

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
Doutorado em Medicina Tropical

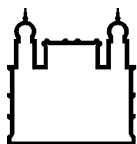
**Alex Pauvolid-Corrêa**

**Investigação para a circulação do vírus do oeste do Nilo e outros flavivírus no  
Pantanal de Mato Grosso do Sul**

Tese apresentada à coordenação do  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

Orientador: **Prof. Dr. Hermann Schatzmayr (*in memoriam*)**  
**Profa. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira**  
**Prof. Dr. Nicholas Komar**

Rio de Janeiro  
2012



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
Doutorado em Medicina Tropical

**Alex Pauvolid-Corrêa**

**Investigação para a circulação do vírus do oeste do Nilo e outros flavivírus no  
Pantanal de Mato Grosso do Sul**

---

Orientadora: **Profa. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira**

Banca examinadora

---

Prof. Dra. Elba Lemos (Presidente) (IOC-FIOCRUZ RJ, Brasil)

---

Profa. Dra. Silvana Levis (INEVH-ANLIS BsAs, Argentina)

---

Prof. Dr. Davis Ferreira (UFRJ RJ, Brasil)

---

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio (FIOCRUZ MS, Brasil)

---

Profa. Dra. Nildimar Honório (IOC-FIOCRUZ RJ, Brasil)

Rio de Janeiro, 05 de Dezembro de 2012.

Com carinho ao Dr. Hermann Schatzmayr.

## AGRADECIMENTOS

Um agradecimento muito especial ao meu orientador Hermann Schatzmayr (*in memoriam*), que muito mais que um orientador foi um grande amigo que sempre demonstrou muito carinho e confiança durante todo o tempo que trabalhamos juntos.

Especial agradecimento também à minha orientadora Rita Nogueira e também ao meu orientador Nicholas Komar por me receber em seu laboratório e por toda amizade, apoio e orientação que recebi durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, à Lauren Hubert Jaeger e também à Ellane Rachel Cleys da Colorado State University por todo carinho e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Dinair Couto, que me acompanhou durante o trabalho de campo e foi fundamental para o estudo com culicídeos desenvolvidos neste trabalho. Em especial também à Ana Bispo por todo o seu apoio e amizade e também pelo aceite em participar como membro suplente da banca de avaliação desta tese. Agradecimento especial também à Flávia Barreto, Denilde Souza, Solange Conceição e José Farias. Agradecimento também à Priscila Conrado, Jaqueline Simões, Nieli Faria, Bianca De Santis, Fernanda Bruycker, Monique Lima, Leda dos Santos, Eliane Araújo, Simone Sampaio e todos do laboratório.

A todos do Instituto Nacional de Enfermidades Virales Humanas “Dr. Julio Maiztegui”, em especial à amiga Silvana Levis, por todo apoio e também pelo aceite em participar como membro da banca de avaliação desta tese. Um agradecimento muito especial também à Maria Alejandra Morales por toda a amizade, atenção e ajuda, assim como à Victoria Luppó, Pablo Baroni, Lucas Bogdanic, Stella Fuster, Noemi Pini e Silvina Coenaga por todo apoio durante a minha visita à instituição.



A todos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial à Vanessa Müller por toda a sua ajuda como pesquisadora e o Luis Tadeu Figueiredo por todo o apoio durante a minha visita à instituição.

A todos do Centers for Disease Control and Prevention, em especial à Janeen Laven, Nicholas Panella, kristen Burkhalter, Olga Kosoy, Kali Shaw e Jason Velez, Joanie Kenney e Aaron Brault por todo apoio e cooperação, assim como também para Andrew Golnar, Karen Boroughs, Jeremy Ledermann, Alison Johnson, Brandy Russell, Marvin Godsey, Barbara Johnson, Robert Lanciotti, Harry Savage, Roger Nasci e Janae Stovall.

A todos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, fundamental para o desenvolvimento deste estudo, em especial à Zilca Campos, por todo o trabalho de campo que fizemos juntos, amizade e colaboração. Muito obrigado também especialmente ao Oziel da Silva, Henrique de Jesus, Cremilson Gonçalves e Murilo Maciel, José Augusto da Silva e Marcos Tadeu por toda atenção, apoio e amizade durante os trabalhos de campo. Agradeço também a Márcia Furlan, Thierry Tomich, Armindo Gonçalves, Hidelberto Petzold, Márcio da Silva, Marcos José Alves, Nelson Rodrigues, Roberto Rondon, Sebastião de Jesus, Vandir da Silva, Ricardo Oseko e Marcílio de Brito.

Aos proprietários das fazendas e amigos do Pantanal, muito obrigado pela colaboração e gentileza em ajudar neste trabalho, em especial a minha querida amiga Maria Esther Oliveira por todo carinho, atenção e suporte durante minhas muitas visitas ao Pantanal. Um agradecimento especial também ao Heitor Herrera, pela amizade a apoio e também Tânia Maciel, Luciano Barros, Vicente Gomes, Joaquim Gomes e João Monteiro. Um agradecimento muito especial também a todos os pantaneiros das propriedades visitadas, por todo suporte e atenção durante as coletas realizadas, Marcelo Santos, Francisco Rondon, Luís Fernando Santiago, Gilberto Silva, Marcelo Dias, José Mendes, Marcos Moraes, Luiz Graça, Luiz da Silva, Benis da Silva e Sebastião Gonzaga, Nei Oliveira, Luis Mário, Antônio Rondon, João Fernandes, Silvio Costa, João Cesarino, Luis Gomes, José Pereno, César Rodrigues, Marcos da Silva, Renato da Silva, Arsenio Souza, Antonio Ferreira, Irizeu Cardoso, Valdir de Oliveira, Luiz Otávio, Julio Rodrigues, Luis Aquino

da Silva, Jonathan Soares, José Pereira, Alcione dos Santos, Edgar, Mario do Espírito Santo, Gerson Ferreira, Augusto Bernardo, Valdinei Pinto, Mateus Oliveira, Jobson Rodrigues, Leandro Ferreira, João de Arruda, Odir da Silva, Leandro, Ramon Almada, Elisângela Rosa, Joelson, Bento, Laurito Bittencourt, Edevar da Silva, Edson Silva, José Carlos da Silva, Luis de Arruda, Sebastião Rodrigues, Clarindo Mendes, Francisco Mendes, Martinez Maldonado, Edilvanio Costa, Juscelino Carmona, Luiz Alberto da Costa, Celso Vaz, João Fernandes, Jonathan Gonçalvez e Edgar de Oliveira.

À Monika Barth do Laboratório de Morfologia e Ultra Estrutura do Instituto Oswaldo Cruz por toda a colaboração, carinho e suporte durante o desenvolvimento deste estudo.

Ao amigo Nicolau Serra Freire do Laboratório de Biodiversidade Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz pela amizade e colaboração em parte do trabalho desenvolvido.

Um agradecimento muito especial à Elba Lemos do Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz pela sua incondicional ajuda e amizade e também pelo aceite em ser revisora e também presidente da banca de avaliação desta tese.

Aos coordenadores de curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz Filipe Aníbal, Alda Cruz e Márcio Bóia por todo carinho, ajuda e suporte dado pelo programa.

Ao amigo José Rodrigues Coura por toda a atenção durante o ótimo curso de aperfeiçoamento das doenças infecciosas e parasitárias.

Aos jovens Airton Silva e Loezi Pereira da Universidade Federal de Mato Grosso pela ajuda em parte do trabalho de campo realizado no Pantanal.

Ao amigo Rivaldo Venâncio da Cunha da Fundação Oswaldo Cruz Pantanal e Cerrado em Mato Grosso do Sul pela atenção e aceite em participar como membro da banca de avaliação desta tese.

Ao amigo Davis Ferreira da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela atenção e aceite em participar como membro da banca de avaliação desta tese.

À amiga Fernanda Burlandy do Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz pelo carinho e atenção em aceitar participar como membro suplente da banca de avaliação desta tese.

À amiga Nildimar Honório do Instituto Oswaldo Cruz pela atenção e aceite em participar como membro da banca de avaliação desta tese.

Ao Jorge Gonçalves da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela ajuda em parte do trabalho de campo realizado no Pantanal.

À Dircea Longo do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela atenção durante as emissões das licenças de exportação das amostras.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pantanal pelo suporte fornecido durante os trabalhos de campo realizados no Pantanal.

À Fulbright por toda atenção e suporte durante o desenvolvimento de parte da tese nos EUA, incluindo o curso intensivo de inglês na Colorado State University e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por todo o apoio recebido durante os meus estudos nos EUA, fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centers for Disease Control and Prevention por todo o suporte fornecido durante todo o período em que as análises foram realizadas nos EUA.

Ao Instituto Nacional de Enfermidades Virales Humanas “Dr. Julio Maiztegui” por todo o suporte fornecido durante todo o período em que as análises foram realizadas na Argentina.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por todo o suporte fornecido durante todo o período em que as análises foram realizadas em Ribeirão Preto.

À Fundação Oswaldo Cruz e também à Fundação de Amparo do estado do Rio de Janeiro por todo o suporte fornecido durante as viagens para o Pantanal e todo o período em que as análises foram realizadas Rio de Janeiro.

