOLMES, D.A.; BIGGERSTAFF, B.J.; MITCHELL, C.J. Experimental infection of horses with West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.380-386, 2002.
17. BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. IN: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields virology**. V.1-2. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1043-1125. 2001.

18. CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; FOSTER, J.P.; PALLANSCH, M.; ROEHIG, J.T. Identification of a new antigenic subtype of Eastern equine encephalitis virus isolated from a human. **Journal of Clinical Microbiology**; v.28; n. 2; p-373-374. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269613/pdf/jcm00050-0223.pdf>. Acessado em 19.10.2011.
19. CALISHER, C.H.; LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.; FRANCY, D.B.; JAKOB, W.L.; MONATH, T.P. Isolations of new Alpha and Bunyaviruses of Southern Brazil: proposed reclassification of serogroups. In: Anais do Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas; 1980. **Academia Brasileira de Ciências** Rio de Janeiro; p. 355-62. 1982.
20. CALISHER, C.H.; SHOPE, R.E.; BRANDT, W.; CASALS, J.; KARABATSOS, N.; MURPHY, F.A.; TESH, R.B.; WIEBE, M.E. Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togaviridae*, Alphavirus. **Intervirology**, **14**: 229-232, 1980.
21. CALISHER, C.H.; MONATH, T.P.; MITCHEL, C.J.; SABATTINI, M.S.; CROPP, C.B.; KERSCHNER, J.; HUNT, A.R.; LAZUICK, J.S. Arbovirus investigations in Argentina, 1977 -1980. III. Identification and characterization of viruses isolated, including new subtypes of western and Venezuelan equine encephalitis viruses and new Bunyaviruses (LasMaloyas, Resistencia, Barranqueras and Antequera). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34. p.956-965, 1985.
22. CASALS, J. The arthropod-borne group of animal viruses. Trans. N.Y: **Academia de Ciência**, ser. 2, n. 19, p. 219-235. 1957.
23. CAUSEY, C.E.; CAUSEY, O.R. The arthropod-borne viruses of Brazil in relation to world group. Revista do serviço Especial de Saúde Pública. 1962. v. 12; n. 1; p.9-13. In: **Memórias do Instituto Evandro Chagas**. Série: Produção Científica, v.7. Belém: Gráfica Rápida Ltda. p. 89-93. 2002.
24. CDC Technical Fact Sheet: Eastern Equine Encephalitis [editorial]. CDC Division of vector. Borne Infectious Diseases, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/EasternEquineEncephalitis/tech/factSheet.html>. Acessado em 12.06.2011.

25. CDC Technical Fact Sheet: Saint Louis Encephalitis Home [editorial]. CDC Division of vector. Borne Infectious Diseases, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/sle/technical/fact.html>. Acessado em 12.06.2011.
26. CHADWICK, D.R. Viral meningitis. **British Medical Bulletin**; n.75/ 76: p.1-14. 2005.
27. CHAMELET, E.L.B.; PEREIRA, L.E.; NASSAR, E.S.; SUZUKI, A.: assive presence of Ilheus vírus in *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, São Paulo State, Brasil (abstracts). **14th International Congress Tropical Medicine of Malaria**, Nagasaki, 1996.
28. CHARREL, R.N.; LÉVY, N.; TESH, R.B.; CHANDLER, L.J. Use of base excision sequence scanning for detection of genetic variations in St. Louis Encephalitis virus isolates. **Journal Clinnical Microbiology**. v. 37; n.6; p.1935-1940. 1999.
29. CHOMEL, B.B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F.X. Wildlife, Exotic Pets, and Emerging Zoonosis. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.1, January, 2007.
30. COIMBRA, T.L., NASSAR, E.S., NAGAMORI, A.H., FERREIRA, I.B., PEREIRA, L.E., ROCCO, I.M., UEDA-ITO, M., ROMANO, N.S. Iguape: anewly recognized flavivirus from São Paulo State, Brazil. **Intervirolgy**, v.36, n.3; p.144-152, 1999.
31. COIMBRA, T.L.; SANTOS, C.L.; SUZUKI, A.; PETRELLA, S.M.; BISORDI, I.; NAGAMORI, A.H.; MARTI, A.T.; SANTOS, R.N.; FIALHO, D.M.; LAVIGNE, S.; BUZZAR, M.R.; ROCCO, I.M. Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo. v.49, n.4, p.221-224. 2007.
32. CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Encefalomielite Eqüina. **Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro; Ed. MEDSI, c. 70. p. 635-641. 1992.
33. CRUZ, A.C.R.; PRAZERES, A.S.C.; GAMA, E.C.; LIMA, M.F.; AZEVEDO, R.S.S.; CASSEB, L.M.N.; NUNES NETO, J.P.; MARTINS, L.C.; CHIANG, J.O.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25,n.11, p.:2517-2523, novembro, 2009.

34. DAM, E.; FLINT, M.; RYAN, M. D. Virus-encoded proteinases of the *Togaviridae*. Review Article. **Journal of General Virology**, n.80, p.1879–1888.1999. <http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/80/8/1879.pdf>. Acessado em 06.01.2011
35. DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; HERVÉ, J.P.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; SÁ FILHO, G.C.; PINHEIRO, F.P. Modifications of arbovirus ecoepidemiology in Tucuruí, Pará, Brazilian Amazonia, related to the construction of a hydroelectric dam, p.124-135. **In: Arbovirus Research in Australia Proceedings Fifth Symposium**, August 28 - September 1, 1989, Brisbane, Australia. Eds. M.F. Uren, J. Blok 62 LH. Mandemon, CSIRO Tropical Animal Science, Brisbane. 393 p. 1989.
36. DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; SILVA, J.M.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; SILVA, G.P.; SILVA, R.P. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu do Pará Emílio Goeldi**, Série Zoo, v. 8, n. 1, p.69-111. 1992.
37. DIAZ, L.A.; KOMAR, N.; VISINTIN, A.; JURI, M.J.D.; STEIN, M.; ALLENDE, R.L.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W.; CONTIGIANI, M. West Nile Virus in Birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n.4, abril, 2008. Disponível em: www.cdc.gov/eid. Acessado em 25 de maio de 2011.
38. DIAZ, L.A.; RÉ, V.; ALMIRÓN, W.R.; FARÍAS, A.; VÁZQUEZ, A.; SANCHEZ-SECO, M.P.; et al. Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina. **EID**. 2006; v.12, n.11; p.1752-1754. 2005.
39. 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. p.1259. 2005.
40. FERNÁNDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.
41. FERREIRA, I.B.; PEREIRA, L.E.; ROCCO, I.M.; MARTI, A.T.; SOUZA, L.T.M.; IVERSSON, L.B. Vigilância de infecções por arbovírus na Região da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil. I. Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação em aves silvestres entre 1978 e 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**

de São Paulo. v.36; n.3. São Paulo. Maio-Junho 1994. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003646651994000300011&script=sci_arttext.

Acessado em 19.06.2011.

42. FIGUEIREDO, L.T.M. Arboviroses Emergentes no Brasil. Artigo de Opinião. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.2, p.224-229, março-abril, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n2/a16v40n2.pdf>. Acessado em: 28.08.2011.

43. FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian Viruses in the Family *Bunyaviridae*. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 154-158, 1999.

44. FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, n.2; p.1643-1649, 2000.

45. FILIPE, A.R.; PINTO, M.R. Survey for antibodies to arboviroses in serum of animals from southern Portugal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.18, n.3, p. 423-426. 1969.

46. FLORES, E. F.. Classificação e Nomenclatura dos Vírus. **Virologia Veterinária**. Santa Maria : Ed. da UFSM, p.888. 2007.

47. FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. O vírus do Nilo Ocidental. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.604-612, mar-abr, 2009.

48. GOLD, E.A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. Elsevier. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. n. 103. P.109-121, 2009.

49. GOMES, C.A. Medidas dos Níveis de Infestação Urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. IESUS, v. VII, n.3, jul-set. 1998. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/iesus_vol7_3_medidas.pdf. Acessado em: 27 de agosto de 2011.

50. GONZALEZ-SALAZAR, D.; ESTRADA-FRANCO, J.G.; CARRARA, A.S.; ARONSON, J.F.; WEAVER, S.C. Equine Amplification and Virulence of Subtype IE Venezuelan Equine Encephalitis Viruses Isolated during the 1993 and 1996 in Mexican Epizootics. **Emerging Infectious Diseases**; v.9, n.2, p.161-168. 2003.

51. GOULD, E.A.; DE LAMBALLERIE, X.; ZANOTTO, P.M.; HOLMES, E.C. Origins, evolution, and vector/host co adaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, **59**: 277-314, 2003.
52. GUBLER, J.D. Resurgent vector-borne: Diseases as a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**. v.4, n.3, july-september, 1998.
53. GUBLER, D.J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. **In**: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1153-252. 2007.
54. HAYES, E.B.; KOMAR, N.; NASCI, R.S.; MONTGOMERY, S.P.; O'LEARY, D.R.; CAMPBELL, G.L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p.1167-1173, 2005.
55. HERVÉ, J.P.; DEGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G.C. Arboviroses: Aspectos ecológicos, p. 409-437 **In**: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical, v. 1. Ed. Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém, 529 p. 1986.
56. HOCH, AL.; PETERSON, N.E.; LEDUC, J.W.; PINHEIRO, F.P. An outbreak of Mayaro, virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.30, n.3, p. 689-698. 1981.
57. ICTV. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Virus. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Virus **In**: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A., MANILOFF, J.; DESSEBERGER, U.; BALL, L.A. (eds), San Diego: **Elsevier Academic press**, p. 981-998. 2005.
58. IVERSSON, L.B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na Região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Revista de Saúde Pública**. n.14, p.9-35, 1980.
59. IVERSSON, L.B. Rocio Encephalitis, **In**: The arboviruses: Epidemiology and ecology. MONATH, T.P, ed, CRC Press, Boca Raton, USA, p.14. 1988.
60. IVERSSON, L.B. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico, sobre arbovírus patogênicos para o homem na Região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, n. 36, p.343-353, 1994.

61. IVERSSON, L.B., SILVA, R.A.M.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., BARROS, V.L.R.S. Circulation of Eastern Equine Encephalitis, 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**, São Paulo, n. 35, p. 355-359, 1993.
62. IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; RODRIGUES, S.G.; ROSA, M.D.B. Human disease caused by Venezuelan equine encephalitis sub-type IF in Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. In: Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; New Orleans, USA, p.143. 1990
63. 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**, São Paulo, v.31, n.1, p.28-31. 1989
64. IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.; COSTA, C.S. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população da região do Vale do Ribeira. III Inquérito em cohabitantes com casos de encefalite por Flavivírus Rocio. **Revista de Saúde Pública**; n.16, p.160-170. 1982.
65. KARABATSOS, N. International catalogue of arboviroses and certain other viroses of vertebrates. 3 ed. San Antonio, USA. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1147p. 1985.
66. KIRCHNER, E. Virologia. Ed. da Universidade de São Paulo. p.77-79. São Paulo. 1979.
67. KOMAR, N. West Nile virus: epidemiology, and ecology in North America. **Advances in Virus Research**, v.61, p.185-234, 2003.
68. KOMAR, N.; CLARK, G.G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.19, p.112-117, 2006.
69. KOTAIT, I.; BRANDÃO, P.E.; CARRIERI, M.L. Vigilância Epidemiológica das Encefalites Equinas. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo. Ano 3, n.29; Maio, 2006.
70. KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; COIMBRA, T. L. M.; CUNHA, E. M. S.; QUEIROZ, L. H; MACRUZ, R.; NAGAMORI, A. H. Isolamento e identificação do vírus

da encefalomyelite equina, tipo leste, em equinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.59, n.1/2, p.37-41, 1992.

71. KUBÉS, V., AND RIOS, F. The causative agent of infectious encephalomyelitis in Venezuela. **Science**, n.90, p.20-21. 1939

72. KUNO, G.; CHANG, G.J.J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n. 4. p. 608–637. Outubro, 2005. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/18/4/608>. Acessado em: 29.08.2011

73. KUNO, G.; CHANG, G.J.J.; TSUCHIYA, K.R.; KARABATSOS, N.; CROPP, B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of Virology** n.72, p.73-83. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109351/pdf/jv000073.pdf>. Acessado em 10.06.2011.

74. LaDEAU, L.S.; KILPATRICK A.M.; MARRA, P.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. **Nature**, v.447, p.710-713, 2007.

75. LAINE, M.; LUUKKAINEN, R.; TOIVANEN, A. Sindbis viruses and other alphaviruses as cause of human arthritic disease. **Journal of Internal Medicine**. n.256; p.457–471.2004.

76. LINDENBACH, D.B.; THIEL; H-J.; RICE, C.M. *Flaviviridae*: The viruses and their Replication In: **Fields Virology**. Knipe, D.M. & Howley, P.M. (eds), Philadelphia, USA, Wolters Kluwer Health. p.1101-1152. 2007.

77. LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.M.; SACCHETTA, L.A.; CALISHER, C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation and characterization of the etiologic agent, *Rocio virus*. **American Journal Epidemiology**.; v. 107, p.444-449.1978.

78. MANGIAFICO J.A.; SANCHEZ, J.L.; FIGUEIREDO, L.T.; LEDUC, J.W.; PETERS, C.S.. Isolation of a newly recognized Bunyamwera serogroup virus from a febrile human in Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.39, p.593-596, 1988.

79. MARTÍNEZ, L.A.D.; MANRIQUE, F.M.C.; MUÑOZ, G. Apuntes para el desarrollo de sistemas de vigilancia para la detección precoz del Virus del Oeste del Nilo. **Asociación Colombiana de Infectología. Infectio**. v. 6, n.4, p.226-234. 2002.
80. MATTAR, S.; EDWARDS, E.; LAGUARDO, J.; GONZALEZ, M.; ALVAREZ, J.; KOMAR, N. West Nile Virus Antibodies in Colombian Horses. **Emerging Infectious Diseases** v. 11, n.9, p. 1497, september 2007.
81. MEDEIROS, D.B.A. Caracterização molecular e relação filogenética do genoma completo dos arbovírus Bussuquara, Iguape, Ilhéus e Rocio (família *flaviviridae*, gênero *flavivirus*). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Belém, 219p. 2009.
82. MERTZ; G.J. *Bunyaviridae*: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. *In*: RICHMAN, D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN, F.G. Eds. Clinical virology, Churchill-Livingstone, New York, p. 943-972, 1997.
83. MITCHELL, C.J.; FORATTINI, O.P. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.21, n.1, p.34-37. 1984.
84. MITCHELL, C.J.; FORATTINI, O.P.; MILLER, B.R.. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n.3, p.171-177. 1986.
85. MITCHELL, C.J.; MONATH, T.P.; CROPP, C.. Experimental transmission of Rocio virus by mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, n.2, p.465-472. 1981.
86. MORALES, M.A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, G.B.; VISSANI, A.; TRONO, K. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases** v.12, p.1559–1561. 2006.
87. MORENS, D.M.; FOLKERS, G.K.; FAUCI, A.S. Emerging infections: a perpetual challenge. National Institute of Health. **Lancet Infect Disease**. v.8, n. 11, p.710-719; november, 2008.
88. NASH, D.; MOTASHARI, A.; FINE, A.; MILLER, J.; O'LEARY, D.; MURRAY, K. Outbreak of West Nile virus infection, New York City Area, 1999. **The New England Journal Medicine**. n.344; p. 1807-1814, 2001.

89. NASSAR, E.S.; COIMBRA, T.L.M.; ROCCO, I.M.; PEREIRA, L.E.; SOUZA, L.T.M. SOUZA, D.M. UEDA-ITO, M.MOURA, J.P. BERGO, R.C.F. BERGO. Human Disease Caused by an Arbovirus Closely Related to Ilheus Virus: Report of Five Cases. **Intervirology**; n.40, p.247-252. 1997.
90. NEE, J.V.; ANDRADE, A.H.; BROWN, G.E.; EVELAND, W.E.; GOOBAR, J.; SODEMAN, W.A.; STOLLERMAN, G.H.; WEINSTEIN, E.D.; WHEEER, A.H. Further studies of the Xavante Indians. IX: Immunologic status with respect to various diseases and organisms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; v.17, n.3; p.486-498. 1968.
91. NUNES, M.R.; MARTINS, L.C.; RODRIGUES, S.G.; CHIANG, J.O.; AZEVEDO, R.D.O. S, DA ROSA A.. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**.n.11, p.1610–1613. 2005.
92. OLITSKY, P.K.; CASALS, J. Arthropod-borne group A virus infections of man. In: RIVERS, T.M.; HORSFALL, F.L. ed. *Viral and rickettsial infections of man*. 3 ed. Philadelphia, Lippincott. p. 286-304. 1959.
93. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Virosis transmitidas por artrópodos e roedores*. Informes técnicos. 1985; n. 719, p.126.
94. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). *Importancia de las virosis transmitidas por artrópodos y roedores para la salud pública en las Américas*. **Boletim Epidemiológico**. v. 4; n. 3; 4 p.; 1983.
95. OSTLUND, E.N.; CROM, R.L.; PEDERSEN, D.D.; JOHNSON, D.J.; WILLIAMS, W.O.; SCHMITT, B.J. Equine West Nile encephalitis, United States. **Emerging Infectious Diseases**; v.7, n.4, 665-669. 2001.
96. PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M.A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; NOGUEIRA, M.F.; SILVA, E.E.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n.4, p.467-474, June, 2011.
97. PAUVOLID-CORRÊA, A.; VARELLA, R.B. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.11, n.3, p.463-72. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v11n3/12.pdf>. Acessado em 06.06.2011.

98. PEREIRA, L.E.; SUZUKI, A; COIMBRA, T.L.M.; SOUZA, R.P.; CHAMELET, E.L.B. Arbovírus Ilhéus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). **Revista de Saúde Pública**. v.35, n.2, p.119-123. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v35n2/4394.pdf>. Acessado em 24 de setembro de 2011.
99. PETERSEN, L.R.; ROEHRIG, J.T. West Nile virus: a reemerging global pathogen. **Emerging Infectious Diseases**. 2001; v.7, p.611–614. *In*: Revista Panamericana de Salud Publica/Pan Am J Public Health, v. 10, n.3, p.184-185. 2001.
100. PFEFFER, M.; DOBLER, G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasites & Vectors**, p. 3-35. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868497/pdf/1756-3305-3-35.pdf>. Acessado em 23.10.2011.
101. PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W. Epidemiology of arthropod-borne diseases. *In*: MONATH, T.P.. Ed. CRC. 1986.
102. PINHEIRO, F.P.; FREITAS, R.B.; ROSA, J.F.T.; GABBAY, Y.B.; MELLO, W.A.; LE DUC, J.W. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n. 30, p.674-681.1981.
103. PINHEIRO, F.P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O.R.; SHOPE, R. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v.12, n.1, p.13-23, 1962.
104. PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FREITAS, R.B.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses: Aspectos Clínico-epidemiológicos, 375-408. *In*: Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical, v. 1. Ed. Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém, 529 p. 1986.
105. PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Febre por Oropouche. *In*: Leão, R.N.Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP, p.285-298, 1997.
106. PRIAS-LANDINEZ, E.; BERNAL-CUBIDES, C.; MORALES-ALARCÓN, A. Isolation of Ilheus virus from man in Colombia. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. n. 17, p.112-114, 1986.

107. REISEN, W.K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. **Advances in Virus Research**. v.61; p.139-183. Review. 2003.
108. RICE, C.M. *Flaviviridae*: The viruses and their replication. In: Fields Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM [editores]. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; p.931-959. 1996.
109. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**, 3ª Ed. Santa Maria: Palotti, v.1. p. 103-106. 2007.
110. 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: first virus isolation from human in São Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo. n.47, p.281-285. 2005.
111. ROMANO-LIEBER, N.S.; IVERSSON, L.B. Inquérito soro-epidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista Saúde Pública**. São Paulo. v.34, n. 3, p.2362-42. 2000.
112. ROSEMBERG, S. Neuropathological study of a new viral encephalitis: the encephalitis of São Paulo South coast (preliminary report). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.19, p.280-282, 1977.
113. SANTOS, A.L.; ROMANO, A.P.M.; ELKHOURY, A.N.S.M.; ARAUJO, F.A.A. Epizootias em Equinos por Encefalite Equina do Leste e Inquérito Sorológico em Equinos para Detecção de Anticorpos “Anti-Encefalite Equina do Leste” - Paraíba/2009. [Poster] **Anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. MEDTROP2011. Natal, 2010.
114. SCHATZMAYR, H.C.; BARTH, O.M. Características gerais dos vírus patogênicos para o homem. **In**: COURA, J.C. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. v 2. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan; p. 1645-1660. 2005.
115. SCOTT, B., JACOBSON, J. Japanese Encephalitis. In: **Advances in Virus Research**. MARAMOROSHCH, K., MURPHY, F.A. SHATKIN, A.J. (eds). San Diego, **Academic Presss**, p. 103-138. 2003.
116. SELLON, D.C.; LONG, M.T. Equine Alphaviruses. *Equine Infectious Diseases*. Section II. Viral Diseases. Saunders Elsevier. Philadélfia. p. 191-197. 2007.

117. 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. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 1964; v. 13; n.5; p. 723-727. In: **Memórias do Instituto Evandro Chagas**. Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; p 191-202. 2002.
118. SILVA FILHO, F.A.B. Encefalite Equina Viral: Relato de Caso. Monografia (Especialista). Faculdade de Jaguariúna. 27 p. 2007.
119. SPINSANTI LI, GLATSTEIN N, ARSELÁN S, DIAZ LA, RÉ V, AGUILAR J. Aspectos clínico-epidemiológicos de un brote por *Flavivirus* detectado en Córdoba, Argentina en el año 2005. **Revista Argentina de Microbiología**. 2005; v.7 (Suppl.1), p. 27. 2005.
120. STRAATMANN, A.; SANTOS-TORRES, S.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G.; TAVARES-NETO, J. Evidências Sorológicas da Circulação do Arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.30, n.6, p. 511-515, Uberaba, Nov./Dec. 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86821997000600012&script=sci_arttext. Acessado em 24 de setembro de 2011.
121. TAVARES-NETO, J.; ROSA, A.P.A.T, VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, J.F.S.T.; MARSDEN, P.D. Pesquisa de anticorpos para arbovírus no soro de residentes no povoado de Corte da Pedra, Valença, Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.81, n.4; p.351-358. 1986.
122. TAYLOR, R.M.; WORK, T.H.; HURLBUT, H.S.; RIZK, F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. v.5, n.4, p. 579-620. 1956.
123. TESH, R.B.; VASCONCELOS, P.F.C.. Sandfly Fever, Oropouche Fever, and Other Bunyavirus Infections. **In**: GUERRANT, R.L.; WALKER, H.D.; WELLER, F.P. *Tropical Infectious Diseases: principles pathogens and practice*. Ed.3, chapter 72, 2006.
124. THEILER, M.; DOWNS, W.G. The arthropod-borne viroses of vertebrates. New Haven, Yale University Press, 1973.

125. THOMASSIAN, A. *Enfermidades Infecciosas. **Enfermidades dos Cavalos.*** São Paulo: Varela, 1996. c. 17. p. 598-599.
126. TORRES, J.R.; RUSSEL, K.L.; VASQUEZ, C.; BARRERA, R.; TESH, R.B. Family Cluster of Mayaro Fever, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases.** v.10, n. 7, July, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol10no7/pdfs/03-0860.pdf>. Acessado em: 22.07.2011
127. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., PINHEIRO, F.P., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico.** LEÃO, R.N.Q. (ed.). Belém: CEJUP: UEPA: Instituto Evandro Chagas, p. 207-225. 1997.
128. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; SHOPE, R.E.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; NAKAUTH, C.; VASCONCELOS, P.F.C.. Arboviroses: aspectos virológicos, 365-373. *In:* Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical, v. 1. Ed. Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém, 529 p. 1986.
129. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P.; VASCONCELOS, P.F.C. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico.** Belém: Editora CEJUP; 1996.
130. TSAI, T.F.; MITCHELL, C.J. St. Louis Encephalitis. In: Monath TP [editor]. The arboviruses: Epidemiology and Ecology. Florida: **CRC Press.**; v.IV, p.113-144. 1988.
131. VASCONCELOS, H.B.; AZEVEDO, R.S.S.; CASSEB, S.M.; NUNES-NETO, J.P.; CHIANG, J.O.; CANTUÁRIA, P.C.; SEGURA, M.N.O.; MARTINS, L.C.; MONTERITO, H.A.O.; RODRIGUES, S.G.; NUNES, M.R.T., VASCONCELOS, P.F.C. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology** n.44, p. 129–133. 2009.
132. VASCONCELOS, P.F. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. **Ciência e Cultura** n.44, p.117-124, 1992.
133. VASCONCELOS, P.F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; DEGALLIER, 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**; v.33: p.465-476. 1991.

134. VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., PINHEIRO, F.P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura** (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science), n.44: p.117-124, 1992.
135. 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, 1988-1999: Entomologic and epidemiologic findings. **Emerging Infectious Diseases**. v. 7; n. 3; p. 565-569, 2001.
136. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses Pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p.72-99, 1998.
137. VOGEL, F.S. *Bunyaviridae*. In: FLORES, E. F.. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, p. 757-777. 2007.
138. WARD, M.P.; SCHUERMANN, J.A.; HIGHFIELD, L.D.; MURRAY, K.O. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.255-259, 2006.
139. WEAVER, S.C.; REISEN, W.K. Present and Future Arboviral Threats. National Institutes of Health. **Antiviral Research**. 2010 February; v. 85, n.2, p. 1-36. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815176/>. Acessado em: 20.08.2011.
140. WEAVER, S.E.; FERRO, C.; BARRERA, R.; BOSHELL, J.; NAVARRO, J.C. Venezuelan equine encephalitis. **Annual Review Entomology**; n.49, p.141-174. 2004.
141. ZEINAD, A.K.; NOVARETTI, M.C.Z.; CHAMONE, D.A.F. Vírus do Nilo ocidental: Nova ameaça à segurança transfusional?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**; v.26, n.2; p.114-121. 2004.

142. ZELLER, H.G.; KARABATSOS, N.; CALISHER, C.H.; DIGOUTTE, J.P.; CROPP, C.B.; MURPHY, FA.; SHOPE, R.E. **Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses**. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family *Bunyaviridae*. **Archives of Virology**, v. 108; n.3-4, p. 211-227. 1989.