## RESUMO

Apesar de evidências sorológicas da circulação do vírus do oeste do Nilo (WNV) na Argentina, Colômbia e Venezuela, este vírus ainda não foi detectado na maioria dos países da América do Sul. Em 2009 e 2010 foi realizada uma investigação para a circulação de WNV em artrópodes, equídeos, ovinos e crocodilianos do Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. Um total de 4514 artrópodes e 90 amostras de soro de crocodiliano foi submetido ao isolamento viral e RT-PCR para detecção de flavivírus. Paralelamente, amostras de soro de 892 equídeos, 238 ovinos, 90 crocodilianos foram inicialmente submetidas ao ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática de bloqueio de epitopos específico para flavivírus (ELISA de bloqueio). As amostras soropositivas foram sequencialmente submetidas ao teste de neutralização por redução de placas (PRNT<sub>90</sub>) para WNV e outros onze flavivírus que circulam no Brasil para confirmar a detecção de anticorpos neutralizantes específicos. O vírus Ilhéus foi isolado de espécimes de *Ochlerotatus scapularis* e potenciais novos flavivírus foram detectados em grupos de *Culex chidesteri* e *Mansonia pseudotitillans*. Todas as amostras de crocodilianos foram negativas no isolamento viral e RT-PCR. Todos os crocodilianos e ovinos foram negativos para a presença de anticorpos específicos para flavivírus por ELISA de bloqueio. Entre as 466 (52,2%) amostras de soro de equídeo soropositivas no ELISA de bloqueio, 94 (10,5%) foram soropositivas para o vírus Ilhéus, 57 (6,4%) para o vírus da encefalite de Saint Louis, 27 (3%) para o WNV, cinco (0,6%) para o vírus Cacipacoré e uma (0,1%) para o vírus Rocio usando PRNT<sub>90</sub>, com um critério de positividade a diferença de quatro vezes entre os títulos de anticorpos para todos os flavivírus testados. Não foram detectadas evidências sorológicas da circulação dos quatro vírus dengue, vírus da febre amarela, vírus Bussuquara ou vírus Iguape em equídeos na região. O presente estudo é o primeiro relato de evidência sorológica por PRNT<sub>90</sub> da circulação de WNV no Brasil.

## ABSTRACT

Despite evidence of West Nile virus (WNV) activity in Colombia, Venezuela and Argentina, this virus has not been reported in most South American countries. In 2009 and 2010, an investigation for WNV in arthropods, horses, sheep and caimans from the Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil was conducted. A total of 4514 arthropods and 90 caiman serum samples were submitted to viral isolation and RT-PCR for flavivirus detection. Concurrently, the sera of 892 horses, 238 sheep and 90 caimans were initially tested using a flavivirus-specific epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay (blocking ELISA) for the detection of flavivirus-reactive antibodies. The seropositive samples were further tested using a plaque-reduction neutralization test (PRNT<sub>90</sub>) for WNV and other 11 flaviviruses that circulate in Brazil to confirm the detection of specific virus-neutralizing antibodies. Ilheus virus was isolated from *Ochlerotatus scapularis* pool and potentially novel flaviviruses were detected in *Culex chidesteri* and *Mansonia pseudotitillans* pools. No flavivirus genome was detected or arbovirus isolated from caiman blood. All caimans and sheep were negative for flaviviruses-specific antibodies using the blocking ELISA. Among 466 (52.2%) blocking ELISA-seropositive horse serum samples, 94 (10.5%) were seropositive for Ilheus virus, 57 (6.4%) were seropositive for St. Louis encephalitis virus, 27 (3%) were seropositive for WNV, five (0.6%) were seropositive for Cacipacore virus and one (0.1%) was seropositive for Rocio virus using PRNT<sub>90</sub>, with a criteria of  $\geq$ four-fold antibody titer difference. There was no serological evidence of Dengue viruses, Yellow fever virus, Bussuquara virus and Iguape virus infection in local horses. The present study is the first report of serological evidence using PRNT<sub>90</sub> of WNV activity in Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -----	14
Organização do genoma dos flavivírus.	
Figura 1.2 -----	43
Sub-regiões do Pantanal de MS.	
Figura 3.1 -----	56
Localização da área de estudo na América do Sul.	
Figura 3.2 -----	57
Localização da área de estudo no Brasil.	
Figura 3.3 -----	57
Localização das propriedades na área de estudo.	
Figura 3.4 -----	60
Distribuição por sexo e espécie dos equídeos amostrados.	
Figura 3.5 -----	60
Distribuição por idade dos equídeos com registro de idade.	
Figura 3.6 -----	61
Distribuição por raças dos equinos.	
Figura 3.7 -----	61
Distribuição por condição de doma dos equinos.	
Figura 3.8 -----	70
Distribuição por sexo dos ovinos.	

Figura 3.9 -----	82
Distribuição por sexo dos jacarés-do-pantanal.	
Figura 3.10 -----	82
Número de capturas de culicídeos por períodos ecologicamente distintos.	
Figura 3.11 -----	83
Número de capturas de culicídeos por mês e ano.	
Figura 3.12 -----	83
Número de capturas por métodos utilizados.	
Figura 4.1 -----	110
Soropositividade de equídeos no ELISA de bloqueio para flavivírus.	
Figura 4.2 -----	110
Soropositividade de equídeos no ELISA de bloqueio para flavivírus por sexo e espécie.	
Figura 4.3 -----	111
Soropositividade de equídeos no ELISA de bloqueio para flavivírus por faixa etária em animais com registro de idade.	
Figura 4.4 -----	112
Soropositividade de equídeos por propriedade no ELISA de bloqueio para flavivírus.	
Figura 4.5 -----	119
Soropositividade de equídeos por PRNT <sub>90</sub> .	
Figura 4.6 -----	120
Número de propriedades em que equídeos soropositivos por PRNT <sub>90</sub> foram detectados.	



Figura 4.7 -----	144
Número absoluto de equídeos soropositivos por PRNT <sub>90</sub> de acordo com o sexo.	
Figura 4.8 -----	144
Distribuição de soropositividade por PRNT <sub>90</sub> por sexo e espécie de equídeos.	
Figura 4.9 -----	146
Distribuição por idade dos equídeos soropositivos por PRNT <sub>90</sub> .	
Figura 4.10 -----	146
Distribuição de soropositivos por PRNT <sub>90</sub> por condição de doma.	
Figura 4.11 -----	150
Número de culicídeos capturados por mês e ano.	
Figura 4.12 -----	150
Número de culicídeos capturados por períodos ecologicamente distintos.	
Figura 4.13 -----	151
Distribuição dos culicídeos capturados de acordo com o método de captura.	
Figura 4.14 -----	153
Número absoluto de culicídeos capturados de acordo com o mês e ano de captura.	
Figura 4.15 -----	154
Número total de culicídeos capturados por espécie.	
Figura 4.16 -----	162
Curva de dissociação da amostra MQ335 em PCR em tempo real.	

Curva de dissociação da amostra MQ294 em PCR em tempo real.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 -----	59
Distribuição das coletas de sangue por mês e propriedade.	
Quadro 3.2 -----	92
Número de amostras submetidas ao isolamento viral, teste de placas e métodos moleculares para detecção de arbovírus.	
Quadro 4.1 -----	113
Número de equídeos soropositivos no ELISA de bloqueio.	
Quadro 4.2 -----	126
Resultados de PRNT <sub>90</sub> em amostras soropositivas no ELISA de bloqueio de equídeos do Pantanal de MS.	
Quadro 4.3 -----	155
Distribuição por tipo de armadilha e período de coleta de culicídeos capturados no Pantanal de MS em 2009 e 2010.	
Quadro 4.4 -----	157
Amostras positivas ou sugestivas no isolamento viral e teste de placas.	
Quadro 4.5 -----	163
Resultados da RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real das amostras positivas no isolamento viral.	
Quadro 4.6 -----	164
Amostras positivas na RT-PCR em tempo real que apresentaram similaridade significativa à sequências depositadas no <i>Genbank</i> .	

Amostras de artrópodes com resultados sugestivos ou positivos no isolamento viral ou com resultados positivos na RT-PCR em tempo real e que apresentaram similaridade significativa à sequências depositadas no *Genbank*.

## LISTA DE FOTOS

Foto 3.1 -----	62
Equinos domados da propriedade PN após a coleta de sangue no Pantanal de MS em 2009. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 3.2 -----	63
Coleta de sangue em equino não domado da propriedade PR no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.	
Foto 3.3 -----	64
Coleta de sangue em equino domado na propriedade PG no Pantanal de MS em 2010. Foto: Propriedade PG.	
Foto 3.4 -----	66
Equino doente apresentando quadro neurológico sem diagnóstico definido na propriedade PJ no Pantanal de MS em 2009. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 3.5 -----	67
Coleta de sangue em equino jovem não domado com lesão sugestiva de mordedura por morcego hematófago na propriedade PM no Pantanal de MS em 2009. Foto: Jorge UFMS.	
Foto 3.6 -----	68
Equino encontrado morto por causa desconhecida em propriedade não amostrada no Pantanal de MS. Foto: Alex Pauvalid-Correa.	
Foto 3.7 -----	70
Ovinos em criação semiextensiva na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	

Foto 3.8 -----	71
Coleta de sangue em ovinos em criação semiextensiva na propriedade PS no Pantanal de MS em 2009. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
 Foto 3.9 -----	 73
Área com alta concentração de jacarés-do-Pantanal escolhida para captura e coleta de sangue na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
 Foto 3.10 -----	 74
Jacaré-do-Pantanal observado em área de mata na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
 Foto 3.11 -----	 75
Captura de jacarés-do-Pantanal em ambiente lântico na propriedade PU no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.	
 Foto 3.12 -----	 76
Jacaré-do-Pantanal capturado na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
 Foto 3.13 -----	 77
Jacaré-do-Pantanal capturado tendo as pálpebras fechadas por fita adesiva plástica na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
 Foto 3.14 -----	 78
Jacaré-do-Pantanal sendo pesado pela equipe da Embrapa Pantanal na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
 Foto 3.15 -----	 79
Coleta de sangue em jacaré-do-Pantanal na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Zilca Campos.	

Foto 3.16 -----	85
Armadilha luminosa tipo CDC na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa	
Foto 3.17 -----	86
Mosquitos durante hematofagia em equino na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 3.18 -----	87
Mosquitos sendo capturados durante hematofagia em membro da equipe na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 3.19 -----	88
Mosquitos sendo capturados durante hematofagia em jacaré-do-Pantanal na propriedade PU no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.	
Foto 4.1 -----	109
Microplaca de ELISA de bloqueio com as amostras de soro em triplicata do equídeo 928 até equídeo 945. Controle positivo poço B11 até D11 e controle negativo do poço E11 até G11. Amostras 928, 929, 936, 937, 938, 941, 943 e 944 foram soropositivas. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.2 -----	114
Microplaca de ELISA de bloqueio com as amostras de soro em triplicata do ovino 185 até ovino 202. Controle positivo poço B11 até D11 e controle negativo do poço E11 até G11. Todas as amostras foram soronegativas. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.3 -----	115
Microplaca de ELISA de bloqueio com as amostras de soro em triplicata dos crocodilianos 69, 71, 74, 78, 81, 82, 84, 87, 92, 95, 96, 100, 102, PBS, 106, 107, 108 e 109. Controle positivo do B11 até D11 e controle negativo do E11 até G11. Todas as amostras foram soronegativas. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	

Foto 4.4 -----	121
Microplacas de PRNT <sub>90</sub> para ILHV com a amostra de soro do equídeo 838 em seis diluições em duplicatas. O título de PRNT <sub>90</sub> para ILHV desta amostra foi de 1:160. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.5 -----	122
Microplacas de PRNT <sub>90</sub> para SLEV com a amostra de soro do equídeo 398 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por SLEV foram marcadas em preto para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT <sub>90</sub> para SLEV desta amostra foi de 1:320. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.6 -----	123
Microplacas de PRNT <sub>90</sub> para WNV com a amostra de soro do equídeo 906 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por WNV foram marcadas em preto para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT <sub>90</sub> para WNV desta amostra foi de 1:320. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.7 -----	124
Microplacas de PRNT <sub>90</sub> para ROCV com a amostra de soro do equídeo 357 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por ROCV foram marcadas em azul para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT <sub>90</sub> para ROCV desta amostra foi de 1:160. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.8 -----	125
Microplacas de PRNT <sub>90</sub> para CPCV com a amostra de soro do equídeo 331 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por CPCV foram marcadas em azul para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT <sub>90</sub> para CPCV desta amostra foi de 1:160. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	
Foto 4.9 -----	158
Microplaca de isolamento viral em C6/36 com as amostras de grupos de mosquitos 294, 296 e 297 em duplicatas. ECP nos dois poços inoculados com a amostra MQ294. ECP observado em 6 dpi. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.	



Foto 4.10 ----- 159  
Microplaca de teste de placas em VERO mostrando formação de placas nos dois poços inoculados com a amostra MQ294. A presença de placas foi observada em 3 dpi. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.

Foto 4.11 ----- 160  
Inoculação da amostra MQ294 em VERO para confirmação do isolamento viral, mostrando mudança de coloração do meio de manutenção em virtude da alteração de pH no início do ECP em 2 dpi. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHSV	<i>African horse sickness virus</i>
AKAV	<i>Akabane virus</i>
BA	Estado da Bahia
BEFV	<i>Bovine ephemeral fever virus</i>
BSQV	<i>Bussuquara virus</i>
BTV	<i>Bluetongue virus</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CPCV	<i>Cacipacore virus</i>
CXFV	Culex flavivirus
DENV	<i>Dengue virus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dpi	Dias pós-infecção
ECP	Efeito citopatogênico
EEEV	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FC	Fixação de complemento
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
IF	Imunofluorescência
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IGUV	<i>Iguape virus</i>
IH	Inibição da hemaglutinação
ILHV	<i>Ilheus virus</i>
INEVH	Instituto Nacional de Enfermidades Virales Humanas “Dr. Julio Maiztegui”
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
KOUV	<i>Koutango virus</i>
LABE	Laboratório de Biodiversidade Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz e referência nacional em vetores das riquetsioses da Fundação Oswaldo Cruz
LABFLA	Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz e referência macrorregional de dengue e febre amarela da Fundação Oswaldo Cruz
MAb	Anticorpo monoclonal
MAGV	<i>Maguari virus</i>
MAYV	<i>Mayaro virus</i>
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MOI	Índice de multiplicidade de infecção
MS	Estado de Mato Grosso do Sul
MT	Estado de Mato Grosso
MVEV	<i>Murray Valley encephalitis virus</i>
NB-3	Segurança biológica II Tipo B em Laboratório de Biossegurança 3
NJLV	<i>Naranjal virus</i>
NT	<i>Neutralization Test</i>
OROV	<i>Oropouche virus</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PA	Estado do Pará
PB	Estado da Paraíba
PE	Estado de Pernambuco
PR	Estado do Paraná
PRNT	<i>Plaque-Reduction Neutralization test</i>
RJ	Estado do Rio de Janeiro
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RO	Estado de Rondônia
ROCV	<i>Rocio virus</i>
RS	Estado do Rio Grande do Sul
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RVFV	<i>Rift Valley fever virus</i>
SFB	Soro fetal bovino
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i>
SP	Estado de São Paulo
T150	Garrafas de 150 cm <sup>2</sup>
T25	Garrafas de 25cm <sup>2</sup>
TCMV	<i>Tacaiuma virus</i>
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFP	Unidade formadora de placa
VEEV	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>
WEEV	<i>Western equine encephalitis virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
YFV 17D	Derivado vacinal de YFV

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A -----	236
Licença do comitê de ética no uso de animais	
Anexo B -----	237
Autorização para atividades com finalidade científica 18363-1	
Anexo C -----	238
Autorização para atividades com finalidade científica 18363-2	
Anexo D -----	239
Autorização de exportação de artrópodes para Argentina	
Anexo E -----	240
Autorização de exportação de soro/sangue de crocodilianos para Argentina	
Anexo F -----	241
Autorização de exportação de artrópodes para os EUA	
Anexo G -----	243
Autorização de exportação de soro/sangue de crocodilianos para os EUA	
Anexo H -----	244
Termo de autorização para coleta de sangue de equinos em propriedade particular	
Anexo I -----	245
Ficha com dados da coleta de soro equino	
Anexo J -----	246
Preparação de antígeno para ELISA de bloqueio	

Anexo K -----	250
Teste para cálculo de diluição de antígeno e anticorpo monoclonal	
Anexo L -----	254
Protocolo de ELISA de bloqueio para flavivírus	
Anexo M -----	258
Propagação e titulação viral	
Anexo N -----	267
Teste de neutralização por redução de placas (PRNT)	
Anexo O -----	281
Parte dos resultados publicada em artigo	
Anexo P -----	289
2X Ye-Lah meio de <i>overlay</i> sem bicarbonato de sódio	

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	OS ARBOVÍRUS	1
<b>1.1.1</b>	<b>Importância para a saúde pública</b>	<b>5</b>
1.1.1.1	No mundo	5
1.1.1.2	No Brasil	6
<b>1.1.2</b>	<b>Importância para a sanidade animal</b>	<b>7</b>
1.1.2.1	No mundo	7
1.1.2.2	No Brasil	8
<b>1.1.3</b>	<b>A circulação de arbovírus no Brasil</b>	<b>9</b>
1.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES	11
1.3	OS ARBOVÍRUS PESQUISADOS NO PRESENTE ESTUDO	13
<b>1.3.1</b>	<b>Flaviviridae</b>	<b>13</b>
1.3.1.1	Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)	15
1.3.1.2	Vírus do oeste do Nilo (WNV)	19
1.3.1.3	Vírus da febre amarela (YFV)	25
1.3.1.4	Vírus Dengue (DENV)	30
1.3.1.5	Vírus Rocio (ROCV)	34
1.3.1.6	Vírus Ilhéus (ILHV)	37
1.3.1.7	Vírus Cacipacoré (CPCV), Vírus Iguape (IGUV) e Vírus Bussuquara (BSQV)	38
1.4	O LOCAL ESCOLHIDO PARA A PESQUISA	41
<b>1.4.1</b>	<b>Avifauna de hábitos migratórios</b>	<b>44</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Fauna de culicídeos</b>	<b>45</b>