CAPÍTULO 2

SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-ALFAVÍRUS EM EQUÍDEOS EM UM SURTO DE ENCEFALITE EQUINA, PARAÍBA, 2009

SEROPREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST ALPHAVIRUSES IN HORSES DURING AN OUTBREAK OF EQUINE ENCEPHALITIS IN PARAIBA STATE, BRAZIL, 2009

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para alfavírus em equinos investigados durante um surto ocorrido na Paraíba, em 2009, bem como comparar os resultados obtidos para o vírus da Encefalite Equina do Leste mediante uso das técnicas de inibição de hemaglutinação e de soroneutralização em microplacas. Foi realizada coleta de sangue em 188 equídeos, distribuídos em 15 municípios da região oeste da Paraíba, onde existia relato de doença e/ou morte de equinos. Observou-se uma prevalência pré-teste de Encefalite Equina do Leste de 11,7%, prevalência real de 62,2% e prevalência aparente de 54,2%. Quando comparados os resultados obtidos no teste de inibição de hemaglutinação com o de soroneutralização, encontrou-se uma sensibilidade de 79,5% e especificidade de 87,3% no primeiro teste. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 91,2% e 72,1%, respectivamente. O estudo revelou um grande número de animais infectados e sem manifestação clínica aparente. Os resultados do teste de inibição de hemaglutinação foram capazes de confirmar a epizootia na área e demonstram que esta técnica pode ser recomendada como de triagem em inquéritos sorológicos desta natureza pela elevada sensibilidade e especificidade do teste.

PALAVRAS-CHAVE: Epizootia; Encefalitogênica; Soroneutralização.

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the prevalence of hemagglutination-inhibition antibodies against alphaviruses in horses investigated during an outbreak occurred in Paraíba state, in 2009, and to compare the results obtained for the Eastern Equine Encephalitis (EEE) virus using the techniques of hemagglutination inhibition and serum neutralization in microplaques. Blood of 188 horses was collected in 15 municipalities from the western region of Paraíba state, where there were reports of illness and/or death of horses. The pre-test prevalence of EEE was 11.7%, while the real (serum neutralization) and the apparent (HI) prevalences were 62.2% and 54.2%, respectively. Comparing the results obtained from the HI and serum neutralization techniques, HI test presented 79.5% sensitivity and 87.3% specificity. The positive and negative predictive values were 91.2% and 72.1%, respectively. The investigation has shown a large number of infected animals without apparent clinical manifestations. The results of HI test confirmed the EEE outbreak in the area, and qualified the use of this technique for screening in serological surveys of equine encephalitis due to its high sensitivity and specificity.

KEYWORDS: Epizootic; Encephalitogen; Neutralization;

1 INTRODUÇÃO

A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus*. O gênero *Alphavirus* é de interesse para a arbovirologia e abrange aproximadamente 30 espécies, algumas das quais têm sido associadas com doenças em animais domésticos (equídeos e aves), silvestres (aves e mamíferos) e ocasionalmente em humanos. Os alfavírus possuem características estruturais e morfológicas em comum, são transmitidos por artrópodes e apresentam considerável relação antigênica (FLORES, 2007).

Devido ao potencial de causar doença encefalitogênica, os vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), da Encefalite Equina do Leste (EEEV) e o da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), são os alfavírus de maior interesse no estudo das arboviroses no Brasil (VASCONCELOS et al., 1991). Dentre estes, o EEEV é a que apresenta maior virulência e patogenicidade (ACHA & SZYFRES, 2003; ARRIGO et al., 2010). O EEEV tem os mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Culiseta* como vetores potenciais, equídeos e humanos como hospedeiros acidentais e como principais reservatórios as aves silvestres (FIGUEIREDO, 2007; RIET-CORREA et al., 2007).

O EEEV é mantido em um ciclo silvestre entre os mosquitos da espécie *Culiseta melanura* e aves que vivem principalmente em pântanos de água doce e troncos de madeira. Essa espécie não é um importante vetor do EEEV para o homem porque se alimenta quase exclusivamente de sangue de aves. A transmissão para humanos exige espécies de mosquitos capazes de criar uma "ponte" entre aves e mamíferos infectados, como algumas espécies de *Aedes*, *Coquillettidia* e *Culex* (CDC, 2010).

Esse vírus tem sido isolado em vários países das Américas, desde o Canadá até Argentina (MONATH et al., 1985). Muitos são os estudos sobre a ocorrência dos *Alphavirus* em equídeos no Brasil como os desenvolvidos por LOPES & SACHETA, 1974; KOTAIT et al., 1992; IVERSSON et al., 1993; VASCONCELOS et al., 1998; SILVA et al., 1999; HEINEMANN et al., 2006; CUNHA et al., 2009; CASSEB, 2010 e PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011. Entretanto alguns

estudos sobre vírus desta família consideram que o da EEE é o de maior endemicidade em várias regiões do País (IVERSSON & COIMBRA, 1984; VASCONCELOS et al., 1991; HEINEMANN et al., 2006). O EEEV é o único que tem sido esporadicamente isolado de animais com sintomatologia nervosa (NILSSON & SUGAY, 1962; KOTAIT et al., 1992; FIGUEIREDO, 2007).

Como grupo de risco para as Encefalites Equinas (EE) são consideradas especialmente as pessoas residentes e visitantes das áreas com presença do vírus, especialmente aquelas que trabalham ao ar livre ou que desenvolvem atividades de lazer nestas áreas. A forma severa da doença (encefalite) se manifesta especialmente em indivíduos com mais de 50 e menor de 15 anos de idade. A infecção pelo EEEV confere imunidade de longa duração contra a re-infecção (CDC, 2010).

Estudos realizados por BRAULT et al. (1999) e ARRIGO et al. (2010) sobre o EEEV demonstram que existem quatro linhagens genéticas distintas deste vírus: uma que circula na América do Norte e no Caribe e três que circulam na América Central e do Sul. Diferenças em suas patogenicidade, distribuição geográfica e perfis epidemiológicos foram observadas frente à sua diversidade genética e história evolutiva, levando os autores a propor que as variantes estudadas sejam reclassificadas como espécies distintas no complexo EEEV.

O método de diagnóstico mais empregado na investigação de eventos epidêmicos é a pesquisa de anticorpos mediante técnica sorológica como: de inibição de hemaglutinação (IH), teste de neutralização por redução de placas (PRNT) ou teste imunoenzimáticos (ELISA) (ACHA & SZYFRES, 2003; FLORES, 2007; RIET-CORREA et al., 2007).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para alfavírus nos equídeos das propriedades onde ocorreram as epizootias por EE na Paraíba, em 2009, bem como comparar os resultados obtidos para o EEEV mediante uso das técnicas de Inibição de Hemaglutinação e Soroneutralização em Microplacas, considerado padrão-ouro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

Foi realizado um estudo transversal, utilizando as amostras de sangue de 100% da população de equídeos existentes nas fazendas de ocorrência de epizootias. O material foi coletado entre maio e julho de 2009, em 15 municípios da região oeste da Paraíba, onde haviam ocorrido cinco epizootias pelo EEEV diagnosticadas por RT-PCR pelo Instituto Pasteur de São Paulo.

TABELA 1 - Número de animais que participaram do inquérito sorológico em equinos para diagnóstico da Encefalite Equina do Leste, por município, Paraíba/2009.

MUNICÍPIO	COORDENADAS GEOGRÁFICAS		Nº DE ANIMAIS
Belém do Brejo do Cruz	06°11'19"S	37°32'09"O	2
Brejo do Cruz	06°20'55"S	37°29'54"O	25
Cajazeirinhas	06°57'40"S	37°48'22"O	2
Condado	06°54'35"S	37°36'03"O	2
Coremas	07°00'52"S	37°56'45"O	5
Patos	07°01'28"S	37°16'48"O	9
Paulista	06°35'38"S	37°37'27"O	47
Piancó	07°11'53"S	37°55'45"O	1
Poço José do Moura	06°34'30"S	38°30'43"O	13
São Bentinho	06°54'04"S	37°43'45"O	6
São Bento	06°29'10"S	37°27'02"O	11
São Francisco	06°37'08"S	38°05'40"O	1
São João do Rio do Peixe	06°43'45"S	38°26'56"O	33
São José do Brejo do Cruz	06°12'46"S	37°21'08"O	30
Vista Serrana	06°44'18"S	37°34'00"O	1
TOTAL			188

Os animais viviam principalmente em pequenas propriedades da zona rural dos municípios da região. Algumas destas localidades faziam fronteira com o Ceará e o Rio Grande do Norte, nas quais também havia histórico de morte de

equinos com sintomatologia nervosa e epizootias comprovadas pelo EEEV (Figura1).

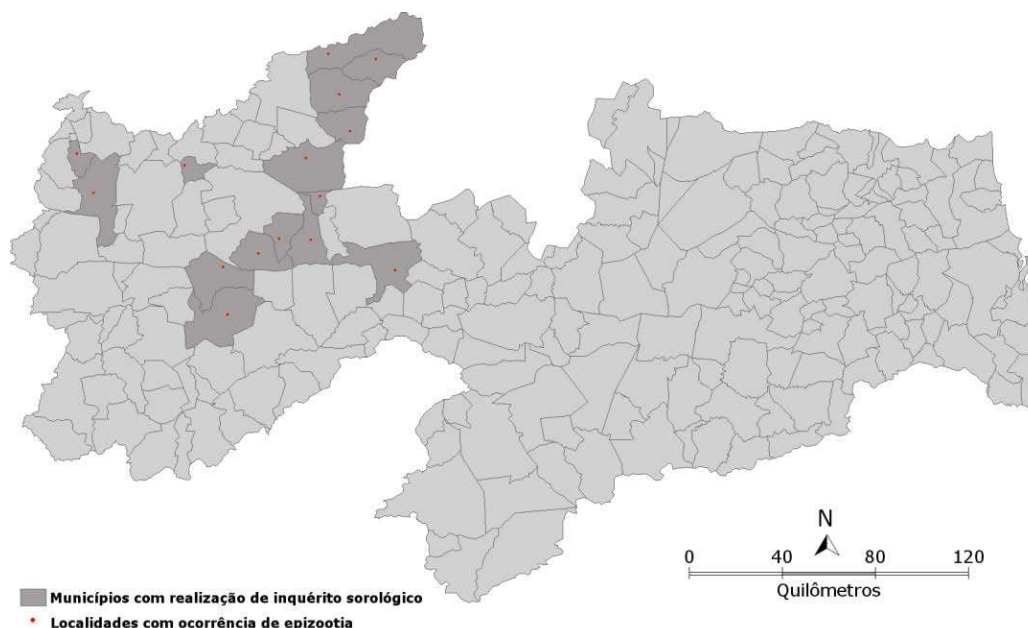


FIGURA 1 – Distribuição geográfica de ocorrência de epizootias e municípios de realização do inquérito sorológico em equinos, Paraíba, 2009.

Instrumentos utilizados

Para identificação dos animais acometidos pelo EEEV foi preenchida uma ficha de notificação de epizootia (Anexo 1), uma ficha de investigação (Anexo 2) e uma resenha (Anexo 3) contendo os dados e as informações consideradas de relevância.

A partir das informações construiu-se um banco de dados, contendo: município, nome do proprietário, nome e/ou número do animal, local de realização do inquérito, idade, sexo, utilidade, sinais clínicos, início dos sinais, histórico vacinal contra EE, dentre outros considerados importantes.

Características dos animais

A coleta de material foi feita mediante anuência dos proprietários. Foi coletado sangue de todos os animais independente do sexo, idade, estado nutricional, histórico de vacinação contra EE e estado de saúde.

Para evitar interferência de uma possível imunidade materna, somente foi coletado sangue de animais com idade acima de dois meses.

Para efeito do estudo, foi considerado animal infectado aquele reagente ao teste de soroneutralização em microplacas (padrão-ouro) tendo em vista: o grande número de casos de animais com clínica compatível com a doença, os resultados de RT-PCR observados em cinco animais que vieram a óbito no local, sem histórico de vacinação contra EE e sem relato de doença ou morte de animais com histórico de doença neurológica na região. Durante a coleta de sangue, os animais com clínica neurológica compatível com EE foram classificados como doentes.

Coleta de material

A coleta de sangue e resenha dos animais que participaram do inquérito foi feita em 100% dos animais das fazendas onde haviam relato de ocorrência de epizootia, por médicos veterinários da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba e Órgão de Defesa Sanitária Animal do Estado e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e técnicos das Secretarias de Saúde dos municípios envolvidos, com apoio dos funcionários das propriedades, sob coordenação do grupo de profissionais do Ministério da Saúde.

Para a segurança dos médicos veterinários, os animais eram contidos pelos funcionários da fazenda, para coleta de até 10 mL de sangue da veia jugular, em tubos *vacuteiner* utilizando agulhas de calibre 25x8.

Logo após a coleta, os tubos foram mantidos por cerca de 20 minutos de forma inclinada para que pudessem dessorar. Após a retração do coágulo foi feita a centrifugação durante cinco minutos a uma rotação de 68.8 (g).

Para a identificação dos tubos *vacuteiner*, os mesmos foram numerados com o número correspondente à resenha do animal. O soro foi aspirado com pipetas

automáticas, dividido em duas alíquotas e estas foram acondicionadas em flaconetes criogênicos, devidamente identificados com a numeração igual a do tubo *vacuteiner* e vedados com fita adesiva.

As amostras foram crio-preservadas em recipientes isotérmicos de nitrogênio líquido e transportadas para o Laboratório Central de Saúde Pública da Paraíba, que foi responsável pela conservação das amostras e encaminhamento de uma alíquota para o Instituto Evandro Chagas, em Belém/PA, e outra para o Instituto Biológico, em São Paulo/SP para a realização dos testes de IH e SN, respectivamente.

Teste de Inibição de Hemaglutinação

O teste de IH foi realizado de acordo com CLARK & CASALS (1958) e adaptado para microplacas por SHOPE (1963). Primeiramente, as amostras de soro foram tratadas por acetona: 50 µL do soro foram colocados em um tubo 13/100 mm, onde foi acrescentado 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 os tubos foram incubados a 4°C por uma hora, centrifugada a 37,8 (g) por 5 min e o sobrenadante foi desprezado. O tubo com o depósito foi colocado para secar em bomba de vácuo por uma hora. Após este 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 desprezado o sedimento de hemácias.

A prova foi realizada em duas etapas; na primeira foi realizada a triagem dos soros, diluídos 1:20, que foram testados para detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação em um painel com 19 tipos diferentes de arbovírus, pertencentes aos seguintes gêneros: *Alphavirus* (EEEV, WEEV, MAYV e MUCV); *Flavivirus* {YFV (cepa silvestre, BE H 111), ILHV, SLEV, ROCV, CACV e BSQV}, *Orthobunyavirus* {GUAV, MAGV, TCMV, CARV, OROV, CATV, BLMV e VUTI} e *Phlebovirus* {*Vírus Icoaraci* (ICOV)}.

Na segunda etapa, os soros que apresentaram anticorpos para qualquer um desses arbovírus foram então titulados até uma diluição 1: 1280. Para etapa de titulação, foi adicionado no primeiro orifício da microplaca 25 µL do soro tratado; sendo acrescentados 25 µL de albumina bovina 0,4% em pH 9,0 do 1º ao 6º orifício da microplaca; transferido 25 µL do primeiro ao sexto orifício da microplaca; adicionado 25 µL do antígeno diluído com quatro unidades, a placa foi incubada a 4°C por 12 horas, adicionados 50 µL de hemácia de ganso em DGV (Dextrose, Gelatina, Veronal) 1:5 diluído em pH 6,4; posteriormente, a microplaca foi agitada e encubada por 30 min em estufa a 37°C. A leitura foi feita observando a sedimentação das hemácias de ganso nos soros, uma vez que os anticorpos específicos presentes no soro testado estão inibindo a atividade hemaglutinante do vírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1994).

Foi considerado o ponto de corte (cut-off) a diluição de 1:20. As respostas de anticorpos anti-alfavírus detectados nos equinos foram classificadas em reação monotípica (RM) aquelas amostras com presença de anticorpos com títulos \geq 1:20 para um alfavírus e reações heterotípicas ou reações cruzadas (RC) as amostras com presença de anticorpos com títulos \geq 1:20 para mais de um alfavírus.

Entretanto, no momento da análise deste estudo foram considerados somente os anticorpos detectados contra os Alfavírus dos tipos EEEV, WEEV, MAYV e MUCV, tendo em vista que já havia sido detectado genoma viral do EEEV no cérebro de cinco equinos da região, por RT-PCR.

Teste de soroneutralização em microplacas

Os soros foram testados em diluições na base cinco para detecção de anticorpos contra o EEEV frente a 100-200/25 µL DICT50 de suspensão do EEEV (cepa Tatuí). Após a incubação, por 1 hora a 37°C, foram adicionados 100-150 µL de uma suspensão contendo $2,5$ a $3,0 \times 10^5$ cels/mL. Foi utilizada a linhagem de células VERO. A leitura foi realizada após 48-72 horas de incubação, em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C, observando-se a neutralização do efeito citopático. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos em valores do inverso da diluição que neutralizou 100-200. Foram considerados reagentes os soros com título \geq a 10 para o EEEV (KOTAIT et al., 1989; KOTAIT et al., 1992).

As amostras reagentes contra o EEEV foram testadas contra o WEEV, objetivando a busca de possíveis reações cruzadas que pudessem estar acontecendo e os três animais reagentes ao teste para o WEEV foram descartados.

Variáveis estudadas

Os animais foram cadastrados por município e localidade, segundo o sexo, faixa etária (< de 1 ano, de 1 a ≤ 5 anos, e > 5 anos), espécie (equino, asinino, muar), utilidade (trabalho, esporte, passeio, reprodução e outra) e estado vacinal do animal.

Foi observada a prevalência pré-teste e para cálculo desta foram considerados os animais doentes com sintomatologia compatível com EEE no momento do estudo. Para cálculo da prevalência aparente, foi considerado animal infectado aquele reagente ao teste de inibição de hemaglutinação (teste de triagem) e no caso da prevalência real foi considerado animal infectado aquele reagente ao teste soroneutralização em microplacas (teste confirmatório/padrão-ouro).

Para análise dos resultados observados no IH em comparação ao SN (padrão-ouro) foi construída uma tabela de contingência (2x2), a partir da qual foram determinadas a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e negativo, o *Likelihood ratio* positivo e *Likelihood ratio* negativo do teste de IH frente ao padrão-ouro (SN).

Análise Estatística

Os dados obtidos a partir do inquérito sorológico foram tabulados em uma planilha do Excel 2007, e as variáveis descritas acima foram confrontadas pelo teste do Qui-quadrado (X^2) admitindo-se nível de significância (α) de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade ($p \leq \alpha$)

Para análise de concordância entre os testes diagnósticos foi utilizado o índice *kappa*, interpretado de acordo com LANDIS & KOCH (1977). Para todos os testes, assumiu-se nível de significância (α) de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* EpiTools.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 188 animais testados, 22 apresentavam clínica compatível com EE na ocasião da coleta de sangue, o que determina uma prevalência pré-teste de 11,7%. Do total, 117 animais foram positivos para o EEEV pelo teste de SN demonstrando uma prevalência real de 62,2%, e 102 foram positivos pelo IH com uma prevalência aparente de 54,2%. Estes resultados apontam a capacidade do EEEV de realizar uma epizootia de elevada magnitude, tanto pelo número de casos como pela grande área de abrangência, com um elevado número de animais infectados, porém assintomáticos (Tabela 1).

TABELA 1 – Número de amostras positivas e negativas para o EEEV, segundo o tipo de teste, Paraíba, 2009.

	Teste Soroneutralização		
	Positivo	Negativo	Total
	Teste Inibição Hemaglutinação	Positivo 93	9
	Negativo 24	62	86
	Total 117	71	188

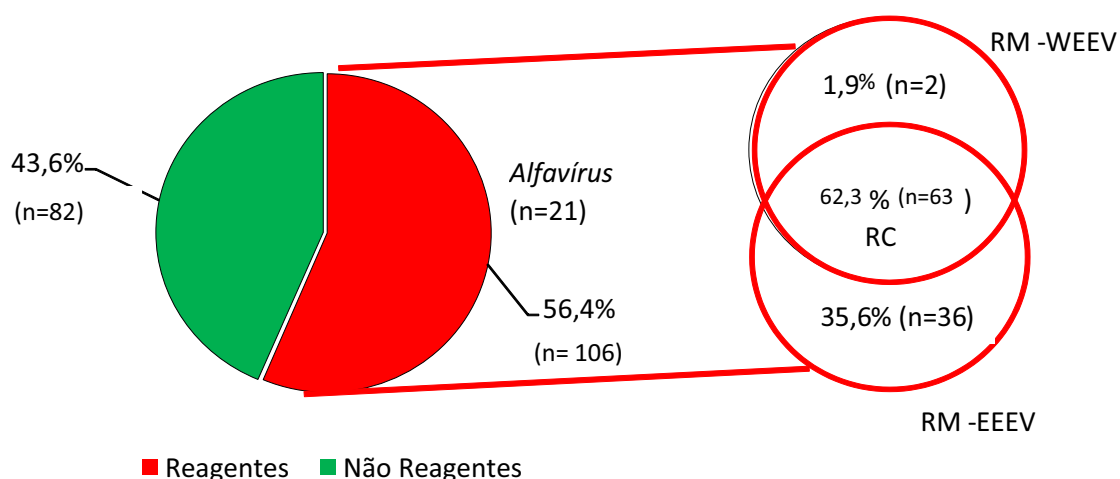
O estudo realizado por SANTOS et al. (2010) na mesma área, observaram um surto envolvendo 74 equinos, com duração de dois meses e 13 dias que apresentou uma letalidade de 48,6%. Os resultados deste estudo corroboraram para demonstrar a elevada circulação do vírus na área.

Considerando os 22 animais com clínica neurológica compatível com a EEE, 72,7% (16/22) foram reagentes ao teste de IH e 95,4% (21/22) ao teste de SN, o que sugere que em caso de animais com clínica compatível e resultado sorológico de IH negativo, deve ser recomendado o teste confirmatório. Estudos anteriores, realizados por PEREIRA et al. (1964), em Itaporanga/SP, em animais na fase aguda

da doença, agonizantes, convalescentes e contactantes demonstrou presença de elevadas taxas de anticorpos contra o EEEV nos soros pesquisados, tanto nos Testes de IH como de SN, corroborando com a descrição feita por ROMANO-LIEBER & IVERSSON (2000) quando referem-se ao teste de neutralização como a técnica sorológica de maior especificidade para pesquisa de infecções causadas por arbovírus.

Estudos demonstram a presença de anticorpos e isolamento viral em equídeos dos mais diversos arbovírus, entretanto somente os WNV, EEEV, WEEV, VEEV, apresentam manifestação clínica nos equídeos e somente no caso do VEEV, eles atuam amplificadores do vírus, demonstrando assim, ser na maioria dos casos um hospedeiro acidental (KOTAIT et al., 1992; ACHA & SZYFRES, 2003; FLORES, 2007; RIET-CORREA et al., 2007; CDC, 2010).

Do total de animais testados no IH, 56,3% (106/188) foram reagentes para alfavírus e destes, 96,2% (102/106) apresentaram anticorpos contra o EEEV, sendo que 35,3% (36/102) foram RM para o EEEV e 64,7% (66/102) RC para alfavírus. No caso de WEEV, 61,3% (65/106) foram reagentes, sendo que 96,9% (63/65) foram considerados como RC e duas reações foram monotípicas, sugerindo que o WEEV também já circulou na área, aparentemente em menor magnitude (Figura 2).



OBS: 2 RM para o MUCV; 3 RC entre os EEEV e os MAYV e MUCV não foram considerados na

FIGURA 2 – Animais reagentes para alfavírus no teste de IH, segundo o tipo de reação (RM e RC) e anticorpos específicos dos EEEV e WEEV, Paraíba-2009.

Com relação à positividade para o MUCV e MAYV a frequência observada foi de 20,0% (22/106) e 12,2% (13/106) respectivamente, sendo que o MAYV apresentou duas RM, sugerindo a circulação deste agente viral na área e o restante das amostras foram RC.

HEINEMANN et al. (2006), em Uruará/PA e CASSEB (2010) no Pará, utilizando o teste de IH, encontraram prevalências de anticorpos de 18,4% e 30,1% para o EEEV e 6,8% e 22,8% para o WEEV, respectivamente. Além disso, CASSEB (2010) detectou prevalências de 5,3% para o MAYV e MUCV, FERNANDEZ et al. (2000) em estudo realizado no Paraná, encontraram 13,6% de anticorpos contra o MUCV, enquanto não foi detectada presença de anticorpos contra o MAYV por CORRÊA et al. (2010) em Nhecolândia/MS, sugerindo a ausência do vírus ou de vetores na área ou ainda a baixa atratividade destes por sangue de equinos.

Considerando os dados de prevalência de anticorpos para EEEV disponíveis na literatura cujo teste diagnóstico foi a SN, MONATH et al. (1985) observaram 11,0% de prevalência de anticorpos neutralizantes em equinos da Argentina. FERNANDEZ et al. (2000) no Paraná entre 1996 e 1999 encontraram prevalência 54,5%. HEINEMANN et al. (2006) detectaram anticorpos neutralizantes de 27% em Uruará/PA; e IVERSSON et al. (1993) e CORRÊA et al. (2010) encontraram anticorpos neutralizantes para o EEEV de 6,7% e 47,7%, respectivamente, no Pantanal Mato-grossense. CUNHA et al. (2009), em São Paulo, entre 2004 e 2005, detectaram anticorpos para o EEEV em 16% de suas amostras.

Os resultados deste estudo juntamente com as prevalências observadas nas várias regiões do País demonstram que a circulação deste vírus difere em cada região e aparentemente está ligada a presença do vírus e às características ecológicas do vetor e do reservatório. Estes achados enfatizam a importância dos equídeos como animais sentinelas para monitorar a circulação destes arbovírus.

No presente estudo, das amostras reagentes para EEEV pela SN, 12,8% (15/117) apresentaram titulação $\geq 1:320$ e destas, 22,6% (4/15) foram $\geq 1:1280$,

considerada elevada se comparada ao *cutoff* estabelecido, ou com os títulos observados por CORRÊA et al., (2010), sugerindo que a diferença na titulação pode ter sido devido a ocorrência da epizootia no momento da coleta de soro.

Nos seis municípios em que houve coleta de amostra em 10 ou mais animais, o percentual de animais reagentes no teste de IH variou entre 68,0% (17/25) em Brejo do Cruz/PB, 61,5% (8/13) em Poço José do Moura e 27,2% (3/11) em São Bento, não existindo diferença estatisticamente significativa ($p=0,44$) entre as prevalências observadas nestas localidades.

ROMANO-LIEBER & IVERSSON, 2000 destacaram que o teste de IH é reconhecidamente sensível para detecção de anticorpos para arbovírus, enquanto o teste de neutralização é altamente específico e é empregado no diagnóstico sorológico como teste confirmatório. Desta forma, quando comparados os resultados obtidos no IH com aqueles obtidos a partir da SN, encontrou-se uma sensibilidade de 79,5% (93/117) e especificidade de 87,3% (62/71). Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) foram de 91,2% (93/102) e 72,1% (62/86) respectivamente, o que significa que a maioria dos positivos detectados no IH foram confirmados pela SN, sugerindo que o teste de IH foi de grande valor para determinar a presença de anticorpos do EEEV na área estudada.