1.4.3	<b>Cavalo Pantaneiro</b>	46
1.4.4	<b>Crocodilianos do Pantanal</b>	47
1.4.5	<b>Atividade e circulação humana no Pantanal de MS</b>	49
1.5	JUSTIFICATIVA	50
2	<b>OBJETIVOS</b>	52
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	52
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	53
3.1	INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES	53
3.2	AUTORIZAÇÕES E LICENÇAS	53
3.2.1	<b>Licença do comitê de ética no uso de animais</b>	53
3.2.2	<b>Autorização do sistema de autorização e informação em biodiversidade</b>	53
3.2.3	<b>Licença de exportação de parte das amostras para Argentina</b>	54
3.2.4	<b>Licença de exportação de parte das amostras para os EUA</b>	54
3.2.5	<b>Autorização de exportação de todas as amostras</b>	54
3.2.6	<b>Autorização das fazendas para as coletas de sangue</b>	55
3.3	METODOLOGIA DAS AMOSTRAGENS	56
3.3.1	<b>Amostragens</b>	56
3.3.1.1	Coleta de sangue em população de equídeos	58
3.3.1.2	Coleta de sangue em população de ovinos	69
3.3.1.3	Coleta de sangue em população de crocodilianos	72
3.3.1.4	Acondicionamento das amostras de sangue	80
3.3.1.5	Capturas e coletas de artrópodes	80
3.3.1.5.1	<b><i>Culicídeos</i></b>	81



<b>3.3.1.5.2</b>	<b><i>Ixodídeos</i></b>	89
3.4	ANÁLISES LABORATORIAIS	89
<b>3.4.1</b>	<b>Processamento das amostras</b>	90
3.4.1.1	Trituração dos artrópodes	90
<b>3.4.1.1.1</b>	<b><i>Culicídeos</i></b>	90
<b>3.4.1.1.2</b>	<b><i>Ixodídeos</i></b>	91
<b>3.4.2</b>	<b>Cultivos celulares</b>	91
<b>3.4.3</b>	<b>Isolamento viral e teste de placas</b>	92
3.4.3.1	Isolamento viral em VERO e C6/36	93
<b>3.4.3.1.1</b>	<b><i>Células VERO</i></b>	93
<b>3.4.3.1.2</b>	<b><i>Células C6/36</i></b>	93
3.4.3.2	Teste de placas	94
<b>3.4.4</b>	<b>ELISA de bloqueio</b>	95
3.4.4.1	Preparação de antígeno	96
<b>3.4.4.1.1</b>	<b><i>Cálculo da diluição do antígeno e do MAb 6B6C-1</i></b>	97
<b>3.4.4.1.2</b>	<b><i>Execução do ELISA de Bloqueio</i></b>	98
<b>3.4.5</b>	<b>Teste de neutralização por redução de placas (PRNT)</b>	99
<b>3.4.6</b>	<b>Técnicas moleculares</b>	102
3.4.6.1	Extração de RNA	102
3.4.6.2	RT-Nested-PCR convencional genérico para flavivírus	102
3.4.6.3	PCR em tempo real genérico para flavivírus	102
3.4.6.4	Sequenciamento nucleotídico	103
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS DE SOROPOSITIVIDADE	104
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	104
4.1	AMOSTRAS VIRAIS UTILIZADAS PARA PRNT <sub>90</sub>	104

<b>4.1.1</b>	<b>Confirmação da identidade por sequenciamento nucleotídico</b>	104
4.1.1.1	Vírus do oeste do Nilo (WNV)	104
4.1.1.2	Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)	104
4.1.1.3	Vírus Ilhéus (ILHV)	105
4.1.1.4	Vírus da febre amarela (YFV) (17D)	105
4.1.1.5	Vírus Bussuquara (BSQV)	105
4.1.1.6	Vírus Cacipacoré (CPCV)	105
4.1.1.7	Vírus Iguape (IGUV)	105
4.1.1.8	Vírus Rocio (ROCV)	106
4.1.1.9	Vírus Dengue 1 (DENV-1)	106
4.1.1.10	Vírus Dengue 2 (DENV-2)	106
4.1.1.11	Vírus Dengue 3 (DENV-3) (ChimericVax Dengue 3 virus)	106
4.1.1.12	Vírus Dengue 4 (DENV-4)	106
4.2	<b>ELISA DE BLOQUEIO ESPECÍFICO PARA FLAVIVÍRUS</b>	107
<b>4.2.1</b>	<b>Amostras de soro de equídeos</b>	107
<b>4.2.2</b>	<b>Amostras de soro de ovinos e de crocodilianos</b>	114
4.3	<b>PRNT</b>	116
<b>4.3.1</b>	<b>Amostras de soro de equídeos</b>	116
<b>4.3.2</b>	<b>Amostras de soro de ovinos</b>	147
<b>4.3.3</b>	<b>Amostras de soro de crocodilianos</b>	147
4.4	<b>CAPTURAS DE CULICÍDEOS E COLETAS DE IXODÍDEOS</b>	148
<b>4.4.1</b>	<b>Culicídeos</b>	148
<b>4.4.2</b>	<b>Ixodídeos</b>	152
4.5	<b>ISOLAMENTO VIRAL E TESTE DE PLACAS</b>	156
<b>4.5.1</b>	<b>Amostras de crocodilianos</b>	156

4.5.2	<b>Amostras de culicídeos e ixodídeos</b>	156
4.6	RT-PCR CONVENCIONAL PARA FLAVIVÍRUS E ALFAVÍRUS	161
4.7	PCR EM TEMPO REAL PARA FLAVIVÍRUS	161
4.8	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	163
5	<b>DISCUSSÃO</b>	167
	• <i>Detecção de anticorpos para flavivírus</i>	167
	• <i>Anticorpos neutralizantes para WNV</i>	171
	• <i>Anticorpos neutralizantes para flavivírus indeterminado</i>	173
	• <i>Critério de soropositividade utilizado</i>	173
	• <i>Anticorpos neutralizantes para ILHV</i>	175
	• <i>Anticorpos neutralizantes para SLEV</i>	176
	• <i>Anticorpos neutralizantes para CPCV</i>	177
	• <i>Anticorpos neutralizantes para ROCV</i>	178
	• <i>Ausência de soropositividade para DENVs, YFV, IGUV e BSQV</i>	179
	• <i>Amostras de ovinos</i>	179
	• <i>Amostras de jacaré-do-Pantanal</i>	182
	• <i>Espécies de culicídeos e ixodídeos</i>	185
	• <i>Importância do Pantanal para a vigilância das arboviroses no Brasil</i>	189
6	<b>CONCLUSÕES</b>	191
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	192

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OS ARBOVÍRUS

O termo arbovírus, originário da expressão inglesa *arthropod-borne virus*, designa um grupo ecológico de vírus que se mantem na natureza devido principalmente à transmissão biológica de um vertebrado infectado a outro susceptível através de artrópodes hematófagos, bem como à transmissão transvoariana e venérea entre estes invertebrados. A principal propriedade que define os arbovírus, a transmissão biológica, é caracterizada pela infecção viral de artrópodes vetores durante hematofagia em hospedeiros vertebrados virêmicos, seguida de replicação viral nos tecidos destes artrópodes, e à transmissão viral destes artrópodes a hospedeiros vertebrados susceptíveis durante novo repasto sanguíneo (WHO 1985).

Entretanto, apesar de menor relevância biológica, a ocorrência de transmissão mecânica, isto é, a transmissão vetorial entre hospedeiros vertebrados sem a replicação viral nos artrópodes hematófagos também já foi experimentalmente demonstrada em arbovírus (Hoch et al. 1985).

Os arbovírus são descritos como um grupo de vírus que salvo em condições especiais não é transmitido entre hospedeiros vertebrados sem o intermédio de artrópodes vetores (Casals & Reeves 1959).

Em um ciclo de transmissão, os arbovírus precisam encontrar condições para se replicar alternadamente em diferentes sítios em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados de modo a permitir sua transmissão entre estes hospedeiros através da hematofagia do vetor. Quando artrópodes vetores se infectam através da hematofagia em hospedeiros vertebrados virêmicos, os arbovírus invadem as células do epitélio do intestino médio onde iniciam a replicação viral. Novas partículas virais são disseminadas pela hemocele através da hemolinfa e atingem as glândulas salivares onde ocorre nova replicação viral. Através dos dutos salivares novas partículas virais são eliminadas com a saliva, que ao ser secretada no próximo repasto sanguíneo, dão continuidade ao ciclo de transmissão (Clements 2012).

Apesar disso, a transmissão direta entre vertebrados sem a participação de artrópodes, embora menos comum, vem sendo descrita em diferentes grupos de arbovírus (Kuno 2001). As formas mais comuns de transmissão direta são intranasal, oral, venérea e exposição de pele lesionada, córnea e mucosas, e as fontes de infecção incluem alimentos, aerossóis, secreções, urina, fezes, saliva, leite, pelos, penas e pele (Kuno & Chang 2005). Embora raramente documentada, a transmissão não vetorial de arbovírus vem sendo reportada em população humana e também em condições naturais e experimentais em populações animais (Chen & Wilson 2004; Austin et al. 2004; Nemeth et al 2006; Huyvaert et al. 2008; Foy et al. 2011).

Em ciclos arbovirais, artrópodes hematófagos susceptíveis participam como hospedeiro definitivo permanecendo infectado durante toda a sua vida e por isso são considerados vetores e reservatórios de arbovírus (Causey 1958).

Os arbovírus são essencialmente vírus zoonóticos que circulam na natureza em ciclos de manutenção envolvendo artrópodes hematófagos e animais silvestres, principalmente aves, roedores e primatas não humanos, que participam como hospedeiros vertebrados amplificadores, isto é, quando infectados apresentam viremia por tempo e com carga viral suficiente para infecção dos artrópodes vetores (Weaver & Barret 2004).

Salvo algumas exceções, animais domésticos e o homem não participam como hospedeiros amplificadores em ciclos de transmissão de arbovírus. Em alguns deles são considerados hospedeiros vertebrados terminais, isto é, são susceptíveis à infecção, mas quando se infectam não desenvolvem viremia por tempo ou com carga viral suficiente para participar do ciclo como fonte de infecção para os artrópodes vetores. Os hospedeiros terminais não mantêm o ciclo de transmissão na natureza e participam como hospedeiros em um ciclo abortivo de transmissão (WHO 1985).

Em alguns ciclos de transmissão de arbovírus pode haver mais de uma espécie participando como hospedeiro vertebrado amplificador. Entretanto, normalmente algumas espécies apresentam uma maior eficiência como hospedeiro amplificador do que outras. Essas espécies mais eficientes são consideradas o

principal hospedeiro vertebrado no ciclo de transmissão e são conhecidas como hospedeiros amplificadores primários, isto é, são preferencialmente utilizadas pelos vetores enzoóticos para hematofagia. Outras espécies que apresentam menor eficiência como hospedeiros amplificadores são chamadas de hospedeiros amplificadores secundários (Clements 2012).

Entre as exceções em que o homem participa como hospedeiro amplificador está o vírus Chikungunya (*Chikungunya virus* ou CHIKV) e os genótipos endêmico-epidêmicos do vírus Dengue (*Dengue virus* ou DENV), em que seres humanos participam como hospedeiros amplificadores primários em ciclos urbanos de transmissão (Vasilakis et al. 2008; Thiboutot et al. 2010). Entre os animais domésticos, estão o ciclo de transmissão rural do vírus da língua azul (*Bluetongue virus* ou BTV) em que bovinos participam como hospedeiros amplificadores primários e o ciclo de transmissão do vírus da encefalite equina venezuelana (*Venezuelan equine encephalitis virus* ou VEEV) em que equinos participam como hospedeiros amplificadores secundários (Barratt-Boyes & MacLachlan 1994; Weaver & Barret 2004).

Apesar de não participar como hospedeiro amplificador em ciclos naturais de transmissão da maioria dos arbovírus, o homem através de seus padrões sociais e comportamento modifica as condições naturais influenciando diretamente na ocorrência e propagação das arboviroses (WHO 1985). A emergência e reemergência das arboviroses estão relacionadas a vários processos como a expansão geográfica da circulação viral, muitas vezes mediada por mobilidade humana, e a amplificação viral em áreas de presença humana através de ciclos envolvendo animais antrópicos ou domésticos. Com o aumento do deslocamento humano e comércio global, assim como a crescente urbanização de áreas silvestres e o aumento populacional os dois processos se mantêm em expansão (Weaver & Reisen 2010).

À exceção do vírus da peste suína africana (*African swine fever virus* ou ASFV), a ausência de arbovírus compostos por ácido desoxirribonucleico (DNA) sugere que as altas taxas de mutação e conseqüente plasticidade genética dos vírus compostos por ácido ribonucleico (RNA) permitiram a este grupo a propagação em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Weaver 2006).

Os arbovírus são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas. A classificação antigênica dos arbovírus foi baseada principalmente em resultados de testes sorológicos, como a inibição da hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e teste de neutralização (NT) reunidos por Casals (1963). Os três primeiros grupos caracterizados foram designados pelas letras A, B e C, e os demais nomeados de acordo com a classificação taxonômica dos primeiros vírus isolados no respectivo grupo (Calisher & Karabatsos 1988).

Atualmente, de acordo com o 9º Relatório do Comitê Internacional para Nomenclatura Viral, os arbovírus estão taxonômicamente classificados em diversas famílias como *Asfarviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae* (King et al. 2012).

De aproximadamente 535 espécies que estão registradas no Catálogo Internacional de Arbovírus e outros Vírus de Vertebrados que reuniu todos os arbovírus e outros vírus de vertebrados conhecidos em meados da década de 1980, aproximadamente 100 possíveis arbovírus foram isolados a partir de amostras de animais selvagens, 40 de amostras humanas, 30 em animais sentinelas e 20 de animais domésticos. Entre os hospedeiros invertebrados, aproximadamente 185 foram isolados em amostras de mosquitos, 85 de carrapatos e 45 em outros artrópodes vetores (Karabatsos 1985).

Apesar de a cerca de 100 arbovírus serem conhecidos por infectar humanos e 40 animais domésticos, muitas destas arboviroses caracterizadas por síndromes sistêmicas inespecíficas ou pela baixa incidência, frequentemente permanecem sem identificação mesmo em países com maior apoio laboratorial para os diagnósticos, o que causa uma subnotificação dos casos (Brés 1988).

Com relação às regiões geográficas aonde os arbovírus vêm sendo isolados, dos aproximadamente 510 arbovírus catalogados na década de 1980, 125 foram isolados no continente africano, 115 na América do Sul, 100 na Ásia, 60 na América do Norte, 50 na Oceania, 40 na América Central e Caribe e 20 na Europa (Karabatsos 1985). Desde então arbovírus ainda desconhecidos vêm sendo

descritos em todo o mundo. Apenas na Amazônia brasileira foram isolados até 1998 mais de 180 arbovírus e outros vírus de vertebrados (Vasconcelos et al. 2001).

A maioria das infecções por arbovírus desenvolve um quadro assintomático e que quando clínico, evoluem para um quadro com sinais clínicos e sintomas inespecíficos como febre, cefaleia e fadiga. Entretanto, algumas espécies de arbovírus podem acometer o sistema nervoso central levando a desordens neurológicas em populações humana e animal (Weaver & Barret 2004).

## **1.1.1 Importância para a saúde pública**

### **1.1.1.1 No mundo**

Atualmente, as arboviroses são um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Apenas na última década, grandes epidemias por arbovírus emergentes e reemergentes sem precedentes e algumas delas apresentando um perfil epidemiológico não usual, foram reportadas na Ásia, Europa, África e Américas (Kuno & Chang 2005).

Na Ásia em 2006, uma epidemia de encefalite causada pelo vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus* ou JEV) abrangendo 37 cidades e uma taxa de fatalidade de aproximadamente 30% foi reportada na China (Wang et al. 2007). No mesmo ano, uma grande epidemia causada pelo CHIKV ocorreu na Índia. Aproximadamente 1,25 milhões de casos suspeitos de oito diferentes províncias foram reportados no país (WHO 2006).

Durante o verão europeu em 2007, CHIKV também foi considerado causa primária de uma epidemia envolvendo mais de 330 casos clínicos suspeitos no norte da Itália (Angelini et al. 2008). Três anos depois, em 2010, na segunda maior epidemia causada pelo vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus* ou WNV) na Europa e pela primeira vez na Grécia, 262 casos clínicos foram reportados com 197 (75%) casos de 11 distritos diferentes com acometimento neurológico (Danis et al. 2011).

Em 2007 na África, uma epidemia pelo vírus da febre Rift Valley (*Rift Valley fever virus* ou RVFV) com mais de 740 casos confirmados, com 230 fatais, foi



reportada no Sudão. Estima-se que aproximadamente 75.000 foram infectados. Ao contrário do usualmente observado em epidemias por RVFV, epizootias na região foram observadas após os casos humanos (Hassan et al. 2011). Em 2010, na maior epidemia pelo vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* ou YFV) já registrada em Uganda, foram reportados aproximadamente 180 casos clínicos suspeitos, com 45 casos fatais (Wamala et al. 2012).

Em 2003, durante epidemia por WNV na América do Norte foram reportados nos Estados Unidos da América (EUA) mais de 9.850 casos clínicos, com 262 casos fatais. Casos clínicos foram reportados em 46 estados da federação (CDC 2012). Na América do Sul, uma grande epidemia de encefalite causada pelo vírus da encefalite de Saint Louis (*Saint Louis encephalitis virus* ou SLEV) foi reportada pela primeira vez na Argentina em 2005. Dos 47 casos de doença neuroinvasiva reportados na província de Córdoba, nove evoluíram para óbito (Spinsanti et al. 2008).

#### 1.1.1.2 No Brasil

O Brasil com dimensões continentais e fisiogeografia composta por diferentes biomas apresenta condições ideais para a circulação de arbovírus em uma grande variedade de ciclos zoonóticos. Além disso, a existência de cidades grandes, populosas e com elevados índices de infestação por espécies de artrópodes vetores antropofílicas como *Culex* spp. e *Aedes aegypti* são importantes fatores que elevam o risco para a ocorrência de arboviroses no país (Figueiredo 2007).

Em 2007, evidências de infecção recente pelo vírus Oropouche (*Oropouche virus* ou OROV) foram detectadas durante uma epidemia envolvendo aproximadamente 630 casos de síndrome febril aguda na Região Norte do Brasil (Mourão et al. 2009). No mesmo ano, uma epidemia de febre amarela silvestre foi reportada no país. Dos 30 casos confirmados, 15 evoluíram para o óbito (WHO 2008). Em fevereiro de 2008, uma epidemia pelo vírus Mayaro (*Mayaro virus* ou MAYV) com 33 casos clínicos confirmados foi identificada em um assentamento próximo a Belém, no Pará (Azevedo et al. 2009). Apenas entre 2008 e 2010 foram reportados no país mais de dois milhões de casos de infecção por DENV distribuídos em todas as unidades federativas do país (Brasil 2012).