Ponderando a probabilidade de infecção em indivíduos com teste positivo e teste negativo, o *Likelihood ratio* positivo encontrado foi de 6.3 e o *Likelihood ratio* negativo foi de 0.2, sugerindo que a probabilidade de um animal infectado ter o resultado positivo no teste é 31,5 vezes maior no animal verdadeiramente infectado do que no não infectado. Os resultados também demonstraram que a probabilidade de um indivíduo testado aleatoriamente ser reagente no teste de IH foi de 45,0%, considerando a prevalência pré-teste de cerca 11,7%, enquanto que a probabilidade de resultar negativo foi de 3,0%.

Quando analisada a concordância entre os testes, obteve-se o índice de kappa de 0,641 (LANDIS & KOCK, 1977), determinado a existência de uma concordância substancial entre os testes, uma vez que dos 102 animais positivos no teste de IH, 99 foram reagentes no teste confirmatório, demonstrando que a diferença encontrada foi estatisticamente significativa ($p<0,001$), o que sugere que o

teste de triagem é importante para determinar a presença da circulação de anticorpos virais.

Na análise da Tabela 2 observa-se que a prevalência de anticorpos neutralizantes (SN) foi maior entre os equinos com 68,4% (104/152), seguido dos asininos com 42,9% (6/14) e muares com 31,8% (7/22). A utilização de burros e mulas como animais de carga, na Paraíba é comum e permite inferir a possibilidade de uma maior exposição destes animais com os mosquitos vetores infectados. Esta afirmativa corrobora com o encontrado por CUNHA et al. (2009), em estudo realizado no Vale do Ribeira, em São Paulo entre 2004 e 2005, que apontaram uma elevada prevalência de anticorpos contra o EEEV em, devido este animal ser utilizado com frequência na coleta do palmito na zona de mata da região.

TABELA 2 - Número e percentual de animais reagentes e não reagentes ao Teste de SN, segundo a espécie. Paraíba, 2009.

	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%	TOTAL
EQUINOS	104	68,4	48	31,6	152
ASININOS	6	42,9	8	57,1	14
MUARES	7	31,8	15	68,2	22
TOTAL	117	62,2	71	37,8	188

Dos 188 animais que participaram do estudo, 177 tiveram o sexo registrado no banco de dados, e destes, 53,1% (94/177) eram machos e 63,8% (60/94) foram reagentes ao teste de SN contra o EEEV. Dentre as fêmeas, 59,0% (49/83) também foram reagentes ao teste. Do total de animais positivos 52,6% (60/114) eram machos, 42,9% (49/114) fêmeas (Tabela 3), demonstrando não existir associação entre o sexo do animal e a positividade no teste e que esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,1774$). Desta forma, os resultados demonstraram que ambos os sexos possuem a mesma susceptibilidade, e estão sob o mesmo risco de se infectar.

TABELA 3 - Número e percentual de animais reagentes e não reagentes contra EEE no teste de SN, segundo o sexo. Paraíba, 2009.

	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%	TOTAL
MACHO	60	63,8	34	36,2	94
FÊMEA	49	59,0	34	41,0	83
TOTAL	109	61,6	68	38,4	177

Considerando os 174 animais onde a faixa-etária foi relatada, observa-se um aumento significativo dos animais reagentes ao teste de SN com o avanço da idade (Tabela 4) demonstrando existir associação entre a idade do animal e a positividade no teste e que esta diferença se mostrou estatisticamente significativa quando comparados os animais na faixa etária de < de um ano com as demais faixa etárias ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa quando se considerou a positividade dentro de cada faixa etária ($p > 0,05$).

TABELA 4 - Número e percentual de animais reagentes e não reagentes para o EEEV no teste de SN, segundo e por faixa etária. Paraíba, 2009.

	POSITIVOS	% REAGENTES POR FAIXA ETÁRIA	% REAGENTES SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA	TOTAL
< 1 ano	18	16,7	47,4	38
1 ≤ 5 anos	45	41,7	68,2	66
> 5 anos	45	41,7	64,3	70
TOTAL	108	100,0	62,1	174

Assim, apesar do sexo não ter demonstrado relação com a positividade ao teste, a faixa etária demonstrou ser um fator importante, tendo em vista o tempo de exposição ser maior no animal mais velho.

Considerando o estado vacinal dos animais contra as EE (Tabela 5), 96 foram vacinados em até sete dias antes da coleta de sangue, onde se observou prevalências para EEE de anticorpos neutralizantes de 62,5% (60/96) nos vacinados e de 61,9% (57/92) nos não vacinados e uma frequência de animais reagentes e não reagentes ao teste de SN em torno de 50% entre os vacinados e não vacinados, demonstrado que a não existência de associação entre a vacina e positividade ao teste (RR=1; RA=0; p=0,97) e isto se deve ao pouco tempo entre a vacinação e a coleta do sangue.

TABELA 5 - Número e percentual de animais reagentes e não reagentes contra o EEEV no teste de SN, segundo o estado vacinal do animal. Paraíba, 2009.

	VACINADOS	%	NÃO VACINADOS	%	TOTAL
POSITIVOS	60	51,3	57	48,7	117
NEGATIVOS	36	50,7	35	49,3	71
TOTAL	96	51,1	92	48,9	188

Ponderando as informações obtidas nas localidades, 50% dos equinos estudados não tinham histórico de vacinação contra EE e o restante havia sido vacinado em até sete dias da coleta de soro, tendo recebido somente uma dose de vacina. Estes animais foram considerados “não vacinados”, tendo em vista que ainda não havia tempo hábil para produção de anticorpos vacinais que pudessem vir a interferir no resultado laboratorial. A vacina contra EE utilizada no local era recomendada a aplicação em potros a partir de três meses de idade (três doses com intervalo de duas a quatro semanas entre as aplicações) e os seus títulos protetores são obtidos a partir de 21 dias após a administração da última dose (VENCOFARMA, 2011).

Enquanto CORRÊA (2008), em inquérito realizado no Pantanal, observou uma prevalência de 47,7% de animais reagentes para o EEEV em animais não vacinados e com mais de sete meses de idade no momento da coleta do sangue, demonstrando uma menor soropositividade do que a observada neste estudo que foi de 65,4% (89/136) quando comparados animais da mesma faixa-etária e mesmo estado vacinal, sugerindo que a idade é um fator de exposição ao vírus.

Avaliando os animais com idade inferior a seis meses e a possibilidade de serem reagentes ao teste de SN devido à imunidade passiva obtida da mãe ou por terem sido vacinados em até sete dias antes da coleta do sangue, pode-se observar que dos 17 animais com esta faixa-etária, oito (47,5%) haviam sido vacinados e destes 37,5% (3/8) foram reagentes ao teste. Os mesmos percentuais foram observados nos não vacinados, demonstrando não haver relação entre ser reagente ao teste e uma possível imunidade passiva dos animais nesta faixa etária e nem pelo estado vacinal do animal (RR=1; RA=0; p=1), conforme já descrito por BERTONE (2000). Isto sugere que os animais não tinham nenhuma proteção materna, demonstrando uma total susceptibilidade ao vírus em todas as faixas etárias.

O maior percentual de positividade foi observado nos animais de passeio, 75,0% (6/8) seguido dos animais utilizados para a prática de esporte com 66,7% (18/27) e de reprodução com 66,7% (20/30) (Tabela 6). Por outro lado, quando se considera a positividade por utilidade, pode-se observar que os animais de trabalho representaram 40,1% (47/117) do total de animais positivos ao teste de SN, não existindo associação entre ser positivo ao teste e a utilidade do animal (p=0,3838). Já analisando a proporção de animais positivos foi maior entre os animais de trabalho, seguido dos animais utilizados na prática do esporte e reprodução, demonstrando haver diferença significativa entre as utilidades dos animais (p=2.519e-16; IC – trabalho = 0,44360902, esporte = 0,187969, reprodução = 0,172932, outras = 0,09774 e passeio = 0,0526318).

TABELA 6 - Número e percentual de animais reagentes e não reagentes contra o EEEV no teste de SN, segundo a utilidade do animal. Paraíba, 2009.

	Animais Positivos	% Positivos por Utilidade	% Positivos entre as Utilidades	Animais Negativos	% Negativos por Utilidade	% Negativos entre as Utilidades	Total
Esporte	18	66,7	15,4	9	33,3	12,7	27
Passeio	6	75,0	5,1	2	25,0	2,8	8
Reprodução	20	66,7	17,1	10	33,3	14,1	30
Trabalho	47	59,5	40,2	32	40,5	45,1	79
Outro	12	50,0	10,3	12	50,0	16,9	24
NI	14	70,0	12,0	6	30,0	8,5	20
TOTAL	117	62,2	100,0	71	37,8	100,0	188

Por fim, os resultados observados a partir da comparação entre os testes de inibição de hemaglutinação e neutralização em microplaca demonstram que o primeiro pode ser um teste indicado para detectar se ocorreu a circulação viral, não sendo o recomendado para determinar a magnitude da epizootia e que o teste de neutralização é de fato o padrão-ouro como sugerido na literatura.

Esses achados, em conjunto com o já observado por outros autores enfatizam a importância das epizootias causadas por doenças neuroinvasivas em equinos, que elas devem ser usadas como ferramenta preditora da ocorrência de casos de encefalites e/ou meningites virais em humanos, determinando desta forma, uma nova vigilância das meningites virais em humanos no país.

4 CONCLUSÕES

Constatou-se uma elevada circulação do vírus da Encefalite Equina do Leste entre equinos da área estudada, tendo em vista a detecção de um elevado número de animais portadores inaparentes.

A idade demonstrou ser um fator de exposição ao vírus. O sexo e a utilidade do animal, não foram fatores de risco de exposição ao vírus, mas a proporção de animais de trabalho acometidos foram maiores quando comparados com as demais utilidades, demonstrando assim, que os animais de trabalho estão sob o risco maior de se infectarem.

O teste Inibição de Hemaglutinação deve ser recomendado como de triagem em inquéritos sorológicos desta natureza, tendo em vista a substancial concordância observada quando comparado os resultados obtidos com o teste confirmatório, além dos resultados demonstrados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo.

REFERÊNCIAS

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonoses y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Volume II – Clamidirosis, rickettsiosis y virosis. Organización Panamericana de Saúde. Publicacion Cientifica y Tecnica. n.580. Washington,DC, EUA. 3 ed. 425p. 2003.
2. ARRIGO, N.C.; ADAMS, A.P.; WEAVER, S.C. Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision. **Journal of Virology**, Jan. 2010, v. 84; n.2; p. 1014–1025, 2010. Disponível em: <http://jvi.asm.org/cgi/reprint/84/2/1014>. Acessado em 22.06.2011.
3. BERTONE, J.J.. Encefalite causada por Togavírus. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. c. 9, p. 432- 436. 2000.
4. BRAULT, A.C.; POWERS, A.M.; CHAVEZ, C.L.V.; LOPEZ, R.N.; CACHO´ N, M.F.; GUTIERREZ, L.F.L.; KANG, W.; TESH, R.B.; SHOPE, R.E.; WEAVER, S.C. Genetic And Antigenic Diversity Among Eastern Equine Encephalitis Viruses From North, Central, And South America. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v.61, n.4, , p. 579–586.1999. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/61/4/579.full.pdf+html>. Acessado em 21.06.2011.
5. CASSEB, A.R.. Soroprevalência de anticorpos e padronização do teste Elisa Sanduíche Indireto para 19 tipos de arbovírus em herbívoros domésticos. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Belém, 2010.
6. CDC Technical Fact Sheet: Eastern Equine Encephalitis [editorial]. CDC Division of vector. Borne Infectious Diseases, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/EasternEquineEncephalitis/tech/factSheet.html>. Acessado em 12.06.2011.
7. CLARKE, D.H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition. With arthropod-borne viruses. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene** n.7. p. 561-573. 1958.

8. CORRÊA, A.P. Estudo sobre arbovírus em populações de equinos e artrópodes na Sub-região de Nhecolândia no Pantanal do mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz. **FIOCRUZ**. Rio de Janeiro. p. 180. 2008.
9. CORRÊA, A.P.; TAVARES, F.N.; COSTA, E.V.; BURLANDY, F.M.; MURTA, M.; PELLEGRIN, A.O.; NOGUEIRA, M.F.; SILVA, E.E.. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6: p. 829-833, Setembro, 2010.
10. CUNHA, E.M.S.; VILLALOBOS, E.M.C.; NASSAR, A.F.C.; LARA, M.C.C.S.H.; PERES, N.F.; PALAZZO, J.P.C.; SILVA, A.; DE STEFANO, E.; PINO, F.A. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v.76, n.2, p.165-171, abr./jun., 2009.
11. FERNÁNDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.
12. FIGUEIREDO, L.T.M. Arboviroses Emergentes no Brasil. Artigo de Opinião. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.2, p.224-229, março-abril, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n2/a16v40n2.pdf>. Acessado em: 28.08.2011.
13. FLORES, E. F.. Classificação e Nomenclatura dos Vírus. **Virologia Veterinária**. Santa Maria : Ed. da UFSM, 2007. p 39 - 58.
14. HAYES, E.B.; KOMAR, N; NASCI, R.S.; MONTGOMERY, S.P.; O'LEARY, D.R.; CAMPBELL, G.L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p.1167-1173, 2005.
15. HEINEMANN, M.B., SOUZA, M.C.C., CORTEZ, A., FERREIRA, F., HOMEM, V.S.F; FERREIRA-NETO, J.S., SOARES, R.M., CUNHA, E.M.S., RICHTZENHAIN, L.J.. Soroprevalência da encefalomielite eqüina do leste e do oeste no Município de Uruará, PA, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **43**: 1-5, 2006.

16. IVERSSON, L.B., SILVA, R.A.M.S., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., BARROS, V.L.R.S. Circulation of Eastern Equine Encephalitis, Western Equine Encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.35, p. 355-359, 1993.
17. 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. **Revista de Saúde Pública**, v.32, p.323-332, 1984.
18. KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; COIMBRA, T. L. M.; CUNHA, E. M. S.; QUEIROZ, L. H.; MACRUZ, R.; NAGAMORI, A. H. Isolamento e identificação do vírus da encefalomielite equina, tipo leste, em equinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.59, n.1/2, p.37-41, 1992.
19. KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; QUEIROZ, L. H.; CUNHA, E. M. S.; SOUZA, M. C. A. M.; MACRUZ, R.; FREITAS, C. A. Diagnóstico laboratorial do aborto equino a vírus através de imunofluorescência e soroneutralização. **Revista de Microbiologia**, v.20, n.1, p.128-132, 1989.
20. LANDIS, J.R. e KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p. 159-174, 1977.
21. LOPES, O.S.; SACCHETA, A. Epidemiological studies on eastern equine encephalitis virus in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.16, n.5, p.253-257, 1974.
22. MONATH, T.P. SABATINI, M.S., PAULI, R., DAFNER, J.F., MITCHEL, C.J. BOWEN, G.S., CROPP, C.B. Arbovirus investigation in Argentina, 1977-1980. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.34; p. 966-975, 1985.
23. NILSSON, M.R.; SUGAY, W. Ocorrência da encefalomielite equina em Itaporanga, estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v.29, p.63-68, 1962.
24. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Importancia de las virosis transmitidas por artrópodos y roedores para la salud pública em las Américas. **Boletim Epidemiológico**. v. 4; n. 3; 4 p.; 1983.
25. PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M.A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; NOGUEIRA, M.F.; SILVA, E.E.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses

from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n.4, p.467-474, June, 2011.

26. PEREIRA, O.A.; NILSSON, M.R.; SUGAY, W.; TRAPP, E.E. Ocorrência de Encefalomielite Equina em Itaporanga, estado de São Paulo (Brasil). II Estudos Sorológicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.6; p 1-4. 1964.

27. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. Doenças de Ruminantes e Equídeos, 3ª Ed. Santa Maria: Palotti, 2007. Vol 1. p. 103-106.

28. ROMANO-LIEBER, N.S.; IVERSSON, L.B. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista Saúde Pública**. v.34, n. 3, p.2362-42. 2000.

29. SANTOS, A.L.; ROMANO, A.P.M.; ELKHOURY, A.N.S.M.; ARAUJO, F.A.A. Epizootias em Equinos por Encefalite Equina do Leste e Inquérito Sorológico em Equinos para Detecção de Anticorpos “Anti-Encefalite Equina do Leste” - Paraíba/2009. [Poster] Anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. MEDTROP2011. Natal, 2010.

30. SHOPE, R.E. The use of a microhemagglutinationinhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Annual Microbiology**; n.11, p.167-171. 1963.

31. SILVA, R.A.M.S.; DÁVILA, A.M.R.; IVERSSON, L.B.; ABREU, U.G.P. Equine viral diseases in the Pantanal, Brazil. Studies carried out from 1990 to 1995. **Revue de Élevage de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.52, n.1, p.9-12, 1999.

32. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. Documento Técnico, n.2. **Instituto Evandro Chagas**. Fundação Nacional de Saúde. Belém, 28p. 1994.

33. 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**; v. 33; n.6; p. 465-476; 1991

34.VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, A.P.A.T.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; ROSA, J.F.S.T.; RODRIGUES, S.G.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. *In*: ROSA, A.P.A.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, J.F.S.T. (eds) **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**, Instituto Evandro Chagas, Belém, p.72-99. 1998.

35.VENCOFARMA. Encefalogen – Vacina contra Encefalomielite e Tétano Equino. **Vencofarma – Proteção a Saúde Animal**. 2011. Disponível em: http://www.vencofarma.com.br/bra/produtos_det.php?cod=54. Acessado em 24.06.2011.

CAPÍTULO 3

SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS “ANTI-ARBOVÍRUS” DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM EQUÍDEOS, NO BRASIL – 2007 A 2009.

PREVALENCE OF ANTI-ARBOVIRUSES ANTIBODIES OF PUBLIC HEALTH IMPORTANCE IN HORSES - BRAZIL – 2007 TO 2009

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos anti-arbovírus em equídeos em 15 inquéritos sorológicos realizados em nove estados do Brasil por meio do teste de inibição de hemaglutinação. Foi realizada coleta de sangue em 4.402 equídeos, distribuídos em municípios de fronteira, de ocorrência de epizootias e de realização de eventos agropecuários. Do total de animais que participaram dos inquéritos 33,3% foram reagentes no teste de inibição por hemaglutinação para um ou mais dos arbovírus pesquisados, sendo 20,6% para os *flavivírus*, seguido dos *alfavírus* com 14,1% e *bunyavírus* com 10,1%, onde se observa que a prevalência de animais reagentes para *flavivírus* foi significativamente maior quando comparada à dos demais grupos de arbovírus pesquisados ($p < 0,001$). A proporção de reações positivas nos municípios de ocorrência de epizootias foi de 42,7%, seguindo das reações nos municípios de fronteira com 29,1% e festa agropecuária com 28,1%. Os arbovírus pesquisados encontram-se presentes em todas as regiões estudadas, sendo que a frequência difere conforme a região estudada e a motivação do inquérito. O vírus da Encefalite de Saint Louis e o da Encefalite Equina do Leste, foram os mais reagentes. Reações Monotípicas para anticorpos do vírus Rocio, fora de São Paulo determinam sua presença em outros estados do País. Circularam outros arbovírus em concomitância com as epizootias pelo vírus da Encefalite Equina do Leste.

PALAVRAS-CHAVE: alfavírus, doenças emergentes, sentinela.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the prevalence of antibodies against arboviruses in horses in 15 serological surveys conducted in nine states in Brazil by means of the hemagglutination inhibition test. Blood was collected from 4402 horses, in border municipalities as well as in places where animal diseases have occurred and agricultural events are held. Of the total number of animals that participated in the survey 33.3% were reactive in the hemagglutination inhibition test for one or more of arboviruses, being 20.6% for the flaviviruses, 14.1% for alphavirus and 10.1% bunyavirus, which shows that the prevalence of animals reagent for flavivirus was significantly higher when compared to the other groups of arboviruses surveyed ($p < 0.001$). The proportion of positive reactions in the counties of occurrence of animal diseases was 42.7%, followed by the reactions in the border counties (29.1%) and in agricultural festival regions (28.1%). The surveyed arboviruses are present in all regions studied, and their frequency differs depending on the region studied and the motivation of the investigation. The St. Louis encephalitis and Eastern equine encephalitis viruses were the most reactive. Monotypic reactions for antibodies against Rocio virus, outside Sao Paulo State determine their presence in other states of the country. Other arbovirus can be found along with the epizootic Eastern Equine Encephalitis virus.

KEYWORDS: alphavirus, emerging diseases, sentinel.

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são conhecidos pela ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todos os continentes, preferencialmente nas regiões dos trópicos. Nestas regiões as características climáticas e ambientais favorecem o contato do vetor com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano, ao passo que, nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997).

A importância das infecções por arbovírus é observada quando são consideradas sua frequência e capacidade de aumentar drasticamente o número de casos, sua magnitude e capacidade de se manter no ambiente ou emergir como um problema de saúde pública (KUNO & CHANG, 2005).

Dentre os arbovírus conhecidos, apenas oito eram considerados como responsáveis por quadros de encefalites em equinos e humanos nas Américas, constituindo uma importante causa de morbi-mortalidade, os vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite da Califórnia (ECV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), vírus da Encefalite Equina venezuelana (VEEV), vírus Rocio (ROCV) e o Vírus Powassan (POWV). Nos sete primeiros a transmissão se dá por meio de picadas de mosquitos, enquanto o VPOW é veiculado por picada de carrapatos (KARABATSOS, 1985). Contudo em 1999, foi detectada a presença do WNV em Nova Iorque, determinado assim, o risco e a possibilidade de introdução de agentes então presentes apenas no Velho Mundo, para as Américas (PETERSEN & ROHRIG, 2001; FIGUEIREDO, 2007).

A infecção em humanos por arbovírus usualmente ocorre nas florestas ou em suas proximidades e se dá pela picada de vetores silvestres previamente infectados por vertebrados da mata (VASCONCELOS et al., 1998).

Segundo FIGUEIREDO (2007), o risco do surgimento de novos arbovírus no Brasil está relacionado com a existência de grandes cidades densamente povoadas que estão infestadas por mosquitos, como *Culex* e com características altamente antropofílicas como o *Ae. aegypti*. Para a detecção precoce da introdução

do WNV, além de vigilância de aves selvagens, a vigilância ativa de casos de meningites virais em humanos e em equinos precisam ser implementadas em todo o País. Como o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), o vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV) e o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) também pode produzir meningoencefalite em humanos e equinos, em ambas as espécies se faz necessária a vigilância para detecção desses vírus. O vírus Rocio (ROCV) não causa doença em animais, sendo necessária uma vigilância para esta meningoencefalite somente em humanos.

Com as crescentes mudanças ambientais é sabido que as arboviroses são a atual causa de maior preocupação entre os agentes emergentes, tanto pela sua capacidade de disseminação como pela severidade das manifestações clínicas levando à elevada letalidade. Desta forma, foi realizado um estudo descritivo do tipo transversal que teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os arbovírus estudados em equinos investigados em 15 inquéritos sorológicos realizados em nove estados do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados 15 inquéritos sorológicos, envolvendo animais de 36 municípios de nove estados do Brasil (Figura 1), no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2009. Participaram dos inquéritos 4.402 equídeos de uma população de 6.950 existentes nas localidades de realização do estudo. A partir da coleta de sangue, foi realizado um estudo transversal, utilizando as amostras de soro de todos os animais incluídos nos inquéritos.

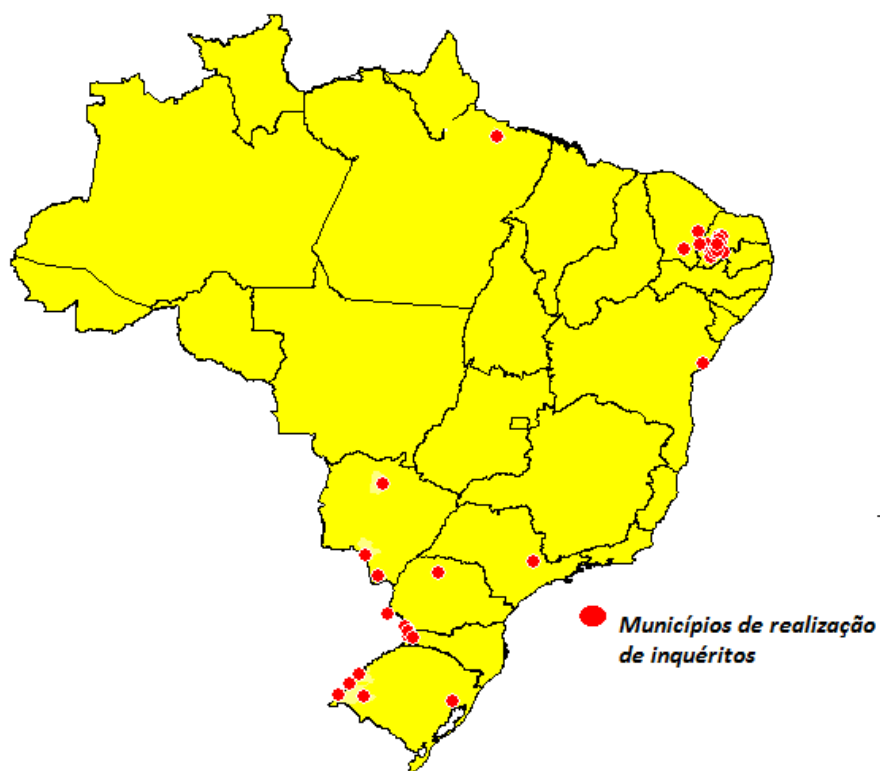


FIGURA 1 - Municípios de realização dos inquéritos sorológico em equinos para estudo de soroprevalência de arbovírus de importância em saúde pública – Brasil, 2007 a 2009.

Área de Estudo

Para seleção dos municípios, três fatores foram desencadeadores: ser município de fronteira, municípios de ocorrência de epizootias de enfermidade

neurológicas em equinos e de realização de um evento que aglomerasse animais de várias localidades como eventos agropecuários e festas do laço. Assim, foram realizados quatro inquéritos em municípios onde estavam ocorrendo eventos agropecuários, 20 municípios de ocorrência de epizootias em equinos e 12 municípios que fazem fronteira com a Argentina ou Paraguai.

Os municípios de fronteira foram selecionados tendo em vista a detecção do WNV na Argentina, a facilidade de trânsito de animais através da fronteira seca com o Paraguai além do tamanho do município, interesse do município de participar do estudo. Os municípios de Ponta Porã/MS e Uruguaiana/RS participaram por dois anos do estudo, por serem pontos estratégicos para o monitoramento e a vigilância de epizootias em animais para o Ministério da Saúde. Os animais pesquisados em um ano, nesses municípios, não foram os mesmos estudados no ano seguinte, tendo em vista a elevada rotatividade dos animais nos locais onde foram realizadas as coletas.

Dos cinco inquéritos que tiveram como motivação a ocorrência de epizootias em equinos, o de Camaçari/BA foi o único no qual não foi possível determinar a causa da epizootia. Nos demais a causa morte dos animais se deu devido à circulação do EEEV, diagnosticadas através de RT-PCR.

Dos quatro inquéritos realizados durante eventos agropecuários, os municípios foram selecionados tendo em vista a magnitude do evento no estado. Os inquéritos do Mato Grosso do Sul (Tacuru e Rio Verde do Mato Grosso) se deram em Festa do Laço e o do Paraná (Maringá) e do Rio Grande do Sul (Porto Alegre) ocorreram durante os eventos agropecuários destes municípios.

TABELA 1 - Número de animais que participaram do estudo, segundo o Município, UF, coordenadas geográficas e motivação para realização do inquérito sorológico. 2007 a 2009.

ANO	UF	MUNICÍPIO	LATITUDE (Y)	LONGITUDE (X)	MOTIVAÇÃO	Nº ANIMAIS
2007	MS	PONTA PORÃ	22°32'10"S	55°43'32"O	FRONTEIRA	335
		TACURU	23°37'57"S	55°00'57"O	FEIRA AGROPECUÁRIA	258
	PR	FOZ DE IGUAÇU	25°32'52"S	54°35'17"O	FRONTEIRA	374
		MARINGÁ	23°25'31"S	51°56'19"O	FEIRA AGROPECUÁRIA	283
		BARRAÇÃO	26°15'15"S	53°38'00"O	FRONTEIRA	15
	RS	ALEGRETE	29°46'59"S	55°47'31"O	FRONTEIRA	37
		ITAQUI	29°07'31"S	56°33'11"O	FRONTEIRA	81
		SÃO BORJA	28°39'38"S	56°00'16"O	FRONTEIRA	84
URUGUAIANA		29°45'17"S	57°05'18"O	FRONTEIRA	98	
2008	BA	CAMAÇARI	12°41'51"S	38°19'27"O	EPIZOOTIA	264
	MS	PONTA PORÃ	22°32'10"S	55°43'32"O	FRONTEIRA	326
		RIO VERDE DO MATO GROSSO	18°55'05"S	54°50'39"O	FEIRA AGROPECUÁRIA	304
	RS	URUGUAIANA	29°45'17"S	57°05'18"O	FRONTEIRA	319
		PORTO ALEGRE	30°01'59"S	51°13'48"O	FEIRA AGROPECUÁRIA	299
	SC	DIONISIO CERQUEIRA	26°15'18"S	53°38'23"O	FRONTEIRA	58
		SÃO MIGUEL DO OESTE	26°43'31"S	53°31'05"O	FRONTEIRA	48
		GUARACIABA	26°35'57"S	53°31'05"O	FRONTEIRA	39
		GUARUJÁ DO SUL	26°23'07"S	53°31'40"O	FRONTEIRA	26
		IRACEMINHA	26°49'21"S	53°16'28"O	FRONTEIRA	22
		SÃO JOSÉ DO CEDRO	26°27'18"S	53°29'39"O	FRONTEIRA	23
SP	CAMPINAS	22°54'20"S	47°03'39"O	EPIZOOTIA	319	
2009	CE	JAGUARIBE	05°53'26"S	38°37'19"O	EPIZOOTIA	164
		VARZEA ALEGRE	06°47'20"S	39°17'45"O	EPIZOOTIA	141
	PA	CACHOEIRA DO ARARI	01°00'41"S	48°57'48"O	EPIZOOTIA	297
	PB	BELÉM DO BREJO DO CRUZ	06°11'19"S	37°32'09"O	EPIZOOTIA	2
		BREJO DO CRUZ	06°20'55"S	37°29'54"O	EPIZOOTIA	25
		CAJAZEIRINHAS	06°57'40"S	37°48'22"O	EPIZOOTIA	2
		CONDADO	06°54'35"S	37°36'03"O	EPIZOOTIA	2
		COREMAS	07°00'52"S	37°56'45"O	EPIZOOTIA	5
		PATOS	07°01'28"S	37°16'48"O	EPIZOOTIA	9
		PAULISTA	06°35'38"S	37°37'27"O	EPIZOOTIA	47
		PIANCÓ	07°11'53"S	37°55'45"O	EPIZOOTIA	1
		POÇO JOSÉ DE MOURA	06°34'30"S	38°30'43"O	EPIZOOTIA	13
		SÃO BENTINHO	06°54'04"S	37°43'45"O	EPIZOOTIA	6
		SÃO BENTO	06°29'10"S	37°27'02"O	EPIZOOTIA	11
		SÃO FRANCISCO	06°37'08"S	38°05'40"O	EPIZOOTIA	1
		SÃO JOÃO DO RIO DO PEIXE	06°43'45"S	38°26'56"O	EPIZOOTIA	33
		SÃO JOSÉ DO BREJO DO CRUZ	06°12'46"S	37°21'08"O	EPIZOOTIA	30
VISTA SERRANA		06°44'18"S	37°34'00"O	EPIZOOTIA	1	
TOTAL						4.402

Instrumentos utilizados

Para desenvolvimento dos trabalhos foi preenchida uma resenha individual para cada animal (Anexo 3) contendo os dados e as informações consideradas de relevância.

Com as informações foi elaborado um banco de dados, contendo: município, Unidade Federada, nome e/ou número do animal, local de realização do inquérito, idade, sexo, utilidade, motivação da realização do inquérito, histórico vacinal contra EE e o resultado do teste sorológico.

Características dos animais

Os animais foram selecionados a partir da anuência dos proprietários e observação do seu estado geral. Foi coletado sangue de todos os animais colocados à disposição do estudo, independente do sexo, idade, estado nutricional, histórico de vacinação contra EE e estado de saúde.

Não existiu um padrão único no perfil do tipo de criação dos animais do estudo, tendo sido coletado de animais de alto padrão racial e genético, animais sem raça definida, mestiços, de grandes haras, fazendas, pequenas propriedades, animais de tração (carroceiros), de esporte (festa do laço, vaquejada, hipismo) inclusive animais de exposição.

Os animais com histórico de vacinação contra EE não entraram na análise no momento de avaliação dos dados sobre alfavírus, tendo em vista a impossibilidade de diferenciação entre anticorpos vacinais e de infecção.

Coleta de material

As coletas de sangue e resenha dos animais foi conduzida por médicos veterinários com apoio dos funcionários das propriedades, sob a coordenação do grupo de profissionais do Ministério da Saúde. Foram coletados 10 mL de sangue da veia jugular em tubos vacuteiner utilizando agulhas de calibre 25x8, que em seguida foram colocados para dessorar. Após retração do coágulo, foi feita a centrifugação do sangue por cinco minutos a uma rotação de 68.8 (g). O soro foi separado com auxílio de pipetas automáticas e acondicionado em flaconetes criogênicos,

devidamente identificados com a numeração igual a do tubo *vacuteiner*, vedados com fita adesiva e congelados em nitrogênio líquido.

O material coletado foi encaminhado para o Instituto Evandro Chagas/PA para pesquisa de anticorpos contra os flavivírus, bunyavírus e alfavírus e Instituto Adolfo Lutz/SP para pesquisa de anticorpos contra os alfavírus e flavivírus, por meio do teste de inibição de hemaglutinação (IH).

Teste de Inibição de Hemaglutinação

Para os exames sorológicos foi empregada a técnica de IH de acordo com CLARK & CASALS (1958) e adaptado para microplacas por SHOPE (1963). Primeiramente, as amostras de soro foram tratadas por acetona: 50 µL do soro foram colocados em um tubo 13/100 mm, onde foi acrescentado 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 os tubos foram incubados a 4°C por uma hora, centrifugada a 37,8 (g) por 5 min e o sobrenadante foi desprezado. O tubo com o depósito foi colocado para secar em bomba de vácuo por uma hora. Após este 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 desprezado o sedimento de hemácias.

No momento da análise dos dados foram considerados os animais reagentes para os seguintes arbovírus: EEEV, WEEV, MUCV (VEEV, subtipo IIIA), MAYV, SLEV, ROCV, CACV, IGUV, ILHV, MAGV, VTC e OROV.

Na segunda etapa, os soros que apresentaram anticorpos para qualquer um desses arbovírus foram então titulados até uma diluição 1: 1280. Para etapa de titulação, foi adicionado no primeiro orifício da microplaca 25 µL do soro tratado; sendo acrescentado 25 µL de albumina bovina 0,4% em pH 9,0 do 1º ao 6º orifício da microplaca; transferido 25 µL do primeiro ao sexto orifício da microplaca; adicionado 25 µL do antígeno do diluído com quatro unidades, a placa foi incubada a 4° C por 12 horas, adicionados 50 µL de hemácia de ganso em DGV (Dextrose,

Gelatina, Veronal) 1:5 diluído em pH 6,4; posteriormente, a microplaca foi agitada e encubada por 30 min em estufa a 37°C. A leitura foi feita observando a sedimentação das hemácias de ganso nos soros, uma vez que os anticorpos específicos presentes no soro testado estão inibindo a atividade hemaglutinante do vírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1994).

Os soros foram titulados a partir de 1:20 até de 1:1280, sendo o ponto de corte (cut-off) 1:20. As respostas de anticorpos anti-arbovírus detectados nos equinos foram classificadas em RM aquelas amostras com presença de anticorpos com títulos \geq 1:20 para um alfavírus e reações heterotípicas ou RC as amostras com presença de anticorpos com títulos \geq 1:20 para mais de um arbovírus de um mesmo grupo.

Nos testes de IH realizados no Instituto Adolfo Lutz/SP não foram pesquisados anticorpos contra os bunyavírus e isto se refere as amostras procedentes dos inquéritos realizados em Santa Catarina e São Paulo.

Os resultados para flavivírus provenientes dos estados da Região Sul (RS, SC e PR) foram dados publicados por VIANNA (2010), entretanto neste estudo os flavivírus foram comparados com outros arbovírus detectados na região e também sob a sua importância no contexto nacional, frente aos diferentes enfoques epidemiológicos observados.

Variáveis estudadas

Os animais foram cadastrados por município e localidade, segundo o sexo, faixa etária (< 6 meses, 6 meses a \leq 1 ano, 1 a \leq 2 anos, 2 \leq a 5 anos, 5 a \leq 10 anos e >10 anos), espécie (equino, asinino, muar), utilidade (trabalho, esporte, passeio, reprodução e outras), o estado vacinal do animal e a motivação da realização do inquérito: município de fronteira, epizootia e feira agropecuária ou similar.

Para análise dos resultados observados no IH foram construídas tabelas de contingência, a partir da qual foram determinadas as prevalências estimadas segundo o tipo de anticorpo observado, considerando as variáveis acima.

Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra nos municípios de fronteira foi definido por conveniência e teve como limitação a capacidade do laboratório de processamento das amostras, disponibilidade dos proprietários dos animais e funcionários das fazendas para atender o grupo de profissionais que faziam a coleta de material, além do tempo de permanência da equipe de coleta em cada município.

Nos municípios de ocorrência de epizootias a amostragem foi de 100% dos animais das propriedades onde estavam ocorrendo epizootias. Nos eventos agropecuários foi coletado sangue de 100% dos animais no momento de entrada dos animais no parque de exposição.

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e confrontados pelo teste do qui-quadrado (X^2), admitindo-se nível de significância (α) de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade ($p < \alpha$). As análises foram implementadas utilizando o programa R 2.13 (<http://www.R-project.org>).

A associação entre a presença de anticorpos contra os vírus pertencentes aos três grupos de arbovírus considerados (*Flavivirus*, *Bunyavirus* e *Alfavirus*) e as variáveis “idade do animal” (< 1 ano, 1 a 5 anos e > 5 anos), “motivação do inquérito” e “utilidade do animal” foi analisada separadamente para cada um dos grupos de arbovírus, considerando que apresentam diferentes perfis epidemiológicos de transmissão. Para tanto, foi realizado inicialmente o teste do qui-quadrado para verificar a associação dessas variáveis com o desfecho em estudo. As variáveis que apresentaram associação com valor crítico de p inferior a 0,20 foram incluídas e testadas no modelo de regressão logística, a partir da qual foram calculados os respectivos *odds ratios* (OR) e intervalos de confiança a 95% (IC-95%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Participaram deste estudo 4.402 equídeos de um total de 6.394 existentes nas localidades de realização do estudo, onde se verificou uma média de 61 equídeos (1 – 720) amostrados por propriedade e uma mediana de dois animais por fazenda. No total, 93,7% (4125/4402) eram equinos, 4,9% (214/4402) eram muares e 1,4% (63/4402) asininos.

Considerando a utilidade, pode-se observar que dos animais nos quais foi possível resgatar a finalidade com que eram criados, 47,0% (1761/3743) serviam para o trabalho e lida diária das fazendas, 36,1% (1352/3743) para a prática do esporte, 11,2% (421/3743) para passeio, 4,3% (160/3743) para reprodução e 1,3% (49/3743) para outras utilidades.

Os municípios de fronteira contribuíram com 42,0% (1850/4402) dos animais que participaram do estudo, 32,0% (1406/4402) corresponderam a animais de áreas com ocorrência de epizootias e 26,0% (1146/4402) com animais que participavam de eventos agropecuários. Dos animais com histórico vacinal contra EE, 62,0% (1909/3078) não eram vacinados.

Do total de animais que participaram dos inquéritos, 33,3% (1466/4402) foram reagentes para um ou mais dos arbovírus pesquisados, sendo 20,6% (906/4402) para os flavivírus, seguido dos alfavírus com 14,1% (622/4402) e dos bunyavírus (444/4402) com 10,1% (Figura 2), onde se observa que a prevalência de animais reagentes para flavivírus foi significativamente maior quando comparada à dos demais grupos de arbovírus pesquisados ($p < 0,001$).

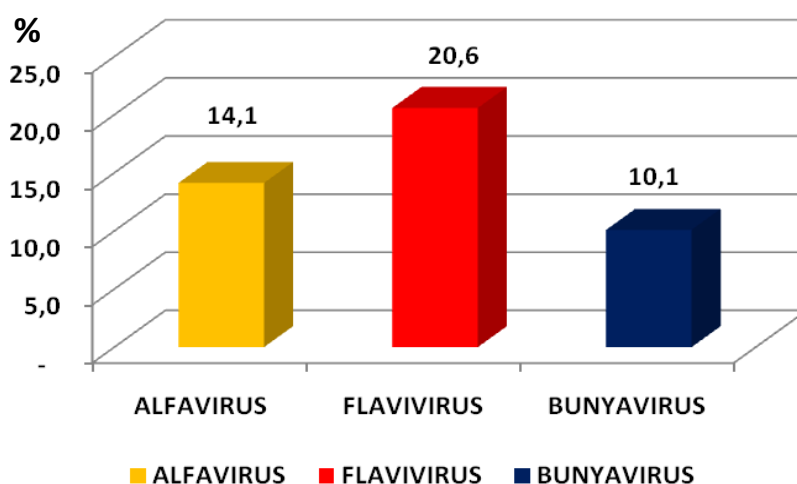


FIGURA 2 – Percentual de animais regentes ao teste de IH, detectados nos inquéritos sorológicos em equinos, segundo o grupo de vírus – Brasil, 2007 a 2009.

Quando comparadas as proporções dos animais positivos no teste, segundo o grupo de arbovírus, 61,8% (906/1466) foram reagentes para flavivírus, 42,4% (622/1466) para alfavírus e 30,2% (444/1466) para os bunyavírus pesquisados (Figura 3). A proporção de animais reagentes para flavivírus foi significativamente maior quando comparada com a proporção dos demais grupos de arbovírus ($p < 0,001$). Isto sugere uma maior dispersão dos flavivírus nesta população animal, e esta detecção está diretamente ligada predileção do vetor infectado por sangue de aves e de equinos. Esta informação é compartilhada por GOULD et al. (2003), quando se referem sobre a presença dos flavivírus em todos os continentes, com exceção da Antártida.

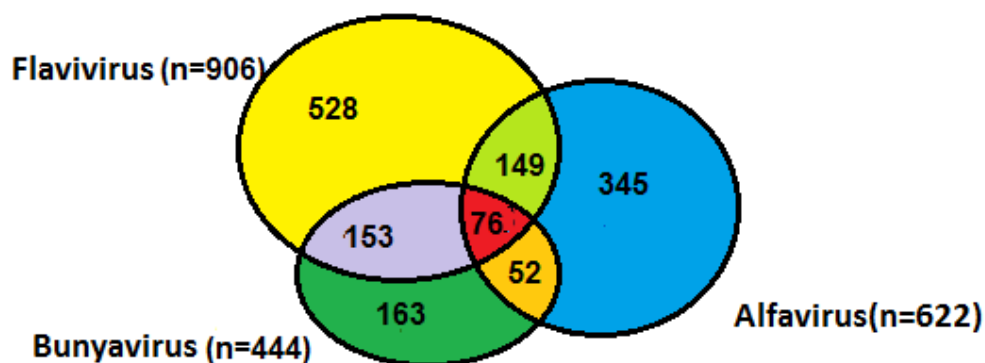


FIGURA 3 – Número de animais reagentes ao teste de IH, detectados nos inquéritos sorológicos em equinos, segundo o tipo de arbovírus e o tipo de reação (monotípica ou cruzada) – Brasil, 2007 a 2009.

Dos 1466 animais positivos, a proporção de reagentes para apenas um grupo de arbovírus foi de 70,7% (1036/1466), significativamente maior que a proporção de animais reagentes para dois ou três grupos ($p < 0,001$). Entre os reagentes para apenas um grupo de arbovírus, 50,9% (528/1036) foram positivos para flavivírus, 33,3% (345/1036) para alfavírus e 15,7% (163/1036) para bunyavírus, proporções significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$). Dos animais reagentes para dois grupos de arbovírus, 43,2% (153/354) positivaram para os flavivírus e bunyavírus simultaneamente, 42,9% (149/354) para os flavivírus e alfavírus e 14,7% (52/354) para os alfavírus e bunyavírus, observando-se menor frequência de associação entre alfavírus e bunyavírus em relação às demais ($p < 0,001$).

Considerando individualmente os arbovírus detectados no estudo, ocorreram 2875 reações, divididas entre as monotípicas e as inespecíficas ou reações cruzadas. Destas, 18,3% (525/2875) foram reagentes para o SLEV, seguida do EEEV com 15,2% (436/2875), ILHV com 13,7% (384/2875), MAGV com 12,8% (368/2875), WEEV com 12,6% (363/2875), flavivírus inespecíficos com 7,1% (203/2875), IGUV com 6,1% (175/2875), TCMV com 5,4% (156/2875), ROCV com 2,4% (68/2875), CACV e OROV com 1,9% (56/2875) cada, MUCV com 0,8% (23/2875), MAYV com 0,8% (22/2875), bunyavírus inespecíficos com 0,6% (16/2875) e alfavírus inespecíficos com 0,5% (14/2875) (Figura 4). A proporção de animais positivos para o SLEV foi significativamente maior quando comparada com a dos demais arbovírus ($p < 0,05$) e não houve diferença significativa entre a proporção de animais positivos para o ILHV e aqueles positivos para WEEV ($p > 0,05$), sugerindo assim uma maior circulação de anticorpos do SLEV no Brasil.

Os resultados demonstraram que além da maior frequência do EEEV, existe uma diversidade de arbovírus circulantes nas diversas regiões estudadas, em proporções diferentes. A baixa detecção de anticorpos para os bunyavírus pode estar ligada diretamente a sua presença ser maior na região norte do país, o mesmo acontecendo com o MAYV e MUCV.

Estudos descritos por KOTAIT et al. (1992), ACHA & SZYFRES (2003), FLORES (2007), RIET-CORREA et al. (2007) e CDC (2010) em várias partes das Américas demonstraram a presença de anticorpos e isolamento viral em equídeos dos mais diversos arbovírus de importância em saúde pública, como WNV, EEEV, WEEV, VEEV, SLEV, MAYV, OROV, o que determina, que estes resultados devem ser analisados sob o ponto de vista de que estes animais são importantes indicadores da presença de circulação dos vírus na área e que os mesmos não são fonte de dispersão do agente e nem de risco para a população ou para os animais

Em trabalho realizado na Amazônia Brasileira e no Mato Grosso do Sul, RODRIGUES et al., (2010) demonstraram que no teste de IH, 17,7% (248/1401) das amostras de soro foram RM, das quais 55,2% (137/248) foram reagentes contra SLEV. Foi detectada RC em 27,1% (380/1401) das amostras, resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, fato que confirma a elevada circulação e grande dispersão destes agentes nas diversas regiões do país.

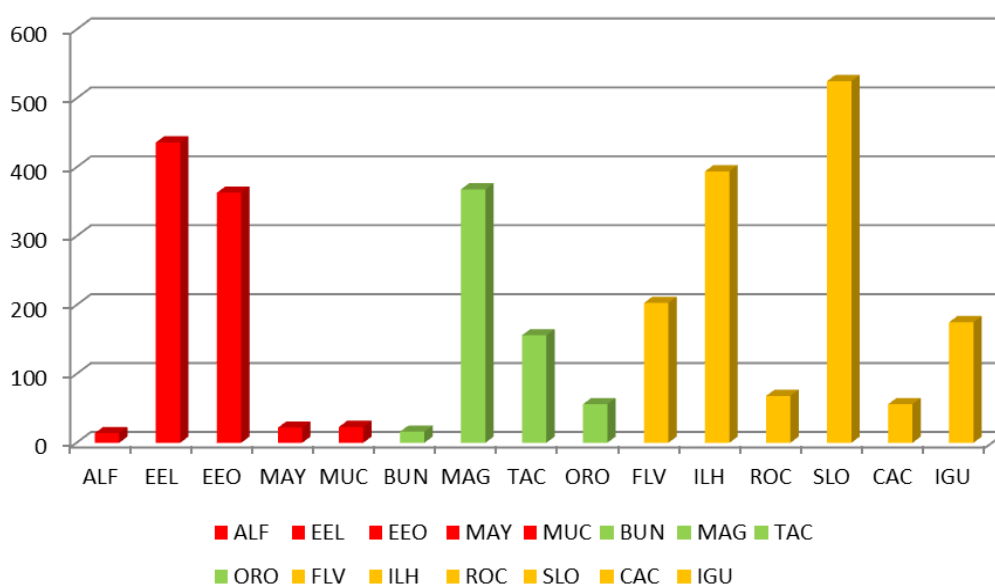


FIGURA 4 – Número de animais reagentes no teste de IH, detectados nos inquéritos sorológicos em equinos, segundo o tipo de arbovírus pesquisado – Brasil, 2007 a 2009.

Em relação ao sexo dos animais que participaram do estudo, não houve diferença significativa entre os animais reagentes, já que 50,6% dos reagentes (703/1388) eram fêmeas e 49,4% (685/1388) eram machos ($p>0,05$) (Figura 5).

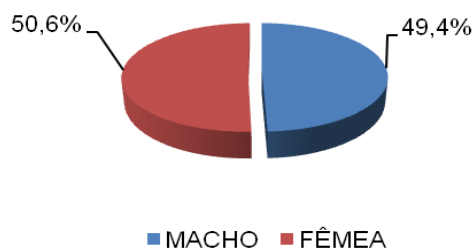


FIGURA 5 – Percentual de animais reagentes ao teste de IH, detectados nos inquéritos sorológicos em equinos, segundo o sexo do animal – Brasil, 2007 a 2009.

Dos 3942 animais dos quais foi possível determinar a idade, 33,6% (1323/3942) foram reagentes para os arbovírus pesquisados, entretanto pode-se observar que a proporção de animais reagentes para arbovírus na faixa etária entre “5 e 10 anos” foi significativamente maior quando comparada às demais categorias de idade ($p<0,001$). Considerando a proporção de animais reagentes para arbovírus segundo a faixa etária, a proporção de animais “> 10 anos” e de “5 a ≤ 10 anos” reagentes foi significativamente maior que nas demais categorias ($p<0,05$), e não houve diferença significativa entre estas duas categorias ($p=0,9$) (Tabela 2). Desta forma, observa-se que existe associação entre ser positivo ao teste e a idade do animal, o que sugere que a idade do animal pode ser um fator de risco para o contato com arbovírus, ou seja, quanto mais velho o animal, maior o risco de contato com um vetor infectado.

FERNANDEZ et al. (2000) e VIANNA (2010), em trabalhos realizados com equinos na Região Sul, corroboram com os resultados deste estudo. Diferentemente dos resultados obtidos, o estudo realizado por MARLENEE et al., (2004) no México demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre animais reagentes e não reagentes para os flavivírus em animais de uma mesma faixa etária, sugerindo a idade não ser um fator que possa ter contribuído para a positividade. Apesar de resultados divergentes, é sugestivo que a idade seja um fator de risco, tendo em vista o tempo de exposição.

TABELA 2 - Número de animais reagentes para o teste de IH, detectados nos inquéritos sorológicos em equinos, segundo a faixa etária e por faixa etária. Brasil, 2007 a 2009.

FAIXA ETÁRIA	Nº REAGENTES	% REAGENTES POR FAIXA ETÁRIA	% REAGENTES SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA	TOTAL
< 6 meses	22	1,7	23,9	92
6 meses a ≤ 1 ano	30	2,3	16,1	186
1 a ≤ 2 anos	140	10,6	21,2	660
2 a ≤ 5 anos	354	26,8	33,3	1063
5 a ≤ 10 anos	467	35,3	39,9	1171
> 10 anos	310	23,4	40,3	770
TOTAL	1323	100	33,6	3942

Quando foi considerada a utilidade do animal, pode-se observar que 53,1% (633/1050) dos animais reagentes eram utilizados para o trabalho diário das fazendas ou localidades, seguido dos animais para a prática do esporte com 31,0% (387/1050) e passeio com 10,9% (136/1050). A proporção de animais reagentes utilizados para o trabalho foi significativamente maior quando comparada com as demais categorias ($p < 0,001$). Entretanto, quando se observa a prevalência de animais reagentes dentro de cada utilidade, os animais de trabalho reagentes ao teste representaram 36,9% (633/1761), animais de passeio 32,3% (136/421) e de esporte 28,6% (387/1352) (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre ser reagente nos animais utilizados para trabalho, passeio e reprodução ($p > 0,05$). Desta forma, conclui-se que apesar de não existir associação entre ser positivo no teste dentro de cada utilidade do animal, existe uma importante diferença estatisticamente significativa entre as utilidades dos animais quando comparadas entre elas.

KOMAR (2003) e HAYES et al.(2005), consideram que a transmissão das arboviroses para os animais depende da abundância de vetores infectados, dos padrões de alimentação e ecológicos locais e do grau de exposição destes hospedeiros a insetos hematófagos. Assim, os animais utilizados para o trabalho e lida diária de uma fazenda, ou animais de carroceiros, aparentemente estão mais

sujeitos ao contato com o vetor infectado que um animal de passeio ou de esporte, que em sua maioria são animais que vivem estabulados e têm um deslocamento mais restrito, fato que explica as diferenças observadas quando comparados os animais reagentes entre as diversas categorias.

TABELA 3 - Número de animais reagentes para o teste de IH, detectados nos inquéritos sorológicos em equinos, segundo a utilidade e por utilidade. Brasil, 2007 a 2009.