## 1.1.2 Importância para a sanidade animal

Além da importância médica, as arboviroses também constituem agravos de importância veterinária. Epizootias por arbovírus envolvendo animais domésticos e selvagens também vêm sendo reportadas por todo o mundo (Daniels 2001).

### 1.1.2.1 No mundo

Em 1995, uma epizootia por VEEV em equinos foi reportada no estado de La Guajira na Colômbia. Estima-se que 4.000 equinos infectados possam ter evoluído para o óbito durante a epizootia (Rivas et al. 1997). Em 2005, uma epizootia causada pelo vírus da encefalite equina do leste (*Eastern equine encephalitis virus* ou EEEV) em cervídeos silvestres da espécie *Odocoileus virginianus*, popularmente conhecida como veado-de-cauda-branca, foi reportada no estado de Michigan, EUA (Schmitt et al 2007).

Na África do Sul em 1996, durante uma epizootia causada pelo vírus da doença do equino africano (*African horse sickness virus* ou AHSV), estima-se que 500 cavalos infectados evoluíram para o óbito (Meiswinkel 1998). Em 2010, após um atípico período de chuvas no deserto da Mauritânia, uma epidemia envolvendo aproximadamente 60 casos de febre hemorrágica humana e uma epizootia em camelos e pequenos ruminantes causada pelo RVFV foi reportada. Durante a epizootia, indícios de infecção recente por RVFV foram detectados em mais de 90 camelos e 100 pequenos ruminantes (El Mamy et al. 2011).

Na Europa, em 2006 e 2007, uma grande epizootia sem precedentes causada pelo BTV foi descrita em parte da Holanda, Bélgica, Alemanha, Luxemburgo e França. Estima-se que mais de 200.000 animais entre bovinos e ovinos tenham sido infectados, com aproximadamente 600 casos confirmados (Mehlhorn et al. 2008). Em 2010 na região de Andaluzia no sul da Espanha, uma epizootia envolvendo aproximadamente 100 equinos de mais de 30 rebanhos diferentes que apresentavam ataxia, desorientação ou fraqueza seguido de febre, tremores musculares, déficit de nervos craniais ou fotofobia foi atribuído à infecção por WNV. Esta foi a primeira descrição de infecção clínica por WNV em equinos na Espanha e

ocorreu no ano em que se registrou na região o mais alto índice pluviométrico e as mais altas temperaturas da primavera e verão dos últimos dez anos (García-Bocanegra et al. 2011).

Em estudo sobre a circulação de JEV em equinos conduzido na Índia entre 2006 e 2010, dos aproximadamente 600 animais avaliados, 67 aparentemente saudáveis apresentavam anticorpos anti-JEV, sugerindo circulação viral na região. Durante o estudo, dois animais jovens com menos de um ano de idade desenvolveram um quadro de desordem neurológica com evolução para o óbito sugerindo circulação recente de JEV na região. Em análise post-mortem deste material a presença de JEV foi detectada molecularmente e por isolamento viral em amostras dos dois animais (Gulati et al. 2012). Em 2004, durante uma grande epizootia causada pelo vírus da febre efêmera bovina (*Bovine ephemeral fever virus* ou BEFV) em uma região próxima ao delta do Rio Nilo em Israel, foi reportada morbidade em todos os mais de 190 rebanhos bovinos avaliados (Yeruham et al. 2010). Durante o verão e outono de 2010, a primeira grande epizootia de encefalomielite bovina causada pelo vírus Akabane (*Akabane virus* ou AKAV) foi registrada na Coréia do Sul. Em mais de 200 amostras avaliadas, aproximadamente 90% apresentavam anticorpos neutralizantes anti-AKAV e em 15 amostras de tecido nervoso foi possível o isolamento viral (Oem et al 2012).

#### 1.1.2.2 No Brasil

No Brasil também vêm sendo descritas nos últimos anos epizootias por arbovírus. A ocorrência de arboviroses em animais no país, alerta não só para a presença de condições favoráveis à circulação de arbovírus em áreas rurais, mas também para eventual impacto econômico no agronegócio brasileiro. Nos últimos anos, o Brasil têm se destacado como o novo polo de exportações de um leque amplo de *commodities* agrícolas. Em 2007, o Brasil foi o líder mundial nas exportações de carne bovina e aves e o quarto maior exportador de suínos. (Wilkinson 2010). Atualmente, o Brasil tem o maior rebanho equino da América Latina e o terceiro maior do mundo. Entre equinos, muares e asininos são oito milhões de cabeças, com aproximadamente cinco milhões utilizados, principalmente,

para o manejo do gado bovino. A caprinocultura e a ovinocultura também vêm se destacando no agronegócio brasileiro. A criação de caprinos, com rebanho estimado em 14 milhões de animais, distribuído em 436 mil estabelecimentos agropecuários, colocou o Brasil em 18º lugar do ranking mundial de exportações (Brasil 2012b).

Das quatro epizootias por BTV já reportadas na América do Sul, todas foram descritas no Brasil e no estado do Paraná em 2001 e 2002 envolvendo ovinos e caprinos. A primeira epizootia ocorrida em março de 2001 confirmou, através de isolamento viral, a primeira manifestação clínica por BTV na América do Sul. Desde então a detecção de anticorpos anti-BTV vem sendo reportada em diferentes regiões do país (Clavijo et al. 2002; Lager 2004; Tomich et al. 2009; Scolari 2011).

Em 2008 e 2009, foram reportadas duas epizootias de doença neurológica causada pelo EEEV em equinos de três estados do nordeste brasileiro. Uma epizootia em 2008 envolvendo 100 animais no estado de Pernambuco (PE) apresentou um índice de morbidade de 61% e de fatalidade acima de 98%. Em outra epizootia reportada nos estados do Ceará e da Paraíba (PB) em 2009, de 960 equídeos de 82 fazendas diferentes avaliados, 168 (17,5%) apresentaram morbidade e destes 107 (64%) evoluíram para o óbito. Em 2009, a PB registrou um os maiores índices pluviométricos dos últimos 15 anos (Silva et al. 2011). Também em 2008 e 2009, a maior epizootia de febre amarela já descrita em primatas não humanos silvestres foi reportada no estado do Rio Grande do Sul (RS). A circulação de YFV em *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*, popularmente conhecidos como bugio-preto e bugio-marrom, foi detectada em 67 municípios onde 21 casos de infecção humana também foram reportados. De outubro de 2008 a junho de 2009, a morte de aproximadamente 2.000 animais identificados às duas espécies, foi reportada. De 297 animais mortos testados, YFV foi detectado em 204 (69%) (de Almeida et al. 2012).

### **1.1.3 A circulação de arbovírus no Brasil**

Evidências da circulação de arbovírus são reportadas há muitos anos na América do Sul, com a maioria dos relatos, à exceção da Argentina, descritos no

norte do continente (Jonkers et al. 1964; Sabattini et al. 1965; Rossi 1967; Prías-Landínez et al. 1968; Panon et al. 1979).

Assim como para o restante da América do Sul, no Brasil a grande maioria dos relatos de circulação e isolamento de arbovírus se concentrava na Região Norte do país, principalmente na Bacia Amazônica. Entre 1954 e 1959 foi realizado no estado do Pará (PA), um dos mais relevantes trabalhos para a arbovirologia brasileira. Na avaliação de espécimes biológicos de humanos, primatas não humanos, camundongos sentinelas e culicídeos foram isolados arbovírus em 4,8% das amostras humanas, 62,6% dos primatas, 13,5% dos grupos de camundongos e em 1,8% dos grupos de culicídeos avaliados. Neste estudo foram descritos pela primeira vez no Brasil oito bunivirídeos, além do vírus Bussuquara (*Bussuquara virus* ou BSQV), este isolado de um primata não humano sentinela em 1956 (Causey et al. 1961).

Ainda no PA, em um extenso inquérito sorológico realizado com aproximadamente 530 trabalhadores residentes na cidade de Belém, no início da década de 1960, foram detectados, através de IH, anticorpos para seis bunivirídeos e seis togavirídeos (Bensabath & Andrade 1962).

Na Amazônia brasileira foram isolados até 1998 mais de 180 arbovírus e outros vírus de vertebrados, entre eles EEEV, VEEV, SLEV e o vírus da encefalite equina do oeste (*Western equine encephalitis virus* ou WEEV) arbovírus reconhecidamente encefalitogênicos. Entretanto, à exceção do EEEV, isolado a partir de equinos doentes e mosquitos durante epizootia de encefalite equina no PA na década de 1960, WEEV, VEEV e o SLEV embora detectados na região, nunca foram relacionados a quadros de encefalite ou epidemias na Amazônia brasileira. Em contrapartida, aos arbovírus YFV, OROV, MAYV e DENV isolados na região são atribuídas grandes epidemias locais (Causey et al 1962; Vasconcelos et al. 1991; 2001).