UTILIDADE	Nº REAGENTES	% REAGENTES POR UTILIDADE	% REAGENTES SEGUNDO A UTILIDADE	TOTAL
TRABALHO	633	52,0	35,9	1761
ESPORTE	387	31,8	28,6	1352
PASSEIO	136	11,2	32,3	421
REPRODUÇÃO	48	3,9	30,0	160
OUTRO	14	1,1	28,6	49
TOTAL	1218	100,0	32,5	3743

Ao avaliar o percentual de reações positivas no estudo, observa-se que a proporção de reações nos municípios com ocorrência de epizootias foi de 42,7% (843/1972), seguido das reações nos municípios de fronteira com 29,1% (574/1972) e festa agropecuária com 28,1% (555/1972) (Tabela 4). A proporção de reações observadas nos municípios com epizootia foi significativamente maior quando comparada com as demais motivações para realização dos inquéritos ($p < 0,001$), fato que poderia ser esperado, mas é importante considerar a abundância observada de anticorpos de outros arbovírus diferente do causador da epizootia.

TABELA 4 – Número de reações positivas por grupo de arbovírus detectadas no teste de IH, segundo a motivação do inquérito sorológico.

	ALFAVÍRUS	%	FLAVIVÍRUS	%	BUNYAVÍRUS	%	TOTAL	%
EPIZOOTIA	242	28,7	421	49,9	180	21,4	843	42,7
MUNICÍPIO DE FRONTEIRA	126	22,0	315	54,9	133	23,2	574	29,1
FESTA AGROPECUÁRIA	254	45,8	170	30,6	131	23,6	555	28,1
TOTAL DE REAÇÕES							1972	100,0

Não houve diferença significativa entre as proporções de animais reagentes para os flavivírus nos municípios de fronteira e com ocorrência de epizootias ($p>0,05$) e nos eventos agropecuários, a proporção de reações positivas foi significativamente menor ($p<0,001$). Para os alfavírus, a proporção de reações foi significativamente maior em animais de eventos agropecuários ($p<0,001$), e para os bunyavírus não houve diferença entre as categorias ($p>0,05$).

Fato importante observado no estudo foi que apesar das epizootias registradas serem por alfavírus, o grupo de vírus mais encontrados nos municípios com epizootias foram os flavivírus, sugerindo uma circulação dos dois grupos de vírus na mesma área. A maior prevalência de anticorpos para os alfavírus em animais de eventos agropecuários sugere a dispersão deste vírus nas diversas regiões do País, tendo em vista a característica de deslocamento destes animais ser maior que dos animais de fronteira e de municípios de ocorrência de epizootia. Estes resultados respaldam, estudos realizados por MONATH et al. (1985), por FERNÁNDEZ et al. (2000) e por PAUVOLID-CORRÊA (2008).

Considerando os alfavírus, as variáveis “idade do animal” e “motivação do inquérito” apresentaram associação com o desfecho em estudo ($p<0,001$), enquanto que a variável “utilidade do animal” não apresentou associação ($p>0,20$) e, portanto não foi incluída no modelo final (Tabela 5).

A frequência dos alfavírus foi de 59,8% (347/1911) em animais com idade acima de cinco anos, em festa agropecuária e municípios de epizootias foi de 40,8% (254/1146) e 38,9% (242/1406), respectivamente, além da frequência de 47,2% (242/1761) e 36,3% (186/1352) em animais utilizados para o trabalho e esporte, demonstrou a vasta distribuição nos alfavírus nos Estados e que os perfis acima descritos sugerem serem fatores de risco para o contato com este grupo de vírus,

tendo em vista o tempo de exposição e facilidade de deslocamento para participarem de eventos esportivos ou feiras (Tabela 5).

Ponderando os animais reagentes para os alfavírus em municípios de ocorrência de epizootias, os animais com idade entre um e cinco anos apresentaram uma frequência de 19,2% (93/482), os maiores de cinco anos de 17,9% (122/679) e menores de um ano de 10,4% (15/144) com o $p < 0,05$. Portanto, não houve diferença significativa entre as idades, o que sugere que todos estiveram sob o mesmo risco de contato com o agente, tendo em vista que os inquéritos foram realizados logo após a ocorrência das epizootias (Tabela 5).

Nos eventos agropecuários, 30,6% (45/147) dos animais com mais de cinco anos foram reagentes para os alfavírus, 17,1% (100/582) daqueles em idade entre um a cinco anos e 13,3% (2/15) menores de um ano também foram reagentes ao teste, ($p < 0,001$), sugerindo que nestas condições a idade, devido ao tempo de exposição do animal no meio ambiente se apresentou um fator de risco para a positividade no teste (Tabela 5).

TABELA 5 - Frequência de animais segundo a presença de anticorpos contra os vírus do gênero *Alfavírus*, e valores do p para seleção de variáveis a compor o modelo de regressão logística.

Variável	Não Reagente		Reagente		Total		p
	N	%	N	%	N	%	
Idade							
< 1 ano	261	7,8	17	2,9	278	7,1	0,000
1 a ≤ 5 anos	1507	45,2	216	37,2	1723	44,0	
> 5 anos	1564	46,9	347	59,8	1911	48,8	
Total	3332	100,0	580	100,0	3912	100,0	
Motivação							
Fronteira	1724	45,6	126	20,3	1850	42,0	0,000
Evento agropecuário	892	23,6	254	40,8	1146	26,0	
Epizootia	1164	30,8	242	38,9	1406	31,9	
Utilidade							
Esporte	1166	36,7	186	36,3	1352	36,6	0,865
Passeio	357	11,2	64	12,5	421	11,4	
Trabalho	1519	47,8	242	47,2	1761	47,7	
Produção	139	4,4	21	4,1	160	4,3	

Os animais cujas motivações dos inquéritos foram eventos agropecuários e epizootias apresentaram maior chance de serem reagentes contra alfavírus do que aqueles provenientes de municípios de fronteira, apresentando OR de 3,52 e 2,69, respectivamente. Os resultados obtidos para a variável “idade do animal” demonstraram um efeito dose-resposta, com incremento significativo do OR à medida que a idade dos animais aumenta, sugerindo ser a idade um fator de risco para a infecção para os alfavírus (Tabela 6).

TABELA 6 - Modelo de regressão logística entre os animais reagentes para *Alfavírus* no teste de IH e as variáveis selecionadas ($p < 0,20$).

Variáveis	OR ¹	IC95% ²	p
Motivação			
Fronteira	1,00		
Evento agropecuário	3,52	2,76-4,48	0,00
Epizootia	2,69	2,11-3,41	0,00
Idade			
< 1 ano	1,00		
1 a ≤ 5 anos	1,95	1,16-3,28	0,01
> 5 anos	3,15	1,89-5,25	0,00

¹Odds ratio

² Intervalo de confiança a 95%

Quanto ao gênero *Bunyavírus*, todas as variáveis analisadas apresentaram associação com o desfecho em estudo ($p < 0,20$), com destaque para a variável “motivação”, que apresentou valor de $p < 0,001$ (Tabela 7). As variáveis foram adicionadas em ordem de significância estatística: motivação do inquérito, idade do animal e utilidade do animal.

Considerando os animais reagentes para os bunyavírus em municípios de ocorrência de epizootias, os animais com idade entre um e cinco anos apresentaram uma frequência de 16,6% (80/482), os maiores de cinco anos de 12,0% (82/679) e menores de um ano de 7,6% (11/144) com o $p < 0,05$. Portanto, não houve diferença significativa nos animais reagentes para os bunyavírus considerando as idades dos animais em áreas de epizootias, tendo em vista que as epizootias ocorridas na área foram pelo EEEV, sugerindo que a circulação deste agente pode não ser recente.

Fato de relevância a ser considerado é que apesar deste grupo de vírus ser bastante descrito na Região Norte do Brasil, o resultado mostrou sua presença em outras regiões do País independentes da motivação do inquérito, sugerindo uma possível disseminação deste agente por meio de vetores e reservatórios. A menor quantidade de vetor dos bunyavírus em determinadas áreas de realização dos inquéritos é um fator que, em conjunto com a baixa predileção por sangue de equinos pode ter interferido para uma menor detecção de anticorpos nos animais testados, se comparado com os outros dois grupos de vírus pesquisados.

TABELA 7 - Frequência de animais segundo a presença de anticorpos contra os vírus do gênero *Bunyavirus*, e valores de p para seleção de variáveis a compor o modelo de regressão logística.

Variável	Não Reagente		Reagente		Total		p
	N	%	N	%	N	%	
Idade do animal							
< 1 ano	262	7,4	16	4,1	278	7,1	0,033
1 a ≤ 5 anos	1555	44,1	168	43,2	1723	44,0	
> 5 anos	1706	48,4	205	52,7	1911	48,8	
Motivação do inquérito							
Fronteira	1717	43,4	133	30,0	1850	42,0	0,000
Evento agropecuário	1015	25,6	131	29,5	1146	26,0	
Epizootia	1226	31,0	180	40,5	1406	31,9	
Utilidade do animal							
Esporte	1249	37,2	103	30,8	1352	36,6	0,101
Passeio	382	11,4	39	11,7	421	11,4	
Trabalho	1582	47,1	179	53,6	1761	47,7	
Produção	147	4,4	13	3,9	160	4,3	

Animais cujos inquéritos foram motivados por eventos agropecuários ou epizootias apresentaram maior chance de serem reagentes contra anticorpos resultantes de infecções por bunyavírus do que aqueles provenientes de municípios de fronteira, apresentando OR de 1,69 e 2,66, respectivamente (Tabela 8). Isto pode ter sido observado devido os municípios de fronteira estar localizados nas regiões sul e centro-oeste do país, onde estes vírus são pouco descritos. Entretanto, se faz

necessária também a realização de estudos correlacionando com a presença de potenciais vetores desses vírus na área de fronteira.

Os resultados obtidos para a variável “idade do animal” demonstraram um efeito dose-resposta, com incremento do OR à medida que a idade dos animais aumenta. Entretanto, apenas a categoria “> 5 anos” esteve significativamente associada à presença de anticorpos contra bunyavírus (OR=1,87) quando comparada com a categoria “< 1 ano” (*baseline*). Neste caso, está bastante sugestivo que os animais mais velhos se expuseram ao vírus por mais tempo. A variável “utilidade do animal” não apresentou associação significativa com o desfecho em estudo. Apesar disso, optou-se por deixá-la no modelo como variável de ajuste (Tabela 8).

TABELA 8 - Modelo de regressão logística entre os animais reagentes para *Bunyavírus* no teste de IH e as variáveis selecionadas ($p < 0,20$).

Variáveis	OR ¹	IC 95% ²	<i>p</i>
Motivação do inquérito			
Fronteira	1,00		
Evento agropecuário	1,69	1,20-2,38	0,00
Epizootia	2,66	2,00-3,55	0,00
Idade do animal			
< 1 ano	1,00		
1 a ≤ 5 anos	1,69	0,93- 3,06	0,09
> 5 anos	1,87	1,04-3,37	0,04
Utilidade			
Esporte	1,00		
Passeio	0,97	0,63-1,49	0,90
Trabalho	1,13	0,85-1,50	0,40
Produção	1,11	0,58-2,13	0,75

¹Oddsratio ² Intervalo de confiança a 95%

Para os flavivírus, todas as variáveis analisadas apresentaram associação com o desfecho em estudo ($p < 0,001$). As variáveis foram adicionadas em ordem de significância estatística: motivação do inquérito, idade do animal e utilidade do animal (Tabela 9).

Considerando a motivação dos inquéritos e a idade do animal, pode-se observar que nos municípios de ocorrência de epizootias não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as prevalências de animais positivos segundo a faixa etária, onde em animais > 5 anos foi de 31,6% (215/679), em animais de idade entre um a cinco anos foi de 31,3% (151/482) e em menores de um ano foi de 20,8% (30/144). Estas informações não diferem dos resultados observados para os alfavírus, onde a idade não foi um fator de risco devido à presença do vírus no momento do inquérito e neste caso parece ser mais devido a elevada e permanente circulação deste vírus na área.

TABELA 9 - Presença de anticorpos para o gênero *Flavivírus* e valor de *p* para seleção de variáveis a compor o modelo de regressão logística.

Variável	Não Reagente		Reagente		Total		p
	N	%	N	%	N	%	
Idade							
< 1 ano	243	7,9	35	4,3	278	7,1	0,000
1 a ≤ 5 anos	1419	45,9	304	37,1	1723	44,0	
> 5 anos	1430	46,2	481	58,7	1911	48,8	
Motivação							
Fronteira	1535	43,9	315	34,8	1850	42,0	0,000
Evento agropecuário	976	27,9	170	18,8	1146	26,0	
Epizootia	985	28,2	421	46,5	1406	31,9	
Utilidade							
Esporte	1122	38,4	230	29,8	1352	36,6	0,000
Passeio	342	11,7	79	10,2	421	11,4	
Trabalho	1333	45,6	428	55,4	1761	47,7	
Produção	125	4,3	35	4,5	160	4,3	

Animais cujos inquéritos foram motivados por eventos agropecuários apresentaram efeito protetor em relação àqueles cuja motivação foi município de fronteira, enquanto que aqueles animais amostrados durante epizootias apresentaram maior chance de serem reagentes para anticorpos contra Flavivírus, com OR de 0,70 (0,54-0,90) e 2,22 (1,84-2,69), respectivamente. Este efeito protetor parece ser devido a baixa frequência dos flavivírus nos municípios onde foram feitos

inquéritos motivados por eventos agropecuários, ou pouca presença do vetor infectado, já que os estados foram os mesmos dos municípios de fronteira. Entretanto, se faz necessário estudo em aves silvestres, aves domésticas e vetores para confirmar o proposto acima (Tabela 10).

Assim como os demais grupos de arbovírus, a variável “idade do animal” demonstrou um efeito dose-resposta, com incremento significativo do OR à medida que a idade dos animais aumenta. A chance de um animal > 5 anos se infectar com os flavivírus foi quase duas vezes maior do que animais entre um a cinco anos, demonstrando que o maior tempo de exposição, associados à presença do vírus e do mosquito vetor na área foram os fatores desencadeadores da infecção.

A variável “utilidade do animal” não apresentou associação significativa com o desfecho em estudo, exceto pela categoria “passeio”, que apresentou efeito protetor em relação às demais categorias (Tabela 10), fato que difere dos resultados de VIANNA (2010), que demonstrou a existência uma relação entre a utilidade e se infectar com os flavivírus na Região Sul do Brasil.

TABELA 10 - Modelo de regressão logístico para reagentes aos anticorpos por *Flavivírus*.

Variáveis	OR ¹	IC 95% ²	p
Motivação			
Fronteira	1,00		
Evento agropecuário	0,70	0,54-0,90	0,01
Epizootia	2,22	1,84-2,69	0,00
Idade			
< 1 ano			
1 a ≤ 5 anos	1,71	1,14-2,57	0,01
> 5 anos	2,43	1,63-3,64	0,00
Utilidade			
Esporte			
Passeio	0,67	0,49-0,92	0,01
Trabalho	1,10	0,90-1,35	0,35
Produção	0,98	0,64-1,51	0,93

¹Odds ratio

² Intervalo de confiança a 95%

PHOUTRIDES et al. (2010), em estudo realizado em Porto Rico, demonstraram a importância da utilização de equinos para a vigilância dos arbovírus, em especial para aqueles que estes animais apresentam manifestação clínicas, como o EEEV, WEEV, VEEV e WNV.

Acrescenta-se aos dados a proporção de animais reagentes nos municípios de ocorrência de epizootias pelo EEEV, pesquisados no teste de IH, onde foi maior no Ceará com 32,1% (186/580), seguido da Paraíba com 21,0% (122/580), Pará e São Paulo com 18,6% (108/580) e 18,3% (106/580), respectivamente. A proporção de animais reagentes para arbovírus no Ceará foi significativamente maior quando comparada à dos demais Estados ($p < 0,001$). Entretanto não houve diferença significativa entre as proporções observadas na Paraíba, no Pará e em São Paulo ($p > 0,05$). Quando analisado o percentual de positividade em cada inquérito, o Ceará apresentou 61,0% (186/305) de animais reagentes para os arbovírus, seguido da Paraíba com 53,9% (122/226), Pará com 36,4% (108/297) e São Paulo com 33,2% (106/319), demonstrando não haver diferença significativa entre o percentual de animais reagentes no Ceará e aqueles reagentes na Paraíba ($p > 0,05$), mas foi significativa a diferença quando comparada às observadas no Ceará e Paraíba com os demais estados ($p < 0,001$) (Tabela 11).

Estudos realizados por PEREIRA et al., (1964) encontraram anticorpos neutralizantes e hemaglutinantes em sete equinos 33,3% (6/18) em epizootia pelo EEEV ocorrida em Itaporanga/SP; e FERNANDEZ et al. (2000) relataram uma epizootia em equinos do Paraná onde foram demonstrados a presença de anticorpos do EEEV em todos os animais testados. Estes resultados se assemelham aos observados neste estudo, que determinou elevadas prevalências de anticorpos contra o vírus causador da epizootia na área.

Nos municípios de fronteira, o RS apresentou uma proporção de 38,3% (175/457) de positividade para os arbovírus estudados a frente do MS com 35,9% (164/457). Não houve diferença significativa entre as proporções de animais reagentes para arbovírus no RS e aqueles do MS ($p > 0,05$). Quando comparados separadamente, o RS apresentou uma prevalência de 28,3% (175/619), enquanto o MS de 24,8% (164/661) e o PR foi de 22,9% (89/389) demonstrando não haver diferença significativa entre a prevalência de animais reagentes no RS e aqueles

reagentes no MS e no PR ($p>0,05$), sugerindo que ser município de fronteira não é um fator de risco para o contato com os arbovírus pesquisados (Tabela 11).

Nos municípios de fronteira, ocorreu a menor detecção de anticorpos dos arbovírus pesquisados quando comparada com as outras motivações dos inquéritos e isto se deve aparentemente às peculiaridades dos locais e da região, a facilidade de proliferação dos mosquitos vetores, a presença de aves silvestres infectadas, ao tipo de criação dos animais, associados ao pouco deslocamento dos mesmos para outras regiões.

Nos três inquéritos realizados em eventos agropecuários, 56,2% (241/429) dos animais reagentes eram do MS, seguido do PR com 30,1% (129/429) e o RS com 13,7% (59/429). A proporção de animais reagentes para arbovírus no MS foi significativamente maior quando comparada à dos demais estados ($p<0,001$). Entretanto, os animais do PR foram os que apresentaram um maior percentual de animais reagentes ao teste com 43,7% (129/295), seguido do MS com 42,9% (241/562). Não houve diferença significativa entre o percentual de animais reagentes no PR quando comparados com aqueles reagentes no Mato Grosso do Sul ($p>0,05$) (Tabela 11). Estudos considerando outras variáveis precisam ser realizados para auxiliar a hipótese de que o deslocamento é um fator de risco para o contato com a diversidade de arbovírus encontrados no país.

Por fim, os resultados sugerem que a motivação da realização do inquérito foi um fator determinante para a detecção de uma maior quantidade de animais reagentes aos arbovírus estudados, seja pela ocorrência de epizootia devido à eminente circulação do vírus ou de evento agropecuário tendo em vista a facilidade de deslocamento dos animais que participam de eventos agropecuários.

TABELA 11 - Número de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo a motivação do inquérito sorológico.

		MS	PR	RS	BA	SC	SP	CE	PA	PB	TOTAL
EPIZOOTIA	Nº REAGENTES	0	0	0	58	0	106	186	108	122	580
	TOTAL	0	0	0	255	0	319	305	297	226	1406
	% REAGENTES POR UF	-	-	-	10,0	-	18,3	32,1	18,6	21,0	100,0
	% REAGENTES SEGUNDO A UF	-	-	-	22,7	-	33,2	61,0	36,4	53,9	-
MUNICÍPIO DE FRONTEIRA	Nº REAGENTES	164	89	175	0	29	0	0	0	0	457
	TOTAL	661	389	619	0	181	0	0	0	0	1850
	% REAGENTES POR UF	35,9	19,5	38,3	-	6,3	-	-	-	-	100,0
	% REAGENTES SEGUNDO A UF	24,8	22,9	28,3	-	16,0	-	-	-	-	-
FESTA AGROPECUÁRIA	Nº REAGENTES	241	129	59	0	0	0	0	0	0	429
	TOTAL	562	295	289	0	0	0	0	0	0	1146
	% REAGENTES POR UF	56,2	30,1	13,7	-	-	-	-	-	-	100,0
	% REAGENTES SEGUNDO A UF	42,9	43,7	20,4	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	Nº REAGENTES	405	218	234	58	29	106	186	108	122	1466
	TOTAL	1223	684	908	255	181	319	305	297	230	4402
	% REAGENTES POR UF	27,6	14,9	16,0	4,0	2,0	7,2	12,7	7,4	8,3	100,0
	% REAGENTES SEGUNDO A UF	33,1	31,9	25,8	22,7	16,0	33,2	61,0	36,0	53,0	-

Assim, os resultados demonstram a ampla distribuição de anticorpos destes vírus e eles aquiescem com a recomendação da OPAS (1983) a qual demonstra a importância das doenças transmitidas por artrópodes para a saúde

pública nas Américas e estudos anteriores realizados em humanos e vertebrados silvestres, nos quais também são observadas elevadas prevalências de anticorpos desses patógenos (FERNANDEZ et al., 2000; ARAUJO et al., 2003; TORRES et al., 2004; ARAUJO et al., 2004; ARAUJO et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007; PAULOVID-CORRÊA, 2008; MEDEIROS, 2009).

Ponderando os arbovírus pesquisados por UF, pode-se observar no município de Camaçari/BA, local de ocorrência de epizootia sem etiologia conhecida, uma prevalência de 22,7% (58/255), sendo 11,7% (30/255) para os alfavírus, 10,6% (27/255) para bunyavírus e 5,5% (14/255) para os flavivírus. A diferença foi estatisticamente significativa, entre a proporção de animais reagentes para os alfavírus e bunyavírus, quando comparados com a proporção observada para os flavivírus ($p < 0,001$), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção observada de animais reagentes para os alfavírus e bunyavírus ($p > 0,05$), demonstrando uma maior circulação de anticorpos destes dois vírus.

Os animais reagentes para alfavírus, não apresentavam histórico de vacinação contra as EE. Do total de reações registradas 91,6% (21/23) foram RM para o EEEV, 8,7% (2/23) para a o WEEV e 23,3% (7/30) foram RC (Tabela 12). A diferença entre a proporção de RM foi estatisticamente significativa quando comparada com as RC ($p < 0,001$). Entre as RM a proporção de animais reagentes para o EEEV foi significativamente maior que a dos demais alfavírus ($p < 0,001$).

Em decorrência da epizootia ocorrida pelo EEEV nos municípios de Várzea Alegre e Jaguaribe, no Ceará, observou-se uma prevalência de 60,9% (81/305) para os arbovírus pesquisados, dos quais 51,8% (158/305) foram reagentes para os flavivírus, 26,5% (81/305) para os alfavírus e 21,9% (67/305) para os bunyavírus, com diferença significativa na proporção de animais reagentes entre o grupo dos flavivírus e os demais ($p < 0,001$). Dos animais positivos para alfavírus, 100% não tinham histórico de vacinação prévia contra as EE, 45,7% (37/81) apresentaram reações monotípicas, 97,3% (36/37) para o EEEV e 2,7% (1/37) para o WEEV, com diferença entre as reações para o EEEV e o WEEV foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre as RC e as RM ($p > 0,05$).

Na Paraíba, do total de animais, foram positivos no teste de IH para flavivírus 67,6% (127/188), 56,4% (106/188) para alfavírus e 54,3% (102/188) para bunyavírus, não demonstrando diferença significativa entre a prevalência encontrada para os flavivírus quando comparado com os outros grupos de arbovírus ($p=0,07$), apesar de esta epizootia ter sido caracterizada como pelo alfavírus do tipo Leste, o que indica a circulação dos três grupos dos vírus na região, fato este também observado na epizootia pelo EEEV ocorrida no Ceará, sugerindo não haver disputa entre os grupos distintos de vírus, podendo circular simultaneamente na mesma área e nos mesmos animais simultaneamente.

Com relação aos alfavírus detectados, 37,7% (40/188) apresentaram RM e destas, 90,0% (36/40) para o EEEV, 5,0% (2/40) para o WEEV e 5,00% (2/40) para o VMUC, demonstrando uma diferença significativa entre os EEEV e os WEEV e VMUC (Tabela 12). A proporção de RC foi de 62,3% (66/127), que foi proporcionalmente maior que as reações monotípicas ($p<0,02$), demonstrando um grande percentual de RC no teste e o cuidado que deve ser observado pelos pesquisadores no momento da análise dos resultados laboratoriais.

A prevalência observada no do teste de IH para os arbovírus estudados a partir da epizootia pelo EEEV ocorrida no município de Cachoeira do Arari/PA foi de 35,7% (106/297). Do total de animais que participaram do inquérito 25,2% (75/297) foram reagentes para os flavivírus, 11,8% (35/297) para os bunyavírus e 8,4% (25/297) para os alfavírus, e a diferença foi estatisticamente significativa para os flavivírus quando comparada com os outros grupos de vírus, apesar da epizootia ter sido causada pelo EEEV, o que demonstrou a uma alta circulação dos três grupos de vírus com uma maior circulação do flavivírus, apesar da epizootia na área ter ocorrido a partir do EEEV.

Entretanto, considerando as RM para os alfavírus, o EEEV representou 87,5% (14/16) e o WEEV somente 12,5% (2/16) com $p<0,001$. Não houve diferença estatística entre as RM e RC que representaram 64,0% (16/25) e 36,0% (9/25) do total de animais reagentes para este grupo de vírus ($p=0,09$).

TABELA 12 - Número e percentual de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo o tipo de alfavírus e tipo de reação, nas Unidades Federadas de ocorrência de epizootia.

	PB	%	PA	%	SP	%	CE	%	BA	%	TOTAL	%
TOTAL ANIMAIS	226		297		319		305		255		1402	
TOTAL REAGENTES	122	54	106	35,7	106	33,2	186	61	58	22,7	578	41,2
REAGENTES ALFAVIRUS	64	28,3	25	8,4	40	12,5	81	26,6	30	11,8	240	17,1
RM	25	39,1	16	64	34	85	37	45,7	23	76,7	135	56,3
EEEV	20	80	14	87,5	26	76,5	36	97,3	21	91,3	117	86,7
WEEV	5	20	2	12,5	8	23,5	1	2,7	2	8,7	18	13,3
MAYV	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
MUCV	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
RC	39	60,9	9	36	6	15	44	54,3	7	23,3	105	43,8

No Ceará, os animais reagentes para os bunyavírus, 85,0% (57/67) apresentaram RM, destas 49,1% (28/57) foram reagentes para o MAGV, seguido do TCMV com 40,3% (23/57) e o OROV com 10,5% (6/57) (Tabela 13), onde se pode observar que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre a presença de anticorpos do MAGV e o VTCM ($p > 0,05$), entretanto quando comparados com o OROV esta diferença foi significativa ($p < 0,001$), sugerindo uma maior circulação dos dois primeiros bunyavírus na área.

Enquanto que na Paraíba, para os bunyavírus, 39,2% (40/102) apresentaram RM, sendo 70,0% (28/40) para o MAGV, 15,0% (6/40) para o OROV e para o TCMV. Portanto, as RC apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com as RM e entre as RM, o MAGV apresentou uma diferença estatisticamente significativa frente os demais bunyavírus ($p < 0,001$).

Dos animais reagentes monotipicamente para os bunyavírus no Pará, 53,1% (17/32) foram positivos para o OROV, 43,7% (14/32) para o MAGV e somente 3,1% (1/32) para o TCMV (Tabela 13). Portanto não houve diferença estatística entre os OROV e MAGV ($p = 0,61$), entretanto a proporção de animais reagentes para os dois foram estatisticamente diferente quando comparada com o TCMV ($p < 0,001$)

TABELA 13 - Número e percentual de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo o tipo de bunyavírus e tipo de reação, nas Unidades Federadas de ocorrência de epizootia.

	PB	%	PA	%	SP	%	CE	%	BA	%	TOTAL	%
REAGENTES BUNYAVIRUS	49	21,7	35	11,8	0	-	67	22	27	10,6	178	12,7
RM	46	93,9	32	91,4	0	-	57	85,1	21	77,8	156	87,6
MAGV	29	63	14	43,8	0	-	28	49,1	5	23,8	76	48,7
TCMV	6	13	1	3,1	0	-	23	40,4	16	76,2	46	29,5
OROV	11	23,9	17	53,1	0	-	6	10,5	0	-	34	21,8
RC	3	6,1	3	8,6	0	-	10	14,9	6	22,2	22	12,4

No que se refere aos flavivírus na Paraíba, 84,4% (31/127) apresentaram RM, sendo 90,3% (28/31) para o SLEV e 9,7% (3/21) para o ILHV. Portanto, as RC apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com as RM e entre as RM, o SLEV apresentou uma diferença estatisticamente significativa frente os demais flavivírus ($p < 0,001$).

No Pará, as RM para os flavivírus representaram 52,0% (39/75) do total de animais reagentes para o grupo. Não houve diferença estatística com relação as RC ($p < 0,001$), contudo das RM, o ILHV representou 82,0% (32/39) entre os positivos do grupo e foi estatisticamente diferente da proporção de animais reagentes para o SLEV que apresentou uma proporção de 17,9% (7/39) ($p < 0,001$).

TABELA 14 - Número e percentual de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo o tipo de flavivírus e tipo de reação, nas Unidades Federadas de ocorrência de epizootia.

	PB	%	PA	%	SP	%	CE	%	BA	%	TOTAL	%
REAGENTES FLAVIVIRUS	90	39,8	75	25,3	82	25,7	158	51,8	14	5,5	419	29,9
RM	29	32,2	39	52	21	25,6	28	17,7	8	57,1	125	29,8
ILHV	3	3,3	32	42,7	10	12,2	4	2,5	0	-	49	11,7
ROCV	0	-	0	-	0	-	0	-	1	12,5	1	0,8
SLEV	25	86,2	7	17,9	6	28,6	14	50	7	87,5	59	47,2
CPCV	1	3,4	0	-	0	-	10	35,7	0	-	11	8,8
IGUV	0	-	0	-	5	23,8	0	-	0	-	5	4
RC	61	67,8	36	48	61	74,4	130	82,3	6	42,9	294	70,2

Estudos realizados por IVERSSON et al. (1981), IVERSSON et al. (1982), IVERSSON et al. (1989), DEGALLIER et al. (1992), STRAATMANN et al. (1997), SHOPE et al. (2002), PAULOVID-CORREA (2008), VIANNA (2009), RODRIGUES et al. (2010) em várias regiões do Brasil, e DIAZ et al. (2008) na Argentina demonstraram elevadas prevalências para os diversos arbovírus pesquisados, ratificando os resultados deste estudo e demonstrando a capacidade destes agentes em causar epizootias.

A prevalência de animais reagentes encontrada em São Paulo foi de 33,2% (106/319) a partir do inquérito sorológico realizado em decorrência de epizootia pelo EEEV ocorrida no município de Campinas/SP. Dentre os reagentes, 25,7% (82/319) foram para os flavivírus e 12,5% (40/319) para os alfavírus (Tabela 15), demonstrando uma diferença estatisticamente significativa apesar da causa da epizootia ter sido pelo EEEV ($p < 0,001$).

As RM observadas para os alfavírus, em São Paulo, também apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com as RC ($p < 0,001$); com 85,0% (34/80) e 15,0% (6/80) respectivamente, e entre as RM a proporção de animais positivos para o EEEV foi de 76,4% (26/34) e para o WEEV foi de 23,5% (8/34) (Tabela 15), com $p < 0,001$, demonstrando uma maior circulação do primeiro quando comparado com o WEEV. Mesmo assim, é bastante sugestiva a circulação dos EEEV e WEEV em locais diferentes devido à competitividade entre os vírus de um mesmo grupo em um mesmo ambiente.

No Mato Grosso do Sul, a prevalência de animais reagentes observada no estudo foi de 33,1% (405/1223) para os arbovírus estudados, sendo maior entre os animais de feira agropecuária (Rio Verde do Mato Grosso/MS e Tacuru/MS) com 36,5% (241/661), o que demonstrou ser estatisticamente mais significativo do que nos animais de fronteira (Ponta Porã/MS), que apresentaram uma prevalência de 29,2% (164/562) ($p < 0,01$). Neste caso, os animais de feiras agropecuárias apresentaram uma média de idade maior que os de fronteira e associado a facilidade de deslocamento para diversas partes do país, parecem ter sido os fatores contributivos para a maior prevalência de anticorpos anti-arbovírus nos animais que participam de feiras agropecuárias.

Considerando os grupos de arbovírus pesquisados no Paraná, a proporção de animais reagentes foi maior para os alfavírus com 54,3% (70/129), seguida dos bunyavírus com 42,6% (55/129) e flavivírus com 41,1% (53/129). Contudo, para os animais reagentes contra os alfavírus pode-se observar diferença significativa maior entre os resultados obtidos nos animais de feiras agropecuárias, quando comparados com os de fronteira ($p < 0,001$) e o inverso pode ser observado com os animais reagentes para os flavivírus, onde a diferença significativa foi maior entre os de fronteira quando comparados com os de eventos agropecuários.

A proporção de animais reagentes para os alfavírus no Rio Grande do Sul, no evento agropecuário foi de 72,9% (43/59) e nos municípios de fronteira foi de somente de 16,0% (28/175) (Tabela 15), diferença estatisticamente significativa quando comparada as duas motivações, sugerindo que os animais de eventos agropecuários estão mais sob o risco de ter contato com os alfavírus do que os animais de municípios de fronteira ($p < 0,001$).

Estudos recentes realizados por PAULOVID-CORREA (2008), RODRIGUES et al. (2010) e VIANNA (2010), demonstraram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, apontando que mesmo em áreas sem ocorrência de epizootias em equinos existe uma elevada circulação desses arbovírus.

TABELA 15 - Número de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo o tipo de alfavírus e tipo de reação, nas Unidades Federadas de ocorrência de eventos agropecuários e de municípios de fronteira.

	RIO GRANDE DO SUL				PARANÁ				MATO GROSSO DO SUL				S. CATARINA	
	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT.	%	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT	%	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT	%	MUNIC. FRONT	%
Nº ANIMAIS	289		619		295		389		661		562		181	
REAGENTES	59	20,4	175	28,3	129	43,7	89	22,9	241	36,5	164	29,2	29	16
REAG. ALFA	43	72,9	28	16	70	54,3	27	30,3	141	58,5	70	42,7	1	3,4
RM	36	83,7	20	71,4	37	52,9	14	51,9	84	59,6	54	77,1	1	100
EEEV	1	2,8	2	10	13	35,1	6	42,9	46	54,8	34	63	1	100
WEEV	33	91,7	6	30	24	64,9	8	57,1	34	40,5	18	33,3	0	-
MAYV	1	2,8	0	-	33	47,1	13	48,1	4	4,8	1	1,9	0	-
RC	7	16,3	8	28,6	55	42,6	32	36	57	40,4	16	22,9	0	-

Com relação às RM para os bunyavírus, no Paraná, destaca-se a alta proporção de anticorpos observados para os MAGV e TCMV nos eventos agropecuários e nos municípios de fronteira, e para os flavivírus o SLEV foi proporcionalmente o mais encontrado com 96,9% (31/32) das RM nos eventos agropecuários com 87,5% (14/16) nos municípios de fronteira, conforme já relatado por VIANNA (2010), corroborando com o descrito acima e com alguns estudos realizados na Argentina por MONATH et al. (1985) com 57,9% de positividade, PAULOVID-CORRÊA (2008) no MS com 42,9%; até estudos mais atuais onde existem relatos de casos humanos.

No Rio Grande do Sul, para os bunyavírus, as RM representaram 91,4% (74/81) do total de reagentes para este grupo de vírus, e dentre elas o MAGV apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparada a proporção de animais regentes nos municípios de fronteira com 87,3% (55/63) com os animais de festa agropecuária ($p < 0,001$).

TABELA 16 - Número de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo o tipo de bunyavírus e tipo de reação, nas Unidades Federadas de ocorrência de eventos agropecuários e de municípios de fronteira.

	RIO GRANDE DO SUL				PARANÁ				MATO GROSSO DO SUL				S. CATARINA	
	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT.	%	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT	%	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT	%	MUNIC. FRONT	%
RM	11	100	63	90,0	20	48,8	20	69	50	76,9	28	90,3	0	-
MAGV	4	36,4	55	87,3	21	51,2	8	27,6	25	50	19	67,9	0	-
TCMV	4	36,4	1	1,6	0	-	1	3,4	25	50	7	25	0	-
OROV	3	27,3	6	9,5	14	25,5	3	9,4	1	2	2	7,1	0	-
RC	0	-	7	10,0	53	41,1	58	65,2	15	23,1	3	9,7	0	-

No inquérito sorológico de Santa Catarina se obteve uma prevalência de 16,0% (29/181) para os arbovírus estudados e 100,0% (29/29) deles foram reagentes para os flavivírus (Tabela 17). Assim foi determinada uma alta prevalência

deste grupo de vírus na região de fronteira, fato também observado com o Rio Grande do Sul. Das RM observadas para este grupo de vírus, 100% (7/7) foram para o IGUV, o que diferenciou de todos os outros inquéritos realizados durante o estudo e todos os animais reagentes para os ILHV e SLEV (17/29) foram considerados RC, conforme já descrito por VIANNA (2010).

No Rio Grande do Sul, dos 234 animais reagentes para os arbovírus pesquisados, 57,7% (135/234) foram positivos para os flavivírus, 34,6% (81/234) para os bunyavírus e 30,3 % (71/234) para os alfavírus. A diferença entre os flavivírus foi estatisticamente maior que os bunyavírus e alfavírus ($p < 0,001$), e não houve diferença entre os animais reagentes para os bunyavírus e alfavírus ($p > 0,05$). Assim, os resultados sugerem uma maior circulação dos flavivírus na área de fronteira, fato este já observado na Argentina por DIAZ et al. (2008).

TABELA 17 - Número de animais reagentes para o teste de IH por UF, segundo o tipo de flavivírus e tipo de reação, nas Unidades Federadas de ocorrência de eventos agropecuários e de municípios de fronteira.

	RIO GRANDE DO SUL				PARANÁ				MATO GROSSO DO SUL				S. CATARINA	
	FESTA AGROP	%	MUNIC. FRONT.	%	FESTA AGROP	%	MUNIC FRONT	%	FESTA AGROP	%	MUNIC FRONT	%	MUNIC FRONT	%
RM	7	58,3	43	35	31	96,9	14	87,5	46	43,8	32	30,5	7	24,1
SLEV	5	71,4	25	58,1	1	3,1	2	12,5	38	82,6	14	43,8	0	-
ROCV	2	28,6	18	41,9	21	39,6	42	72,4	2	4,3	1	3,1	0	-
IGUV	0	-	0	-	0	-	0	-	6	13	15	46,9	7	100
ILHV	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	6,3	0	-
RC	5	41,7	80	65	0	-	0	-	59	56,2	73	69,5	22	75,9

A epizootia em equídeos e a realização de inquéritos nesta espécie demonstraram ser um excelente instrumento de vigilância destas enfermidades em humanos, tendo em vista a possibilidade de concomitância de casos em humanos e equinos de algumas das arboviroses pesquisadas.

Por fim, dentre os arbovírus pesquisados e que circulam amplamente em equinos, os alfavírus e os flavivírus demonstraram uma importância maior pela

característica neurológica e pela capacidade de causar doença tanto em humanos como em equinos, fato que justifica a importância da realização de inquéritos que servem como ferramenta para determinar o risco de ocorrência de casos humanos e a necessidade de implantação de medidas profiláticas e de controle.

A detecção de anticorpos de diversos arbovírus encontrados pela primeira vez por meio dos inquéritos sorológicos realizados no Ceará, Paraíba, Bahia, Santa Catarina, algumas regiões do Mato Grosso do Sul e Pará serviram de alerta para os governos desses estados quanto à necessidade imediata de intensificação da vigilância veterinária, em conjunto com a vigilância das meningites virais em humanos.

4 CONCLUSÕES

Os arbovírus pesquisados encontram-se presentes nos nove estados do país, causando infecções em equídeos, sendo que a prevalência difere conforme a região estudada e a motivação do inquérito.

A idade, utilidade do animal e a motivação do inquérito (epizootia e feira agropecuária) demonstraram ser um fator de exposição dos animais a estes arbovírus, entretanto a detecção de anticorpos nas diversas faixas etárias e em animais das mais diversas utilidades demonstrou que existe a possibilidade de infecção em todos os animais.

Dentre os arbovírus pesquisados, os flavivírus foram aqueles encontrados com maior frequência, sendo o SLEV aquele que mais se apresentou como causa de infecção deste grupo de vírus.

Reações Monotípicas para anticorpos do ROCV, fora do estado de São Paulo apontam sua presença em outros estados do país.

Em concomitância com as epizootias pelos EEEV circularam outros arbovírus nas regiões.

REFERÊNCIAS

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonoses y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Volume II – Clamidiosis, rickettsiosis y virosis. Organización Panamericana de Saúde. Pub Cient y Tec. n.580. Washington,DC,EUA. 3 ed. 425p. 2003.
2. ARAUJO, F. A. A., VIANNA, R.S.T. MARCELO YOSHITO WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; DORETTO, L.; CAVALCANTE, G.C.; AZEVEDO JÚNIOR, S.M.; MAGALHÃES, V.S.; GOMES, J.L.; QUEIROZ, P.V.S.; LARRAZÁBAL, M.E.; MARTINS, L.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Primeiro Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do de Galinhos/RN para Detecção do Vírus da Febre do Nilo Ocidental, influenza Aviária e New Castle. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico, ano 03, v.01,n.1, 2003.
3. ARAUJO, F. A. A., VIANNA, R.S.T. WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; CAVALCANTE, G.C.; MAGALHÃES, V.S.; ANDRADE FILHO, G.V.; RODRIGUES, S.G.; MARTINS, L.C.; FEDRIZZI, C.E.; SCHERER, A.; MOHR, L.V.; ALMEIDA, M.A.B. Primeiro Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe para detecção do Vírus da febre do Nilo Ocidental. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico, ano 03, v.01, n.1, 2004.
4. ARAUJO, F. A. A., VIANNA, R.S.T. ANDRADE FILHO, G.V.; MELHADO, D.L.; TODESCHINI, B.; CAVALCANTE, G.C.; FEDRIZZI, C.E.; MAGALHÃES, V.S.; SCHERER, A.; ALMEIDA, M.A.B.; PORTELLA, A.S.; SANTOS, E.; SCHERER, S.B. Segundo Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe para Detecção do Vírus da Febre do Nilo Ocidental, Influenza Aviária, Newcastle e outros Vírus. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico, ano 04, v.2, n.2, 2005.
5. CDC Technical Fact Sheet: Eastern Equine Encephalitis [editorial]. CDC Division of vector. Borne Infectious Diseases, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/EasternEquineEncephalitis/tech/factSheet.html>. Acessado em 12.06.2011.

6. CLARKE, D.H.; CASALS, J. Techniques for haemagglutination and haemagglutination - inhibition with arthropod - borne virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n.7, p.561-573, 1958.
7. DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; SILVA, J.M.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; SILVA, G.P.; SILVA, R.P. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu do Pará Emílio Goeldi**, Série Zoo, v. 8, n. 1, p.69-111. 1992.
8. DIAZ, L.A.; KOMAR, N.; VISINTIN, A.; JURI, M.J.D.; STEIN, M.; ALLENDE, R.L.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W.; CONTIGIANI, M. West Nile Virus in Birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n.4, abril, 2008. Disponível em: www.cdc.gov/eid. Acessado em 25 de maio de 2011.
9. FERNÁNDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.
10. FIGUEIREDO, L.T.M. Arboviroses Emergentes no Brasil. Artigo de Opinião. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.2, p.224-229, março-abril, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n2/a16v40n2.pdf>. Acessado em: 28.08.2011.
11. FLORES, E. F.. Classificação e Nomenclatura dos Vírus. **Virologia Veterinária**. Santa Maria : Ed. da UFSM, p.888. 2007.
12. GOULD, E.A.; DE LAMBALLERIE, X.; ZANOTTO, P.M.; HOLMES, E.C. Origins, evolution, and vector/host co adaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, 59: 277-314, 2003.
13. HAYES, E.B.; KOMAR, N.; NASCI, R.S.; MONTGOMERY, S.P.; O'LEARY, D.R.; CAMPBELL, G.L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p.1167-1173, 2005.
14. 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**; v.31; n.1; p. 28-31. 1989.
15. IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.; COSTA, C.S. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em

população da região do Vale do Ribeira. II. Inquérito em pacientes do Hospital Regional de Pariquera-Açu, 1980. **Revista de Saúde Pública**; São Paulo, n.15, p.587-602. 1981.

16. KARABATSOS, N. International catalogue of arboviroses and certain other viroses of vertebrates. 3 ed. San Antonio, USA. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1147p. 1985.

17.KOMAR, N. West Nile virus: epidemiology, and ecology in North America. **Advances in Virus Research**, v.61, p.185-234, 2003.

18.KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; COIMBRA, T. L. M.; CUNHA, E. M. S.; QUEIROZ, L. H; MACRUZ, R.; NAGAMORI, A. H. Isolamento e identificação do vírus da encefalomyelite equina, tipo leste, em equinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.59, n.1/2, p.37-41, 1992.

19.KUNO, G.; CHANG, G.J.J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n. 4. p. 608–637. Outubro, 2005. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/18/4/608>. Acessado em: 29.08.2011.

20. MARLENEE, N.L.; LOROÑO-PINO, M.A.; BEATY, B.J.; BLITVICH, B.J.; SALAS, I.F.; CORDERO, J.F.C.; ROJAS, J.I.G. Detection of antibodies to West Nile and Saint Louis encephalitis viruses in horses. **Salud Pública de México**. v.46, n.5, p.273-274. septiembre-octubre, 2004.

21.MEDEIROS, D.B.A. Caracterização molecular e relação filogenética do genoma completo dos arbovírus Bussuquara, Iguape, Ilhéus e Rocio (família *flaviviridae*, gênero *flavivirus*). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Belém, 219p. 2009.

22.MONARTH, T.P. SABATINI, M.S., PAULI, R., DAFNER, J.F., MITCHEL, C.J. BOWEN, G.S., CROPP, C.B. Arbovirus investigation in Argentina, 1977-1980. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.34; p. 966-975, 1985.

23.ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Importancia de las virosis transmitidas por artrópodos y roedores para la salud pública em las Américas. **Boletim Epidemiológico**. v. 4; n. 3; 4 p.; 1983.

24. PAUVOLID-CORRÊA, A. Estudo sobre arbovírus em populações de equinos e artrópodes na Sub-região de Nhecolândia no Pantanal do Mato Grosso do Sul. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz. **FIOCRUZ**. Rio de Janeiro. p. 180. 2008.
25. PEREIRA, O.A.; NILSSON, M.R.; SUGAY, W.; TRAPP, E.E. Ocorrência de Encefalomyelite Equina em Itaporanga, estado de São Paulo (Brasil). II Estudos Sorológicos. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.6; p 1-4. 1964.
26. PHOUTRIDES, E.; JUSINO-MENDEZ, T.; PEREZ-MEDINA, T.; SEDA-LOZADA, R.; GARCIA-NEGRON, M.; DAVILA-TORO, F.; HUNSPERGER, E. The Utility of Animal Surveillance in the Detection of West Nile Virus Activity in Puerto Rico, 2007. **Vector-Borne and Zoonoses Diseases**. v. 0, n.0, p.1-4. 2010
27. R 2.13. The R Foundation for Statistical Computing. Bell Laboratories. Disponível em: <http://www.r-project.org/>. Acessado em 15.09.2011.
28. RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. Doenças de Ruminantes e Equídeos, 3ª Ed. Santa Maria: Palotti, v.1. p. 103-106. 2007.
29. RODRIGUES, S.G.; OLIVA, O.P.; ARAÚJO, F.A.A.; MARINS, L.C.; CHIANG, J.O.; HENRIQUES, D.F.; SILVA, E.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. **Revista Panamazônica de Saúde**; v., n.1; p. 81-86. 2010.
30. SANTOS, A.L.; ROMANO, A.P.M.; ELKHOURY, A.N.S.M.; ARAUJO, F.A.A. Epizootias em Equinos por Encefalite Equina do Leste e Inquérito Sorológico em Equinos para Detecção de Anticorpos “Anti-Encefalite Equina do Leste” - Paraíba/2009. [Poster] Anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. MEDTROP2011. Natal, 2010.
31. SHOPE, R.E. The use of a micro hemagglutination inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Annals of Microbiology*; n.11, p.167-171. 1963.
32. 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. *American Journal Tropical*

Medicine Hygiene 1964; v. 13; n.5; p. 723-727. In: **Memórias do Instituto Evandro Chagas**. Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; p 191-202. 2002.

33. STRAATMANN, A.; SANTOS-TORRES, S.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G.; TAVARES-NETO, J. Evidências Sorológicas da Circulação do Arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.30, n.6, p. 511-515, Uberaba, Nov./Dec. 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86821997000600012&script=sci_arttext. Acessado em 24 de setembro de 2011.

34. TORRES, J.R.; RUSSEL, K.L.; VASQUEZ, C.; BARRERA, R.; TESH, R.B. **Family Cluster of Mayaro Fever, Venezuela**. *Emerging Infectious Diseases*. v.10, n. 7, July, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol10no7/pdfs/03-0860.pdf>. Acessado em: 22.07.2011.

35. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. Documento Técnico, n.2. **Instituto Evandro Chagas**. Fundação Nacional de Saúde. Belém, 28p. 1994.

36. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico**. LEÃO, R.N.Q. (ed.). Belém: CEJUP: UEPA: Instituto Evandro Chagas, p. 207-225. 1997.

37. VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses Pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p.72-99, 1998.

38. VIANNA, R.S.T. Inquéritos Soroepidemiológicos em Equinos da Região Sul do Brasil para detecção de Anticorpos Anti-*Flavivírus* de Interesse em Saúde Pública. Dissertação [Mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 52p. 2010.

CAPÍTULO 4

SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS “ANTI-ARBOVÍRUS” DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM AVES SILVESTRES, EM SALINÓPOLIS/PARÁ, BRASIL – 2007 E 2008.

PREVALENCE OF ANTI-ARBOVIRUSES ANTIBODIES OF PUBLIC HEALTH IMPORTANCE IN WILD BIRDS IN SALINÓPOLIS/PARÁ STATE, BRAZIL - 2007 AND 2008.

RESUMO

Objetivou-se determinar a prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os arbovírus em aves silvestres em dois inquéritos sorológicos realizados em Salinópolis/PA. Foram capturadas 544 aves de 17 espécies diferentes, sendo nove residentes e oito migratórias. Foi coletado sangue para isolamento de vírus de 350 de aves, entretanto nenhum vírus foi isolado. Dos 95 soros nos quais foram realizados o teste de inibição de hemaglutinação, 14,7% foram reagentes para alfavírus, 9,5% para flavivírus e 7,4% para bunyavírus. 84,9% das reações positivas foram em aves migratórias e 15,1% de residentes. A proporção de positivas dentre as migratórias nas quais foi coletado sangue foi de 31,5% ao teste e nas residentes 18,2%, que estatisticamente não são diferentes ($p>0,05$). Para os alfavírus, a espécie *Pluvialis squatarola* apresentou 28,6% de positividade, seguido da *Arenaria interpres* com 11,8%. Para os flavivírus, somente as espécies *Sterna supercillares* e a *Calidris pusilla* foram reagentes ao teste de inibição por hemaglutinação. Considerando os bunyavírus, a *Arenaria interpres* foi reagente em 5,9% para o vírus Oropouche. As aves migratórias demonstraram ser importantes amplificadores dos arbovírus pesquisados, embora os vírus não tenham sido isolados. Algumas espécies de aves têm maior capacidade de amplificação de alguns arbovírus do que outras. O isolamento do vírus em aves silvestres é difícil, tendo em vista a dificuldade de coleta de sangue em animais no momento da viremia.

PALAVRAS-CHAVE: arboviroses, aves migratórias, infecção.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the prevalence of hemagglutination-inhibition antibodies against arboviruses in wild birds in two serological surveys conducted in Salinópolis/Para State. A total of 544 birds of 17 species were captured, being nine resident and eight migratory. Blood was collected from 350 birds for virus isolation, but no virus was isolated. Of the 95 sera in which were performed the hemagglutination inhibition test, 14.7% were reactive to alphavirus, 9.5% to flavivirus and 7.4% to bunyavirus. Of the positive reactions, 84.9% occurred in migratory birds and 15.1% in resident birds. The proportion of positive reactions to the test among migratory and resident birds was 31.5% and 18.2%, respectively, which is not statistically different ($p > 0.05$). For alphaviruses, the species *Pluvialis squatarola* showed 28.6% positivity, followed by 11.8% *Arenaria interpres*. For flaviviruses, only the species *Sterna supercillares* and *Calidris pusilla* were reactive by the hemagglutination inhibition test. Regarding the bunyavirus, the *Arenaria interpres* was 5.9% positive for the Oropouche virus. Migratory birds have proved to be important amplifiers of arboviruses surveyed, although the viruses were not isolated. Some species of birds have a greater capacity for amplification of some arboviruses than others. The isolation of the virus in wild birds is difficult, in view of the difficulty of collecting blood in animals at the time of viremia.

KEYWORDS: arboviroses, migratory birds, infectious.