Embora a grande maioria de espécies de arbovírus isolados no Brasil tenha sido proveniente de estudos na região amazônica, a circulação de arbovírus em populações humana e animal também vem sendo comumente relatada em todas as outras regiões do país. Além da Região Norte, evidências de circulação viral e até

mesmo registros de epidemias e epizootias no país vêm sendo descritos no nordeste (Souza et al. 1995; Straatmann et al. 1997; Montenegro et al. 2006; Silva et al. 2011), Centro-Oeste (Iversson et al. 1993; Feres et al. 2006; Tomich et al. 2009), Sul (Fernandéz et al. 2000; Barcellos et al. 2005; de Almeida et al. 2012) e principalmente na Região Sudeste, que com as sucessivas introduções dos quatro sorotipos DENV no estado do Rio de Janeiro (RJ), que apresenta condições socioeconômicas e ambientais favoráveis ao estabelecimento e disseminação do ciclo de transmissão na região, passou a concentrar o maior número de casos reportados de infecção por arbovírus no país (Schatzmayr et al. 1986; Nogueira et al. 1990, 2005; Nogueira & Eppinghaus 2011; Brasil 2012).

De 1990 a 2011 foram descritos em todo o país 6.642.936 casos de dengue, dos quais 2.742.122 (41,2%) foram reportados na Região Sudeste, 2.346.682 (35,3%) na Região Nordeste, 797.038 (11,9%) na Região Centro-Oeste, 610.856 (9,2%) na Região Norte, e 146.238 (2,2%) na Região Sul (Brasil 2012). Além da atual hiperendemicidade de dengue no sudeste, casos recentes de transmissão autóctone de outros flavivírus como SLEV e YFV também vêm sendo descritos na região (Rocco et al. 2003, 2005; Mondini et al. 2007; Moreno et al. 2011).

## 1.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES

O diagnóstico laboratorial clássico das arboviroses tem sido realizado com base em dois parâmetros, o isolamento com identificação viral e a sorologia. O isolamento viral se fundamenta na capacidade de vírus citopatogênicos inoculados em um sistema hospedeiro susceptível, modificar através da sua biossíntese viral a fisiologia desse sistema, produzindo alterações morfológicas da monocamada celular chamada de Efeito Citopático (ECP) (Santos 2002). Em ausência de isolamento viral, o diagnóstico das arboviroses é realizado por provas sorológicas. Entretanto, em virtude da complexidade antigênica dos arbovírus, a intensidade das reações cruzadas observada entre espécies diferentes de um mesmo grupo, e ainda as particularidades das respostas imunológicas aos arbovírus torna difícil em muitos casos, discernir e interpretar os resultados (Góes & Bruno-Lobo 1961).

Uma grande variedade de testes sorológicos tem sido utilizada para avaliar a presença de anticorpos anti-flavivírus. Estes testes incluem a IH, FC, imunofluorescência, (IF), ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) e NT através do teste de neutralização por redução de placas (PRNT). Cada um destes testes avaliam diferentes atividades dos anticorpos (WHO 2007b).

Os anticorpos detectados por IH e NT são de aparecimento mais precoce e persistem por mais tempo do que os anticorpos detectados por FC. Anticorpos neutralizantes podem ser detectados por longos períodos assim como os anticorpos inibidores da hemaglutinação (Góes & Bruno-Lobo 1961).

Com relação à especificidade, os anticorpos detectados por IH são os menos específicos, principalmente entre os flavivírus e também alfavírus, ocorrendo amplas reações de grupo. Os anticorpos detectados por FC também apresentam reação cruzada, mas são mais específicos que IH. Os anticorpos detectados por NT são os que apresentam maior especificidade (Casals 1957).

Apenas o PRNT avalia a capacidade de neutralização do vírus *in vitro* e é o teste sorológico mais específico para flavivírus, inclusive com especificidade para os diferentes sorotipos do vírus dengue (*Dengue virus* ou DENV). Novos testes avaliando a neutralização viral têm sido desenvolvidos, mas o PRNT permanece como o teste laboratorial padrão para a pesquisa de flavivírus (WHO 2007b).

Entretanto, PRNT são testes laboriosos e por isso não são os mais indicados para estudos em larga escala. Em contrapartida, os testes ELISA permitem um diagnóstico mais rápido e, conseqüentemente, uma vigilância mais rápida para o monitoramento da circulação de arbovírus (Blitvich et al. 2003).

O ELISA é um método imunológico de quantificação da concentração de anticorpos que fornece boa sensibilidade e especificidade. No ELISA, quando uma molécula indicadora está acoplada covalentemente a uma enzima, ela pode ser quantificada determinando-se, com um espectrofotômetro, a taxa com que a enzima transforma um substrato límpido em um produto colorido (Abbas & Lichtman 2005).

Entretanto, por precisar de anticorpos secundários para a espécie que está sendo investigada, o ELISA não é viável quando a investigação envolve espécimes

de um grande número de espécies. Uma alternativa é o ELISA de bloqueio de epitopos que não necessita o uso de múltiplos anticorpos secundários (Blitvich et al. 2003).

Outra e mais recente abordagem no diagnóstico das arboviroses é a detecção de antígenos ou ácidos nucleicos virais. O diagnóstico viral através de técnicas de detecção de ácido nucleico pode ser aplicado na pesquisa de virtualmente qualquer vírus (Knipe et al. 2001).

Dependendo da sequência alvo, estas técnicas podem ser utilizadas para identificação de uma única espécie, assim como para um grupo antigenicamente relacionado. Entre as técnicas moleculares mais comumente utilizadas para o diagnóstico de arbovírus, que em sua grande maioria apresentam genoma composto por ácido ribonucleico, está a transcrição reversa em reação em cadeia da polimerase (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ou RT-PCR), onde os transcritos de um gene em particular são detectados usando-se primeiramente uma transcriptase reversa para produzir uma cópia de DNA complementar ao RNA mensageiro antes da amplificação por PCR. Outras técnicas moleculares também vêm sendo utilizadas, como o RT-PCR em tempo real, que tem demonstrado grande sensibilidade à detecção de ácido nucleico viral em espécimes biológicos de vertebrados e invertebrados, e o sequenciamento nucleotídico que, através do sequenciamento do produto amplificado, permite análise filogenética do vírus sequenciado (Lanciotti et al. 2000; Hadfield et al. 2001; Kauffman et al. 2003; Knipe et al. 2001; Britto et al. 2005; Abbas & Lichtman 2005).

### 1.3 OS ARBOVÍRUS PESQUISADOS NO PRESENTE ESTUDO

#### 1.3.1 **Flaviviridae**

De acordo com os inquéritos sorológicos, isolamentos virais e análises moleculares realizadas ao longo dos anos no estudo das arboviroses no Brasil, os arbovírus de maior relevância médica e veterinária no país estão taxonomicamente distribuídos entre as famílias virais *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae* (Travassos da Rosa et al. 1997).



Entre elas, os arbovírus classificados à família *Flaviviridae* são responsáveis pelo maior número de casos reportados de arboviroses no Brasil. Na família *Flaviviridae*, arbovírus classificados ao gênero *Flavivirus* têm sido envolvidos em quadros graves de encefalite, febres hemorrágicas e doença febril no país (Vasconcelos et al. 1998).

A família *Flaviviridae*, composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus* é representada por partículas esféricas envelopadas de 40 a 60 nm de diâmetro, com genoma RNA fita simples de polaridade positiva (Ackermann & Bertheaume 1995). O gênero *Flavivirus* é o principal representante da família *Flaviviridae*, com aproximadamente 70 espécies de vírus, dos quais muitos são patogênicos ao homem (Price 1957; Calisher & Karabatsos 1988). O genoma é composto por aproximadamente 11.000 bases e codifica dez proteínas. Três proteínas estruturais, proteína de capsídeo (C), que forma o nucleocapsídeo e as proteínas de superfície pré-membrana (prM) e de envelope (E), e sete proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, cada uma com uma função viral específica (WHO 2007b) (Figura 1.1).

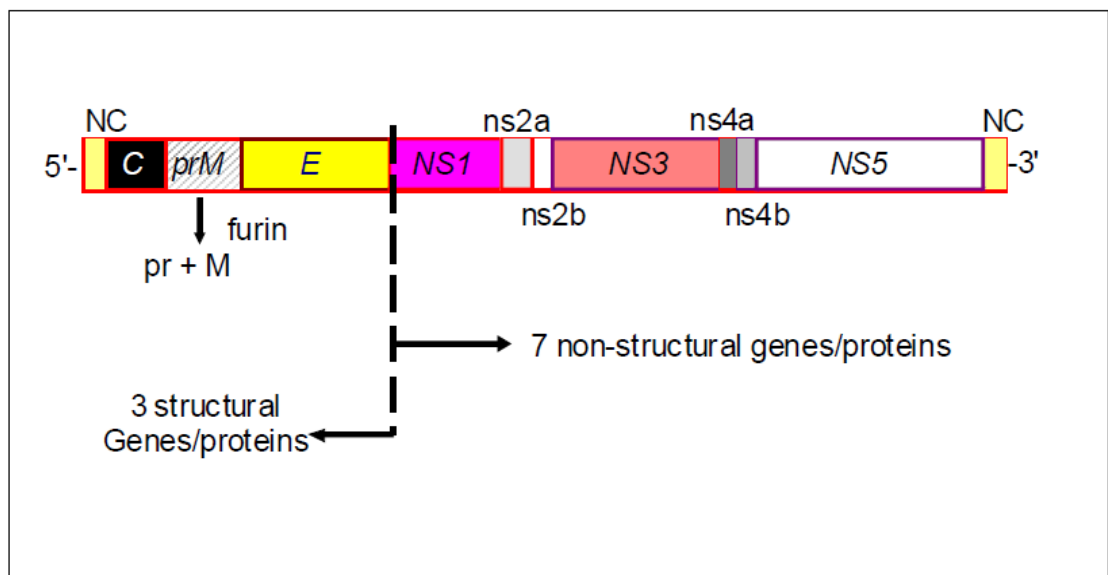


Figura 1.1 – Organização do genoma dos flavivírus (WHO 2007b).