1 INTRODUÇÃO

O processo de migração das aves está ligado a fatores endógenos, ou seja, fisiológicos, relacionados ao ritmo circadiano das aves (variações biológicas = ritmo interno fixo, diário), bem como a fatores exógenos, ligados com o ritmo circannual (ritmo anual) ou fotoperiodismo. As aves utilizam vários tipos de “bússolas” para se orientarem em suas rotas durante os deslocamentos migratórios, dentre elas o sol, as estrelas, o relevo, o instinto e o campo magnético da Terra. A maioria dos migrantes em larga escala se desloca durante a noite e utiliza as estrelas como referência (NUNES & TOMAS, 2008).

As espécies de aves migratórias que se deslocam para o Brasil vêm a procura de locais de invernada, em busca de alimento (TELICO-JUNIOR et al., 2003). Do Amapá ao Rio Grande do Sul são encontrados vários locais, os quais são importantes para a preservação destas espécies, entre elas Salinópolis/PA, Reentrâncias Maranhenses/MA, Lagoa do Peixe/RS e Galinhos/RN (ARAUJO et al.; 2003; AZEVEDO-JUNIOR et al. 2003; NUNES & TOMÁS, 2004; ARAUJO et al., 2005).

A maioria das populações de aves migratórias que fazem do Brasil uma área de invernada é proveniente das colônias de reprodução da costa leste norte-americana e canadense. Chegam ao norte do país a partir de setembro e à costa do Rio Grande do Sul, em novembro. Muitos jovens e adultos que não irão reproduzir naquele ano, permanecem no Brasil até que estejam aptos à reprodução (ARAUJO et al.; 2005).

O *Actitis macularius* reproduz-se na América do Norte e migra durante o inverno para áreas mais quentes, podendo neste período ser encontrado desde o sudeste dos Estados Unidos até a Argentina e em todo o Brasil (AZEVEDO-JUNIOR et al., 2004). O *Calidris pusilla* migrante do Norte que se reproduz de maio a julho no Ártico, apresenta três populações que se separam na reprodução. A população que migra para o Brasil tem origem do leste do Canadá (HAYMAN et al., 1986; ANTAS & NASCIMENTO, 1990; AZEVEDO JÚNIOR & LARRAZÁBAL, 1999; AZEVEDO-JUNIOR et al., 2004).

Segundo BOERE & STROUD (2006), os estudos sobre o tempo da migração das aves é bastante complexo as mudanças climáticas fornecem indicações de que esta variação influencia no comportamento migratório das populações de aves.

As aves respondem pela terceira posição como fonte de isolamento de arbovírus, após humanos e roedores. Na Amazônia Brasileira, 31/181 (17,1%) tipos diferentes de arbovírus já foram isolados a partir de sangue ou órgãos, ou evidenciados indiretamente pela presença de anticorpos no plasma de aves silvestres (KARABATSOS, 1985).

A vigilância de aves silvestres, em especial das migratórias, tem sido usada tradicionalmente nos Estados Unidos e em outros países para detectar e monitorar a transmissão dos vírus da Encefalite de Saint Louis, Encefalite Equina do Leste, Encefalite Equina do Oeste e Venezuelana, bem como, para a vigilância da Influenza Aviária. Inquéritos sorológicos tem sido a fonte de informação mais confiável para detecção dos potenciais amplificadores destes vírus nas áreas de ocorrência de surtos em humanos e/ou epizootias em animais (TSAI & MITCHELL, 1988; CDC, 2003). Com isso, GOLONO (2009) reforça a necessidade de monitoramento de aves migratórias a partir dos sítios de invernada existentes no Brasil devido ao risco de introdução do vírus da influenza aviária H5N1 e de outros vírus.

A vigilância em aves silvestres é preconizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) por meio da Portaria Ministerial Nº 104/2011, que determina a notificação obrigatória de epizootias em aves e normatiza em seu Guia de Vigilância que: “o aparecimento de aves mortas, sem etiologia definida, é fator de alerta para a vigilância; a implantação de pontos sentinelas de vigilância de aves mortas em zoológicos, parques e praças; além da realização de inquéritos sorológicos em aves residentes e migratórias, para pesquisa viral”.

Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação e isolamento dos arbovírus estudados em aves silvestres investigadas durante dois inquéritos sorológicos realizados em Salinópolis/PA e servir de modelo como vigilância sentinela e preditora da ocorrência de arbovírus em humanos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se estudo descritivo no município de Salinópolis/PA entre os meses de abril e maio de 2007 e no mesmo período em 2008.

Área de estudo

Selecionou-se o município de Salinópolis/PA por ser um ponto de pouso e invernada de aves migratórias. Para realização do estudo foi aprovado previamente um projeto de vigilância das arboviroses pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para desenvolvimento das atividades de monitoramento e vigilância de epizootias em aves migratórias em todo o país.

Para determinação temporal do momento de realização do inquérito, foi considerada a época do ano, o período de retorno das aves migratórias para o continente norte americano, a tábua de marés (alta) e a fase lunar (lua nova e quarto crescente).

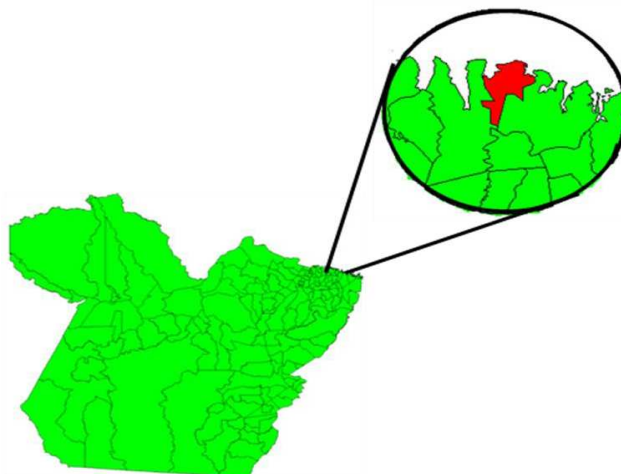


FIGURA 1 - Município de realização do inquérito sorológico em aves silvestres, para detecção de anticorpos “anti-arbovírus”, Salinópolis/PA, 2007 e 2008.

Instrumentos utilizados

Para captura das aves foram utilizadas cerca de 40 redes de captura ornitológicas de tamanho 12x2m alinhadas na areia da praia. A distância considerada do local de colocação da rede e a água do mar foi o nível atingido pela maré alta da noite anterior. A captura foi realizada no período noturno de 18 às cinco horas da manhã, durante cinco dias, em cada inquérito.

A cada meia hora foi realizada vistoria nas redes para retirada das aves presas, que eram devidamente acondicionados em sacos de tecido ou caixas de plástico e levadas para o laboratório de campo para identificação e coleta de sangue.

Para retirada dos animais das redes e manipulação no laboratório foram utilizados como material de biossegurança: luvas de procedimento, macacão de prolipropileno, máscaras PFF2 e óculos.

Foi criada uma ficha de identificação de aves (Anexo 4) contendo os dados biológicos referentes: espécie, status (migratória, residente) ave recapturada ou recuperada, idade, sexo, plumagem, número da anilha, muda, medidas (asa, tarso, cauda, cúlmen total e narina/ponta), peso e volume de sangue coletado.

Características dos animais

As aves foram identificadas segundo GRANTS AU (2010), considerando a espécie e *status* (migratória ou residente), anilhadas e feita a biometria e coleta de sangue. Após a recuperação das aves ao stress sofrido pela captura, manipulação e coleta de sangue, todas foram devolvidas ao meio ambiente. As aves eram medidas utilizando régua e paquímetro e pesadas com balança de precisão tipo “pesola”.

Coleta de material

A coleta do sangue foi feita da veia jugular, com seringa de insulina de 1mL, utilizando agulha intra-dérmica previamente heparinizada. A quantidade recomendada de sangue a ser coletado foi de 1% do peso vivo da ave.

O sangue coletado foi colocado em tubos criogênicos devidamente identificados com um número contido na ficha de identificação da ave.

A partir do volume de sangue coletado foi possível centrifugar parte do material para realização do teste de Inibição de Hemaglutinação e o restante do sangue total foi encaminhado para tentativa de isolamento viral. Assim, quando foi coletada pequena quantidade de sangue, o material foi encaminhado diretamente para este fim.

Todo o material coletado para isolamento viral e sorologia foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e encaminhado para o Instituto Evandro Chagas para realização dos testes.

Isolamento de vírus

O preparo e inoculação do material para tentativa de isolamento de arbovírus seguiram o protocolo descrito por CAUSEY et al. (1961).

As amostras de sangue foram inoculadas sem diluição e diluídas 1: 10 em solução fosfatada-tamponada (pH 7,2), contendo albumina bovina a 0,75% e antibióticos (penicilina e estreptomicina).

A partir da diluição do sangue, o material foi inoculado em camundongos recém-nascidos, brancos "Swiss. Os camundongos foram inoculados por via subcutânea (SC) e intramuscular (IM).

Após inoculação, os animais foram observados diariamente, por duas a três semanas. Dos que mostraram sinais de doença, e vieram a óbito, retirou-se o cérebro, e/ou fígado para novas passagens, os quais foram preparados por suspensão numa solução tamponada de Veronal (SHOPE & SATHER, 1979).

Em caso de isolamento, o vírus seria identificado por meio do teste de fixação de complemento (FC), usando soros hiperimunes contra os grupos de vírus mais comuns na área em estudo. A identificação precisa da espécie viral seria feita com soros específicos. Suspensões a 16% do cérebro e/ou fígado de camundongos suspeitos seriam usados como fonte de antígenos, conforme FULTON & DUMBELL (1946).

Por fim, seria utilizado o método de Imunofluorescência Direta, onde as células infectadas fixadas na lâmina seriam cobertas com soro contendo

imunoglobulinas antivirais marcadas com o isotiocianato de fluoresceína (conjugado) e havendo especificidade, a fluorescência seria observada, como descrito por TRAVASSOS DA ROSA et al. (1994).

Teste de Inibição de Hemaglutinação

Para o diagnóstico sorológico foi empregado o teste de IH conforme descrita por CLARKE & CASALS (1958) e adaptada para microplacas por SHOPE (1963).

Os soros foram tratados com acetona e adsorvidos por hemácias de ganso, e em seguida testados contra quatro unidades dos antígenos dos diferentes tipos de arbovírus,

No momento da análise dos dados foram considerados os animais reagentes para os seguintes arbovírus: EEEV, WEEV, MUCV (VEEV, subtipo IIIA), MAYV, SLEV, ROCV, CACV, IGUV, ILHV, MAGV, VTC e OROV. Os soros foram titulados a partir de 1:20 até de 1:1280, sendo o ponto de corte (cut-off) 1:20. Corresponderam as RM, aquelas amostras com presença de anticorpos com títulos $\geq 1:20$ para um arbovírus e reações heterotípicas, isto é, RC as amostras com presença de anticorpos com títulos $\geq 1:20$ para mais de um arbovírus de uma mesma família.

Variáveis estudadas

Para análise das informações foi considerada a espécie da ave capturada, o “status” de migratória ou residente, o tipo de anticorpo detectado pela técnica de IH, o tipo de reação (RM – Reação Monotípica, RC- Reação Cruzada).

Os animais reagentes monotipicamente para os vírus Guaroa, Caraparu, Catu, Febre Amarela, Bussuquara, Icoaraci e Belém, que deram reação monotípica (RM) não foram considerados nos resultados do estudo devido ao número inexpressivo de animais reagentes. Os animais reagentes para estes vírus e para outros vírus do mesmo grupo foram considerados RC.

Análise Estatística

Os resultados foram tabulados e confrontados pelo teste do Qui-quadrado (X^2), admitindo-se nível de significância (α) de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade ($p < \alpha$). As análises foram implementadas utilizando o programa R 2.13 (<http://www.R-project.org>).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois anos do estudo foram capturadas 544 aves de 17 espécies diferentes, sendo 10 espécies residentes e sete migratórias e destas somente quatro espécies eram aves de mata (*Columbina passerina griseola*, *Nyctdromus albicollis albicollis*, *Pitangus sulphuratus*, e *Tiranus melanocholicus*), as demais espécies eram aves aquáticas ou limícolas. Do total, 83,6% (455/544) eram migratórias e 16,4% (89/544) residentes (Tabela 1).

TABELA 1 - Número de aves capturadas, segundo a espécie e nome popular e “status”, capturadas em Salinópolis/PA, 2007 e 2008.

NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	M	R	TOTAL
<i>Actitis macularius</i> (Linnaeus, 1766)	Maçarico-pintado	179	-	179
<i>Arenaria interpres morinella</i> (Linnaeus, 1766)	Vira-pedra	17	-	17
<i>Calidris canutus rufa</i> (Wilson, 1813)	Maçarico-de-papo-vermelho	4	-	4
<i>Calidris minutilla</i> (Vieillot, 1819)	Maçariquinho	42	-	42
<i>Calidris pusilla</i> (Linnaeus, 1766)	Maçarico-rasteirinho	175	-	175
<i>Charadrius collaris</i> (Vieillot, 1818)	Batuíra-de-coleira	-	53	53
<i>Charadrius semipalmatus</i> (Bonaparte, 1825)	Batuíra-de-bando	37	-	37
<i>Charadrius wilsonia brasiliensis</i> (Grantsau e Lima, 2008) subespécie recém-descrita.	Batuíra-bicuda	-	12	12
<i>Columbina passerina griseola</i> (Spix, 1825)	Rolinha-cinzenta	-	4	4
<i>Nyctdromus albicollis albicollis</i> (J.F. Gmelin, 1789)	Bacurau	-	1	1
<i>Pitangus sulphuratus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	Bem-te-vi	-	1	1
<i>Pluvialis squatarola</i> (Linnaeus, 1758)	Batuíruçu-de-axila-preta	-	7	7
<i>Rallus longirostris crassirostris</i> (Lawrence, 1871)	Saracura-matraca	-	2	2
<i>Rynchops niger cinerascens</i> (Spix, 1825)	Talha-mar	-	1	1
<i>Sterna superciliaris</i> (Vieillot, 1819)	Trinta-réis-anão	-	7	7
<i>Tiranus melanocholicus</i> (Vieillot, 1819)	Suiriri	-	1	1
<i>Tringa melanoleuca</i> (J.F. Gmelin, 1789)	Maçarico-de-perna-amarela	1	-	1
TOTAL		455	89	544

M=Migratória – R = Residente

Como característica das aves migratórias, a maioria das espécies capturadas foram aves que se deslocam em bandos, sendo que duas espécies (*Actitis macularius* e *Calidris pusilla*) corresponderam a 77,8% (354/45) das aves migratórias capturadas e 65,0% (354/544) do total.

Nenhum tipo de vírus foi isolado das 350 amostras processadas indicando a provável não circulação viral na região no período avaliado, diferente do observado por DEGALLIER et al. (1992) que isolaram vírus em 11,8% (36/304) das amostras pesquisadas de aves da Região Amazônica brasileira. Outro fato importante é que apesar das aves migratórias serem suspeitas de atuarem como amplificadores de surtos de diversas arboviroses, a ligação permanece conjectural, por causa da dificuldade no isolamento do vírus nas aves e em determinar a intensidade e duração da viremia em aves selvagens infectadas na natureza (RAPPOLE, 2000).

A coleta de sangue para realização do teste sorológico de IH foi possível em 95 aves, caracterizando uma taxa de coleta de 17,4% (95/544) com um percentual de positividade para os arbovírus pesquisados de 28,4% (27/95), o que sugere que uma ampliação na taxa de coleta possa aumentar a positividade. Somente foram observados animais reagentes no ano de 2007.

Do total de amostras analisadas pelo teste de IH, 28,4% (27/95) foram reagentes para os arbovírus pesquisados, sendo 14,7% (14/95) para os alfavírus, 9,5% (9/95) para os flavivírus e 7,4% (7/95) para os bunyavírus. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado os três gêneros de vírus pesquisados ($p > 0,05$), sugerindo uma exposição das aves aos três grupos de vírus estudados.

As aves migratórias têm sido incriminadas como principais hospedeiros introdutórios do WNV e outros arbovírus em diferentes regiões. Isto ocorre, devido estas viroses geralmente acontecerem no final do verão ou início do outono, coincidindo com a chegada de grandes concentrações de aves migratórias e de mosquitos; e por estes surtos acometerem com frequência os seres humanos que vivem em ou perto de zonas úmidas, onde elevadas concentrações de aves entram em contato com um grande número de mosquitos ornitofílicos (CALISHER, 1980; DEGALLIER et al., 1989; DEGALLIER et al., 1992; FERREIRA et al., 1994; RAPPOLE et al., 2000).

Assim, o município de Salinópolis/PA além de ser um importante ponto de pouso de aves migratórias é também extraordinário polo de turismo do estado, e tem uma praia que leva o nome de “Praia do Maçarico”, pela importância da presença desta ave na área, deixando em alerta do risco de introdução de vírus por esta localidade.

Em estudo realizado por ARAUJO et al., (2004) em Galinhos/RN, foi observada uma soroprevalência de 1,4% (7/503) de anticorpos para os arbovírus pesquisados, tendo sido detectados anticorpos contra os MAYV, OROV, CACV e EEEV. Além disso, em inquéritos realizados também por ARAÚJO et al, (2003) e (2005) no Rio Grande do Sul, apontaram prevalências bastantes distintas, no primeiro de 42,7% (68/556) e no segundo não foi encontrado nenhum animal reagente aos arbovírus pesquisados, demonstrando uma variação bastante importante nas prevalências encontradas, sugerindo que a presença de anticorpos nas aves está associada a fatores ecológicos e que varia com grupos de populações, idade delas, rotas migratórias e presença dos vetores infectados (IVERSSON, 1980; OPAS, 1983; ACHA & SZYFRES, 2003).

FERREIRA et al. (1994) demonstraram uma prevalência de 0,7% em soros de aves silvestres coletadas em várias regiões de São Paulo, com reações monotípicas, observados no teste de IH para os EEEV, VEEV, WEEV, ILHV, ROCV e SLEV, demonstrando a importância desses animais no ciclo de transmissão das arbovirose.

Considerando a proporção de reações para os alfavírus observadas, 78,6% (11/14) foram RM, o que foi estatisticamente diferente quando comparada com as RC ($p=0,008$). Das RM, 35,7% (5/11) foram regentes para o MUCV, 28,6% (4/11) para o EEEV e 14,3% (2/11) para o MAYV, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o MUCV com os demais alfavírus ($p=1$) (Figura 2).

Das reações para os bunyavírus e flavivírus, 100% foram RM. Com relação aos flavivírus, 66,7% (6/9) foram RM pra o SLEV e 33,3% (3/9) para o ILHV, e não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas às proporções de reações positivas para os dois vírus. O único bunyavírus detectado

em 100% das reações positivas foi o OROV, fato esperado, tendo em vista o mesmo ser endêmico na Região Amazônica (VASCONCELOS et al. 1998) (Figura 2).

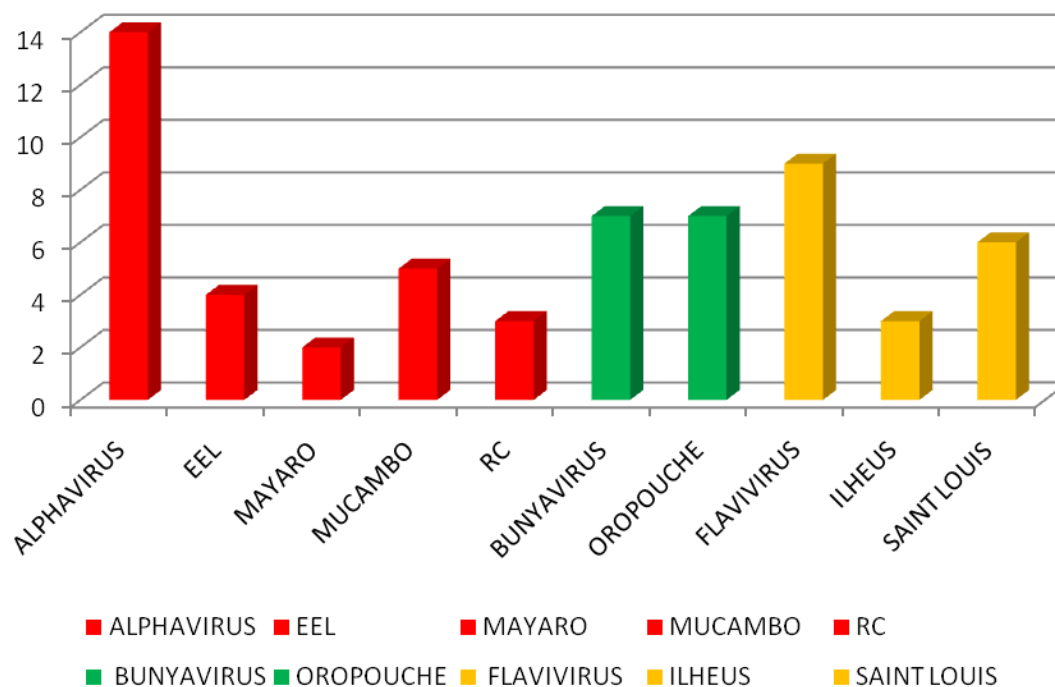


FIGURA 2. Número de animais reagentes no teste de IH, segundo o tipo de arbovírus pesquisado e reação monotípica e heterotípica.

GOULD et al. (2003) referem sobre a presença dos flavivírus em todos os continentes, com exceção da Antártida. Estes vírus apresentam uma distribuição geográfica distinta e sua dispersão está diretamente relacionada à infecção de diferentes hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados; a ecologia do *habitat* natural em que cada vírus é encontrado; as condições climáticas; e ao impacto da urbanização e do sistema de transporte.

Quando considerado o *status* das aves, 85,2% (23/27) das reações positivas eram provenientes de aves migratórias e somente 14,8% (4/27) de residentes, entretanto ao se considerar a proporção de positivas dentre as migratórias nas quais foi coletado sangue, somente 31,5% (23/73) foram reagentes ao teste e nas residentes a proporção foi de 18,2% (4/22) o que estatisticamente não são diferentes ($p > 0,05$). Este fato tem uma relevância significativa, pois demonstra

que a circulação destes agentes pode ter ocorrido na área, já que nas aves residentes foi possível observar anticorpos tanto quanto nas migratórias (Tabela 2).

Conforme já descrito por ARAUJO et al, (2005), e normatizado por BRASIL (2010), quando relataram que anualmente milhares de aves migratórias chegam da costa leste dos Estados Unidos e Canadá e tem contato com aves silvestres residentes no Brasil, determinando serem os locais de pouso e invernada um potencial ponto de introdução de agentes patogênicos carregados por estes animais e a necessidade da implantação da vigilância sentinelas nesses pontos.

Não foi observada diferença significativa quando considerada a prevalência dentro das espécies *Calidris pusilla*, *Calidris minutilla*, *Charadrius semipalmatus* e a *Pluvialis squatarola* ($p=1,00$), enquanto que quando consideradas as proporções de animais positivos, as aves da espécie *Calidris pusilla* se mostraram estatisticamente mais reagentes quando comparadas com as proporções observadas nas demais espécies ($p<0,05$), o que sugere que algumas espécies migrantes estão mais expostas ao contato com os arbovírus pesquisados do que outras, seja pela capacidade de deslocamento, pelas rotas migratórias utilizadas ou pelo contato com o vetor infectado.

TABELA 2 - Número de aves capturadas, segundo a espécie, “status” e resultado do teste de IH, capturadas em Salinópolis/PA, 2007 e 2008.

	Reagentes		% de Reagentes na Espécie	% de Reagentes Entre as Espécies	Total
	NÃO	SIM			
<i>Actitis macularius (M)</i>	17	5	22,7	18,5	22
<i>Arenaria interpres morinella (M)</i>	6	2	25,0	7,4	8
<i>Calidris canutus rufa</i>	3		-	-	3
<i>Calidris minutilla (M)</i>	4	2	33,3	7,4	6
<i>Calidris pusilla (M)</i>	17	13	43,3	48,1	30
<i>Charadrius collaris (R)</i>	7	1	12,5	3,7	8
<i>Charadrius semipalmatus (M)</i>	2	1	33,3	3,7	3
<i>Charadrius wilsonia brasiliensis</i>	1		-	-	1
<i>Pitangus sulphuratus</i>	1		-	-	1
<i>Pluvialis squatarola (R)</i>	2	2	50,0	7,4	4
<i>Rallus longirostris crassirostris</i>	2		-	-	2
<i>Rynchops niger cinerascens</i>	1		-	-	1
<i>Sterna superciliaris (R)</i>	3	1	25,0	3,7	4
<i>Tiranus melanocholicus</i>	1		-	-	1
<i>Tringa melanoleuca</i>	1		-	-	1
TOTAL	68	27	28,4	100,0	95

M – Migratória; R – residente.

Considerando os alfavírus, a espécie *Pluvialis squatarola* apresentou 28,6% (2/7) de positividade, seguida da *Arenaria interpres* com 11,8% (2/17). A primeira espécie é residente, o que sugere que o contato com o vírus foi provavelmente na área onde a ave vive, enquanto que a segunda pelo *status* de migratória dificulta a determinação do local provável de infecção (Tabela 3).

Para os flavivírus, somente as espécies *Sterna superciliares* e a *Calidris pusilla* apresentaram reagentes para este tipo de vírus com 14,3% (1/7) e 4,6% (8/175), respectivamente, sendo que a primeira tem o *status* de residente.

Considerando os bunyavírus, a *Arenaria interpres* foi reagente em 5,9% (1/17) para o OROV, assim como as demais espécies também foram positivas para este bunyavírus. Por este vírus ser endêmico na região do estudo e não estar presente no hemisfério norte de onde migram as espécies reagentes pondera-se que as mesmas tenham se infectado na área (VASCONCELOS, 1998).

TABELA 3 - Número de aves capturadas segundo a espécie, número e percentuais de positividade para os grupos de arbovírus pesquisados, Salinópolis/PA, 2007 e 2008.

	Nº Animais	Nº Animais Positivos Alfavírus	% Positivos Alfavírus	Nº Animais Positivos Flavivirus	% Positivos Flavivirus	Nº Animais Positivos Bunyavírus	% Positivos Bunyavírus
<i>Actitis macularius</i>	179	4	2,2		-	2	1,1
<i>Arenaria interpres morinella</i>	17	2	11,8		-	1	5,9
<i>Calidris minutilla</i>	42	1	2,4		-	1	2,4
<i>Calidris pusilla</i>	175	4	2,3	8	4,6	2	1,1
<i>Charadrius collaris (R)</i>	53	1	1,9		-		-
<i>Charadrius semipalmatus</i>	37		-		-	1	2,7
<i>Pluvialis squatarola (R)</i>	7	2	28,6		-		-
<i>Sterna superciliaris (R)</i>	7		-	1	14,3		-
TOTAL	517	14		9		7	

Considerando o tipo de reação observada, nos alfavírus 78,5% (11/14) foram RM e nos demais grupos de vírus não houve RC nos testes. Na Tabela 4, pode-se observar que os indivíduos que foram reagentes para um vírus de um grupo não foram reagentes para outro vírus do mesmo grupo, assim, o presente estudo confirma relato feito por CALISHER (1980) e DEGALLIER et al. (1992), segundo os quais os grupos de aves de uma mesma espécie raramente contam com mais de uma espécie de vírus pertencente ao mesmo grupo de vírus. Isto se deve à competitividade existente entre os vírus de um mesmo grupo (Tabela 4).

Este fato é corroborado por KOMAR & CKARK (2006), quando se refere que a adaptação de todos os vírus em hospedeiros vertebrados e invertebrados específicos influenciam na evolução do próprio agente, na sua dispersão, na epidemiologia e, possivelmente, na patogênese dos arbovírus.

TABELA 4- Número de aves por espécie, segundo o tipo de arbovírus pesquisados e reação monotípica, Salinópolis/PA, 2007 e 2008.

	ALFAVÍRUS			FLAVIVÍRUS		BUNYAVÍRUS
	EEEV	MUCV	MAYV	SLEV	ILHV	OROV
<i>Actitis macularius</i>	2		2			2
<i>Arenaria interpres morinella</i>						1
<i>Calidris minutilla</i>			1			1
<i>Calidris pusilla</i>	2		1	6	2	2
<i>Charadrius collaris</i>		1				
<i>Charadrius semipalmatus</i>						1
<i>Pluvialis squatarola</i>		1	1			
<i>Sterna superciliaris</i>					1	
TOTAL	4	2	5	6	3	7

Por fim, vários são os arbovírus de importância em saúde pública nas Américas e que as aves silvestres tem uma participação bastante efetiva, mas a susceptibilidade varia com o tipo de ave e de vírus. Assim, a susceptibilidade ao WNV nas aves silvestre difere de acordo com a espécie, assim como também difere dos outros arbovírus endêmicos no Brasil. Entre as silvestres, os corvídeos, passeriformes e charadriiformes são as mais susceptíveis (KOMAR & CLARK., 2006). Estas espécies desenvolvem altos níveis de viremia e excretam grandes quantidades de vírus, apresentando depressão, letargia, plumas eriçadas e sinais neurológicos como ataxia, paralisia, movimentos de pedagem, torcicolo, opistótomos e incoordenação. (FLORES & WEIBLEN, 2009; BRASIL, 2010). Desta forma, a mortalidade de aves silvestres com sintomas neurológicos em nosso meio, deve ser sugestiva da presença deste novo agente.

4 CONCLUSÃO

Não foi possível o isolamento de nenhum arbovírus nas amostras coletadas. Entretanto as mesmas apresentaram anticorpos para alfavírus, flavivírus e bunyavírus quando as amostras foram submetidas ao teste de inibição de hemaglutinação. As aves migratórias demonstraram serem importantes amplificadores dos arbovírus pesquisados.

Os locais de pouso e invernada para aves migratórias, como Salinópolis/PA demonstraram ser importantes portas de entrada de agentes infecciosos, em especial os arbovírus, e necessitam de um monitoramento sistemático.

Algumas espécies de aves, como a *Calidris pusilla*, *Arenaria interpres* e *Pluvialis squatarola* têm maior capacidade de amplificação de alguns arbovírus do que outras espécies.

Anticorpos para os bunyavírus foram encontrados em aves migratórias provenientes do hemisfério norte, sugerindo que estas aves podem ser disseminadoras destes agentes em regiões onde antes nunca foram encontrados.

O isolamento do vírus em aves silvestres não é fácil, tendo em vista a dificuldade de coleta de sangue nestes animais e a necessidade de que a coleta seja feita no momento de viremia do agente.

REFERÊNCIAS

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonoses y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Volume II – Clamidiosis, rickettsiosis y virosis. Organización Panamericana de Saúde. Publicacion Cientifica y Tecnica. n.580. Washington, DC, EUA. 3 ed. 425p. 2003.
2. ANTAS, P.T.Z.; NASCIMENTO, I.L. Análise dos dados de anilhamento de *Calidris pusilla* no Brasil, p.6-12. **In:** Anais do Encontro Nacional de Anilhadores de Aves, Recife, 1998. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1990.
3. ARAUJO, F. A. A., VIANNA, R.S.T. ANDRADE FILHO, G.V.; MELHADO, D.L.; TODESCHINI, B.; CAVALCANTE, G.C.; FEDRIZZI, C.E.; MAGALHÃES, V.S.; SCHERER, A.; ALMEIDA, M.A.B.; PORTELLA, A.S.; SANTOS, E.; SCHERER, S.B. Segundo Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe para Detecção do Vírus da Febre do Nilo Ocidental, Influenza Aviária, Newcastle e outros Vírus. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico, ano 04, v.2, n.2, 2005.
4. ARAUJO, F. A. A., VIANNA, R.S.T. MARCELO YOSHITO WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; DORETTO, L.; CAVALCANTE, G.C.; AZEVEDO JÚNIOR, S.M.; MAGALHÃES, V.S.; GOMES, J.L.; QUEIROZ, P.V.S.; LARRAZÁBAL, M.E.; MARTINS, L.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Primeiro Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do de Galinhos/RN para Detecção do Vírus da Febre do Nilo Ocidental, influenza Aviária e New Castle. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico, ano 03, v.01,n.1, 2003.
5. ARAUJO, F. A. A., VIANNA, R.S.T. WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; CAVALCANTE, G.C.; MAGALHÃES, V.S.; ANDRADE FILHO, G.V.; RODRIGUES, S.G.; MARTINS, L.C.; FEDRIZZI, C.E.; SCHERER, A.; MOHR, L.V.; ALMEIDA, M.A.B. Primeiro Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe para detecção do Vírus da febre do Nilo Ocidental. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Eletrônico, ano 03, v.01, n.1, 2004.
6. AZEVEDO-JUNIOR, S. M.; LARRAZÁBAL, M. E.; PENA, O. Aves aquáticas de ambientes antrópicos (salinas) do Rio Grande do Norte, Brasil. **In:** Aves marinhas e

insulares brasileiras: bioecologia e conservação (Organizado por Joaquim Olinto Branco). Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. p. 255-266. 2004. Disponível em: <http://avesmarinhas.com.br/Cap%C3%ADtulo%2012.pdf> Acessado em 30.10.2011.

7. AZEVEDO-JUNIOR, S.M.; DIAS, M.M.; LARRAZÁBAL, M.E.; TELINO, W.R.; LYRA-NEVES, R.M.; FERNANDES, C.J.G. Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. Ararajuba. V.9; n.1, p.33-42. 2003.

8. AZEVEDO-JUNIOR, S.M.; LARRAZÁBAL, M.E. Censo de aves limícolas na Coroa do Avião, Pernambuco, Brasil, informações de 1991 a 1992. **Revista Nordestina de Zoologia**, n.1; p.263-277. 1994.

9. BOERE, G.C. STROUD, D.A. The flyway concept: what is it and what is isn't. *In*: BOERE, G.C; GALBRAITH, CA.A.; STROUD, D.A.; editors. Waterbirds around the world p. 40-47. The Stationary Office Edinburgh, UK. 2006. Disponível em: http://www.jncc.gov.uk/PDF/pub07_waterbirds_part1_flywayconcept.pdf. Acessado em 16.10.2011.

10. BRASIL. Febre do Nilo Ocidental. Guia de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. Série A, Normas e Manuais Técnicos. 7 ed. Caderno 9, p.43-48. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemiologia_2010_web.pdf. Acessado em 10.10.2011.

11. CALISHER, C.H. Antigenic relationships of the arboviruses: an ecological and evolutionary approach. *In*: International Symposium on new aspects in Ecology of Arboviruses. Proceedings. **Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences**. 11-15 Jun. 1979, p.117-152. 1980.

12. CAUSEY, O.R., CAUSEY, C. E., MAROJA, O. & MACEDO, D.G. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.10, n.2; p.227-249. 1961.

13. CDC. Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. 77p. 2003. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines-aug-2003.pdf>. Acessado em 16.10.2011.

14. CLARKE, D.H.; CASALS, J. Techniques for haemagglutination and haemagglutination - inhibition with arthropod - borne virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n.7, p.561-573, 1958.
15. DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; HERVÉ, J.P.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; SÁ FILHO, G.C.; PINHEIRO, F.P. Modifications of arbovirus ecoepidemiology in Tucuruí, Pará, Brazilian Amazonia, related to the construction of a hydroelectric dam, p.124-135. *In: Arbovirus Research in Australia Proceedings Fifth Symposium, August 28 - September 1, 1989, Brisbane, Australia.* Eds. M.F. Uren, J. Blok 62 LH. Mandemon, CSIRO Tropical Animal Science, Brisbane. 393 p. 1989.
16. DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; SILVA, J.M.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; SILVA, G.P.; SILVA, R.P. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu do Pará Emílio Goeldi**, Série Zoo, v. 8, n. 1, p.69-111. 1992.
17. FERREIRA, I.B.; PEREIRA, L.E.; ROCCO, I.M.; MARTI, A.T.; SOUZA, L.T.M.; IVERSSON, L.B. Vigilância de infecções por arbovírus na Região da Mata Atlântica, Estado de São Paulo, Brasil. I. Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação em aves silvestres entre 1978 e 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.36; n.3. São Paulo. Maio-Junho 1994. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003646651994000300011&script=sci_arttext. Acessado em 19.06.2011.
18. FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. O vírus do Nilo Ocidental **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.604-612, mar-abr, 2009.
19. FULTON, F.; DUMBELL, K.R. The serological comparison of strains of influenza virus. **Journal General Microbiology**, n.3, p.97-111, 1946.
20. GOLOMO, M.A. Epidemiologia e caracterização molecular do vírus da Influenza Aviária em aves residentes e migratórias no Brasil. Tese [Doutorado] Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Inter-unidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. São Paulo. 103 p.2009.
21. GOULD, E.A.; DE LAMBALLERIE, X.; ZANOTTO, P.M.; HOLMES, E.C. Origins, evolution, and vector/host co adaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, **59**: 277-314, 2003.

22. GRANTSAU, R. **Guia completo para identificação das aves do Brasil**. v. 1, 624p; v.2, 656p. Editora Vento Verde. São Paulo. 2010.
23. HAYMAN, P.; MARCHANT, J.; PRATER, T. Shorebirds. an identification guide to the waders of the world .London: **Croom Helm**. 412 p. 1986.
24. IVERSSON, L.B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na Região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Rev. Saúde Pública**. n.14, p.9-35,1980.
25. KARABATSOS, N. International catalogue of arboviroses and certain other viroses of vertebrates. 3 ed. San Antonio, USA. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1147p. 1985.
26. KOMAR, N.; CLARK, G.G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.19, p.112-117, 2006.
27. NUNES, A.P.; TOMAS, W.M. Aves Migratórias e Nômades Ocorrentes no Pantanal: Caracterização e conservação. (Documento 62). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Corumbá. 2004.
28. NUNES, A.P.; TOMAS, W.M. Aves Migratórias e Nômades Ocorrentes no Pantanal. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Corumbá. 122p. 2008. Disponível em: http://www.ararajuba.org.br/sbo/livros/Aves_migratorias_e_nomades_no_Pantanal.pdf. Acessado em 16.10.2011.
29. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Importancia de las virosis transmitidas por artrópodos y roedores para la salud pública em las Américas. **Boletim Epidemiológico**. v. 4; n. 3; 4 p.; 1983.
30. RAPPOLE, J.H.; DERRICKSON, S.R.; HUBÁLEK, Z. Migratory Birds and Spread of West Nile. **Emerging Infectious Diseases**; v. 6, n.4, p.319-328; July–August. 2000.
31. R 2.13. The R Foundation for Statistical Computing. Bell Laboratories. Disponível em: <http://www.r-project.org/>. Acessado em 15.09.2011.
32. SHOPE, R.E. The use of a micro hemagglutination inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Annual Microbiology**; n.11, p.167-171. 1963.

33. SHOPE, R.E.; SATHER, G.E. Arboviruses, *In* : LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J, Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 5th ed., **American Public Health Association**, Washington, D.C., p.767-814. 1979.
- 34.TELICO-JUNIOR, W.R.; AZEVEDO-JUNIOR, S.M.; LYRA-NEVES, RM. Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v.20, n.3; p.451-456. 2003.
- 35.TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. Documento Técnico, n.2. **Instituto Evandro Chagas**. Fundação Nacional de Saúde. Belém, 28p. 1994.
- 36.TSAI, T.F.; MITCHELL, C.J. St. Louis Encephalitis. In: Monath TP [editor]. The arboviruses: Epidemiology and Ecology. Florida: CRC Press.; v.IV, p.113-144. 1988.
- 37.VASCONCELOS, P.F.C; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses Pathogenic for man in Brazil. *In*: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p.72-99, 1998.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As arboviroses têm sido consideradas um dos problemas de saúde pública de maior importância no contexto mundial pela magnitude, capacidade de disseminação, transcendência e vulnerabilidade da população, além da ação direta no meio ambiente e sanidade animal.

Dentre as diversas arboviroses observadas em nosso meio e as de risco de introdução no Brasil, as que possuem características encefalitogênicas e as íctero-hemorrágicas tem se mostrado as de maior importância epidemiológica pela severidade dos casos em humanos e animais e pelo perfil epidêmico e epizootico.

A variedade de espécies animais reservatórios desses vírus tem sido um fator a ser considerado, pois demonstra a necessidade de uma avaliação específica sobre cada agravo, considerado a área geográfica e o perfil da população animal existente na área, que pode atuar como potencial reservatório amplificador desses agentes.

Entre as espécies de animais observadas que participam do ciclo das arboviroses, os equídeos têm demonstrado uma importância epidemiológica de relevância em algumas delas, sejam como sentinelas para determinação da presença ou ausência do agente na área como no caso das Encefalites Equinas e Febre do Nilo Ocidental, ou ainda pela detecção de anticorpos desses arbovírus.

Considerando as arboviroses sob o aspecto de transmissão, pode-se observar que a diversidade de vetores competentes para transmissão delas está ligada diretamente à sua abundância no meio ambiente e à característica antropofílica e de repasto sanguíneo nas aves, primatas, equinos, marsupiais, roedores, morcegos e outros mamíferos silvestres ou domésticos.

A detecção dos arbovírus em praticamente todos os continentes demonstra sua capacidade de disseminação, apesar de ser percebido que a presença de alguns vírus em determinadas áreas do mundo inibe a disseminação de outros do mesmo gênero. Entretanto, a capacidade de deslocamento de pessoas e

animais tem sido um fator relevante para a disseminação destes agentes em todo o mundo, em especial nas regiões tropicais do planeta.

No Brasil, a Região Amazônica é a área de maior relevância para as arboviroses, seja pela peculiaridade do ambiente e clima, seja pela diversidade de espécies animais reservatórios e vetores. Para confirmar o descrito acima, podem servir de exemplos as elevadas taxas de detecção de anticorpos contra os OROV, MAYV, MAGV, VPIX, CACV, YFV, DENV, TCMV, ROCV, ILHV, SLEV, EEEV, WEEV, MUCV, dentre outros, observados em primatas aves, equinos, marsupiais e isolamento de vírus em vetores da região.

Dentre os arbovírus, os alfavírus demonstram sua importância pela característica neurológica apresentada em humanos e equinos, pela elevada letalidade, em especial causada pelos EEEV e WEEV, além do impacto social e econômico ocasionado pela VEEV, quando as epizootias em equinos têm precedido a ocorrência de casos em humanos. Entretanto, o MAYV, apesar de ter uma manifestação clínica semelhante à causada pelo DENV, com a peculiaridade de presença de poliartrite e artralgia duradoura, tem-se demonstrado uma fonte de preocupação para as autoridades sanitárias brasileiras devido a possibilidade de estar sendo confundida com a dengue.

Dos vírus da família *Flaviviridae* estudados, o WNV é o de maior importância para a saúde pública, pela significativa letalidade observada em algumas espécies de aves silvestres, em equinos e humanos observados a partir de sua introdução no continente norte americano em 1999. Entretanto, a sua detecção na América do Sul tem demonstrado um perfil diferenciado no comportamento deste agente, desde a sua chegada à Argentina (2005), Colômbia (2006), Venezuela (2006) e na detecção de anticorpos neutralizantes observados no pantanal brasileiro. Enquanto isso, o SLEV tem sido encontrado em surtos esporádicos em humanos no Brasil e na América do Sul e o ROCV não tem sido encontrado em humanos desde a década de setenta, quando acometeu um número significativo de pessoas no Vale do Ribeira, em São Paulo.

A família *Bunyaviridae* tem como principal arbovírus o OROV, que apesar da demonstração de produzir epidemias significativas, como a do Amapá, em 2008, quando foram acometidas mais de 600 pessoas, tem se manifestado como uma

doença de sintomatologia branda, portanto com baixa virulência e pouca capacidade de produzir doença severa. É sabido da importância e participação dos primatas e da preguiça no ciclo desta enfermidade. A baixa prevalência em equinos foi sugestiva devido à preferência dos vetores por sangue de outras espécies animais.

A detecção de anticorpos dos mais diversos arbovírus em inquéritos sorológicos em aves, primatas e equinos no Brasil, tem demonstrado a grande circulação destes agentes sem causar doença nestas espécies animais, porém demonstra sua presença no ambiente e a necessidade de alerta para a possível ocorrência destas enfermidades em humanos.

Resultados recentemente obtidos a partir dessa estratégia, assim como os de recentes comunicações científicas, demonstraram evidências de presença de anticorpos contra o WNV em animais e ressaltam a importância da manutenção da vigilância da circulação do vírus no Brasil. Embora tenham sido obtidos resultados sorológicos positivos em duas pesquisas publicadas e em algumas amostras coletadas em ações de vigilância animal, ainda não foram registrados casos em nenhuma espécie animal, nem em humanos no Brasil. A detecção de anticorpos, embora sugestiva da circulação viral, não permite concluir sobre a presença do vírus no país, sendo necessário, para tal, o isolamento do vírus em animais, vetores ou em humanos.

Os resultados obtidos no estudo, também sugerem que a característica rural de algumas destas enfermidades dificulta a detecção de casos leves e moderados da doença em humanos, pela dificuldade de acesso ao serviço público de saúde.

Este estudo embasou o Ministério da Saúde, para que, por meio da Portaria Ministerial 104/2011, determinasse a obrigatoriedade da notificação de epizootias em equinos, aves e primatas no Brasil, objetivando a detecção precoce da circulação desses agentes ainda nos animais e como fator determinante para a tomada de decisão pelos serviços de saúde do país no sentido de execução das ações de prevenção e controle de meningites virais de etiologia causada pelos arbovírus estudados, febres hemorrágicas causadas pelos vírus da febre amarela, e de surtos de enfermidades febris causadas por potenciais arbovírus.

Com os resultados obtidos será possível mudar o perfil da vigilância das meningites virais sem etiologia conhecida que hoje acometem cerca de 11.000 pessoas a cada ano no país, podendo por meio da notificação das epizootias e dos inquéritos sorológicos serem passíveis de identificação dos agentes causadores dessas doenças em humanos.

Por fim, este estudo preenche uma grande lacuna na saúde pública veterinária do país, constituindo uma nova ferramenta de vigilância das arboviroses, por meio da investigação de epizootias em animais e determinação precoce da circulação de agentes patogênicos que possam colocar em risco a saúde da população dos animais e do meio ambiente.

Neste contexto, as arboviroses se destacam hoje como as principais doenças emergentes no mundo pela sua importância ecológica e epidemiológica, ficando clara a real necessidade de se conhecer os aspectos ecológicos destas enfermidades nas populações animais e o risco de transmissão para a população humana.

Anexo 2 – Ficha de investigação de epizootia

ROTEIRO DE INVESTIGAÇÃO DE EPIZOOTIA EM EQUIDEOS

Ficha Nº		Epizootia Nº	
1 Local da epizootia			
2 Endereço			
3 Local de referência			
4 Município			5 UF
6 Data de início da epizootia		7 Data de notificação	
8 Números de animais envolvidos na epizootia		9 Espécie(s) envolvida(s) () Equino () Mular () Asinino () Outra: _____	
10 Nome do animal () Não informado		11 Sexo do animal () Macho () Fêmea () Não informado	
12 Idade <input type="checkbox"/> < 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"/> N.I.			
13 Pelagem			
Castanha clara <input type="checkbox"/>		Castanha escura <input type="checkbox"/>	
Castanha marrom <input type="checkbox"/>		Alazã vermelha <input type="checkbox"/>	
Alazã fígado <input type="checkbox"/>		Tordilha <input type="checkbox"/>	
Baião <input type="checkbox"/>		Pampa de marrom <input type="checkbox"/>	
Pampa de preto <input type="checkbox"/>		Preto <input type="checkbox"/>	
Branco <input type="checkbox"/>		Palomina <input type="checkbox"/>	
Rosilho <input type="checkbox"/>		Outra: <input type="checkbox"/>	
14 Resenha			
15 Características que identificaram o animal			
16 O animal tem proprietário? () Sim () Não () Não informado			
Se sim, nome e endereço do proprietário			
Se não, nome e endereço do notificador			
17 Local onde o animal foi encontrado morto ou doente (endereço, fazenda, chácara e etc.)			
18 Coordenada geográfica 1 (S1)		19 Coordenada geográfica 1 (W1)	

20 Local de moradia do animal (Se for diferente do local onde foi encontrado morto ou doente)

21 Coordenada geográfica 2 (S2) 22 Coordenada geográfica 2 (W2)

23 Informar o último local de moradia do animal (Se o local atual for inferior a uma mês)

24 Coordenada geográfica 3 (S3) 25 Coordenada geográfica 3 (W3)

26 Características do ambiente onde o animal foi encontrado doente ou morto

27 O animal deslocou-se do seu ambiente natural de moradia e/ou trabalho no último mês? () Sim () Não () Não informado
Se sim, descrever o ambiente _____

28 Outros animais conviveram com o animal doente ou morto nos últimos 15 dias? () Sim () Não () Não informado
Se sim,

Nº de animais	Espécie	Nº de animais	Espécie	Nº de animais	Espécie	Nº de animais	Espécie
	Eqüinos		Ovínos / Caprínos		Caninos		
	Bovínos		Suínos		Aves domésticas		

29 Algum animal adoeceu e/ou morreu? () Sim () Não () Não informado - Se sim, quantos () espécie _____
Descrever sinais, sintomas e evolução clínica _____

30 Animal vacinado () Sim () Não () Não informado

Vacinado	Doença	Data	Vacinado	Doença	Data
	Influenza			Triplice	
	Encefalomielite			Raiva	
	Tétano				

31 Utilidade do animal () Trabalho () Passado () Esporte () Não informado () Outra _____

32 Característica clínica do caso:

Febre <input type="checkbox"/>	Conjuntivite <input type="checkbox"/>	Letargia <input type="checkbox"/>	Depressão <input type="checkbox"/>
Anorexia <input type="checkbox"/>	Emagrecimento <input type="checkbox"/>	Coriza <input type="checkbox"/>	Tosse <input type="checkbox"/>
Respiração ofegante <input type="checkbox"/>	Miíase <input type="checkbox"/>	Opistótomos <input type="checkbox"/>	Catarrho <input type="checkbox"/>
Apatia <input type="checkbox"/>	Espasmo muscular <input type="checkbox"/>	Tremores <input type="checkbox"/>	Lábios flácidos <input type="checkbox"/>
Stomatite <input type="checkbox"/>	Trismo (mandíbula travada) <input type="checkbox"/>	Bruetismo (ranger dos dentes) <input type="checkbox"/>	Sonolência <input type="checkbox"/>
Inquietude <input type="checkbox"/>	Excitabilidade <input type="checkbox"/>	Orelhas eretas (em tesoura) <input type="checkbox"/>	Taquicardia <input type="checkbox"/>
Cabeça apoiada em obstáculos <input type="checkbox"/>	Andar em círculos <input type="checkbox"/>	Postura de cavalete (pernas abertas) <input type="checkbox"/>	Incoordenação motora <input type="checkbox"/>
Andar deambulante (perda de orientação) <input type="checkbox"/>	Marcha rígida <input type="checkbox"/>	Sinais hemorrágicos <input type="checkbox"/>	Claudicação <input type="checkbox"/>
Paresia do trem posterior <input type="checkbox"/>	Pedalagem <input type="checkbox"/>	Convulsões <input type="checkbox"/>	Coma <input type="checkbox"/>
Morte <input type="checkbox"/>	Outros: _____		

33 Tipo de criação () Intensiva (Bala) () Semi-Intensiva (Bala + Piquete) () Extensiva (Solto) () Não informado () Outra _____

34 Tipo de alimentação
 Ração. Qual? _____
 Capim. Qual? _____
 Pastagem. Qual? _____
 Feno. Qual? _____
 Observação: _____

35 Tipo de armazenagem do alimento _____

36 Fonte de água Riacho Lago Poço Tometa Não informado Outra _____

37 Foi medicado durante o período em que esteve doente Sim Não Não informado
 Se sim, descrever _____

38 Foi vermifugado durante o período em que esteve doente Sim Não Não informado
 Se sim, descrever _____

39 Se animal doente, coletado material Sim Não Não informado
 Se sim, Sangue Liqueur Outro _____

40 Se animal morto, coletado material Sim Não Não informado
 Se sim, Cérebro Medula Sangue Liqueur Outro _____

41 Existe possibilidade de coleta de material para exame laboratorial de outros animais da área Sim Não Não informado
 Se sim, qual material? _____

Nº de animais	Espécie	Nº de animais	Espécie	Nº de animais	Espécie	Nº de animais	Espécie
	Equinos		Aves domésticas		Morcegos		Mosquitos
	Bovinos		Aves silvestres		Rodedores		

42 Existe possibilidade de coleta de outros tipos de material para exame laboratorial Sim Não Não informado
 Se sim, Água Alimento Outra _____

43 Laboratório de envio da amostra _____
 Data: | | | | | | | | | | | | | | | |

44 Resultado laboratorial Sim Não Não informado
 Especificar: _____
 Data: | | | | | | | | | | | | | | | |

45 Suspeita diagnóstica
 Raiva Encefalite equina Febre do Nilo Ocidental Herpes vírus equino
 Botulismo neurológico Tetano Intoxicação _____

46 Evolução clínica do caso Cura Óbito Não informado
 Se óbito, data: | | | | | | | | | | | | | | | |

47 Outras informações que forem consideradas relevantes (inclusive pessoas do local com quebra, adoecimento ou algo relevante)

48 Nome do investigador _____ 49 Assinatura _____ 50 Data da investigação _____
 | | | | | | | | | | | | | | | |

51 Função _____ 52 Telefone de contato _____

Anexo 3 - Resenha

COVEVIC/GDT/DEVEPI/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
Dados do animal	7	Local de guarda do animal. Se diferente do endereço do proprietário, Endereço e Bairro:				
	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-Balo 14-Outra. Especificar _____ 5-Alazã ilgado 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	
Observação	20	Local de coleta do sangue 1-fazenda 2-Festa agropecuária 3-Hípica 4-Cavalaria 5-CCZ 6-Outro. Especificar: _____ <input type="checkbox"/>				
	Observações:					
Resp.	18	Nome do responsável		19	Data	
					20	Assinatura do responsável