Até o momento, treze flavivírus foram sequencialmente isolados no Brasil: YFV, vírus Ilhéus (*Ilheus virus* ou ILHV), BSQV, SLEV, vírus Rocio (*Rocio virus* ou ROCV), vírus Cacipacoré (*Cacipacore virus* ou CPCV), DENV-1 e DENV-4, DENV-2, vírus Iguape (*Iguape virus* ou IGUV), um vírus relacionado ao vírus Naranjal (*Naranjal virus* ou NJLV), DENV-3, e *Culex flavivirus* (*Culex flavivirus* ou CXFV) (Davis & Burke 1929; Laemmert & Hughes 1947; Gomes & Causey 1959, Causey et al. 1964; Lopes et al. 1978; Karabatsos 1985; Osanai et al 1983; Nogueira et al. 1990, Coimbra et al. 1993, Rodrigues et al. 2004; Nogueira et al. 2005; Machado et al. 2012).

Entre eles, os flavivírus que já foram associados à infecção humana através de isolamento viral ou evidências sorológicas são YFV, BSQV, IGUV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, SLEV, ROCV, ILHV e CPCV (Laemmert & Causey 1962; Srihongse & Johnson 1971; Tiriba et al. 1976; Pinheiro et al. 1981; Coimbra et al. 1993; Nassar et al. 1997; Casali et al. 2004; Batista et al. 2009). Acredita-se que, à exceção dos quatro sorotipos DENV, estes flavivírus são mantidos em ciclos zoonóticos silvestres e ocasionalmente podem infectar o homem e animais domésticos quando estes participam como hospedeiros acidentais em áreas de transmissão enzoótica (Figueiredo 2000).

Considerando que ainda não existem relatos de infecção humana por NJLV e que CXFV é um flavivírus específico de insetos (Karabatsos 1985, Hoshino et al. 2007), no presente estudo estes dois flavivírus foram pesquisados apenas por métodos moleculares. Os seguintes 12 flavivírus, incluindo WNV e todos os 11 flavivírus que circulam no Brasil previamente associados à infecção humana, clínica ou não, foram pesquisados por técnicas moleculares e sorológicas:

#### 1.3.1.1 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)

O SLEV foi isolado pela primeira vez a partir da suspensão de tecido cerebral de um caso fatal de encefalite aguda ocorrido durante a epidemia de encefalite de 1933 em Saint Louis no Missouri, EUA (Webster & Fite 1933; Muckenfuss et al. 1933).

O vírus está antigenicamente relacionado ao WNV e JEV e por isso associado ao grupo do vírus da encefalite japonesa (Lennette & Koprowski 1946). À infecção por SLEV são atribuídas zoonoses acometendo principalmente aves no Novo Mundo. Ocasionalmente, a infecção sintomática por SLEV é reportada em seres humanos em quadros clínicos que envolvem febre aguda e encefalite (Monath & Heinz 1996).

Casos de infecção clínica humana são reportados por todo o continente americano incluindo México, Canadá, EUA, Cuba, Argentina, Brasil e Equador (Cortés et al. 1975; Spence et al. 1977; Kaplan et al. 1978; Pelegrino et al. 1996; Spinsanti et al. 2003; Mondini et al. 2007).

Entretanto o maior número de casos vem sendo registrado na América do Norte e principalmente nos EUA, onde se reportam epidemias por SLEV em todas as regiões geográficas do país (Altman & Goldfield 1968; Powell & Blakey 1977; Zweighaft et al. 1979; Tsai et al. 1987, 1988; Reisen et al., 1992; Marfin et al. 1993; McCaig et al. 1994; Jones et al. 2002). Entre 1964 e 2010 foram reportados nos EUA aproximadamente 4700 casos de doença neuroinvasiva causada por SLEV (CDC 2011).

Na América do Sul, casos de infecção humana por SLEV também vêm sendo descritos principalmente na Argentina. Em 2005 uma epidemia envolvendo 47 casos clínicos confirmados foi reportada na província argentina de Córdoba. Em 2010, em outra epidemia por SLEV na Argentina, desta vez em área metropolitana de Buenos Aires, mais da metade dos casos apresentaram acometimento neurológico (Mettler & Casals 1971; Spinsanti et al. 2003, 2008; Seijo et al. 2011).

No Brasil diversos trabalhos também têm demonstrado a circulação de SLEV em população humana. No início da década de 1950, um estudo realizado em indivíduos febris de uma comunidade ribeirinha na região amazônica identificou soropositividade para SLEV em 5,5% das amostras analisadas (Causey et al. 1964). Em 1978, também na Região Norte do Brasil, SLEV foi isolado de uma amostra de sangue de um paciente sintomático na cidade de Belém (Pinheiro et al. 1981).

A circulação de SLEV também tem sido detectada em outras regiões do país. Em um trabalho realizado no interior do estado de São Paulo (SP), 5% dos

espécimes biológicos coletados de indivíduos sem sinais clínicos apresentaram anticorpos inibidores de hemaglutinação e neutralizantes para SLEV (Lopes et al. 1979). Na década de 1970, um inquérito sorológico realizado com crianças em idade escolar no RJ detectou a presença de imunoglobulinas anti-SLEV em 3% do grupo avaliado (Pinheiro et al. 1975). Em meados da década de 1980, em sorologia realizada em habitantes da Região Nordeste, a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação por SLEV foi detectada em indivíduos assintomáticos (Tavares-Neto et al. 1986). Em outro inquérito sorológico realizado na década de 1990 com moradores de uma reserva ecológica na região do Vale do Ribeira em SP, anticorpos neutralizantes para SLEV foram identificados em 7,1% das amostras coletadas (Romano-Lieber & Iversson 2000).

Em 2004, SLEV foi isolado a partir de um caso de infecção humana sintomática pela primeira vez em SP (Rocco et al. 2005). Em 2006, durante uma epidemia pelo DENV sorotipo 3 (DENV-3) na cidade de São José do Rio Preto em SP, SLEV foi detectado em seis pacientes negativos e um positivo para DENV-3, sugerindo além da circulação local de SLEV também um caso de co-infecção com DENV-3 (Mondini et al. 2007, 2007b).

Entre os animais silvestres, as aves são consideradas o mais importante grupo de manutenção e amplificação do vírus na natureza (Tsai & Mitchell 1988). A circulação de SLEV em aves vem sendo descrita desde a década de 1950 principalmente na América do Norte e Caribe (Downs et al. 1957; Chamberlain et al. 1957; Gainer et al. 1964; Ventura 1965). O isolamento de SLEV a partir de amostras de sangue de aves já foi descrito em diferentes espécies principalmente nos EUA, como *Colaptes* spp., *Zenaida macroura*, *Ramphocelus carbo* e *Chiroxiphia caudata*, popular e respectivamente conhecidas como pica-paus, pombas, pipira vermelha e tangarás (Karabatsos 1985).

No Brasil, SLEV foi isolado no final da década de 1960 a partir de amostras de sangue de espécimes de aves identificadas a *Crypturellus noctivagus* e *Thraupis sayaca*, respectivamente conhecidas como jaó-do-sul e sanhaço, capturadas no interior de SP (Lopes et al. 1979). Na Amazônia, através de um estudo sorológico realizado em mais de 11 mil espécimes de aves, 54 espécies foram consideradas hospedeiras, inclusive com isolamento viral em 18 delas (Vasconcelos et al. 1991).

Em outro inquérito sorológico em aves, desta vez, realizado em área de Mata Atlântica no sul de SP, a presença de anticorpos monotípicos inibidores da hemaglutinação por SLEV foi detectada em espécimes identificados a 49 espécies de aves silvestres, com 25 residentes e oito migratórias estritas (Ferreira et al., 1994). Além das aves, a circulação de SLEV também vem sendo reportada em outras classes de vertebrados, que participam como hospedeiros terminais no ciclo de transmissão de SLEV, principalmente em mamíferos (Emmons & Lennette 1967; Sulkin et al. 1966; Buck et al. 1993).

Entre os animais domésticos, a circulação de SLEV tem sido identificada principalmente em equinos. Apesar da ausência até o momento, de relatos de sinais clínicos nestes animais, testes diagnósticos para SLEV em equinos são comumente realizados principalmente pela sua importância como diagnóstico diferencial para casos de infecção por WNV, que apresenta grande relevância veterinária. A proximidade filogenética entre SLEV e WNV e a consequente reação cruzada comumente observada entre estes dois vírus tornam complexo o diagnóstico sorológico destas infecções virais (Smithburn 1942; Komar et al. 2001). O primeiro surto de encefalite humana causado por WNV, nos EUA em 1999, foi inicialmente atribuído ao SLEV em virtude da detecção de IgM anti-SLEV em amostras de soro e de líquido (CDC 1999).

Em um inquérito soro-epidemiológico para arbovírus realizado com cavalos na Argentina entre 1977 e 1980, a presença de anticorpos neutralizantes para SLEV foi identificada em 58% dos animais (Monath et al. 1985). Em contrapartida, em outro inquérito sorológico realizado com equinos no mesmo país, a presença de imunoglobulinas neutralizantes de SLEV foi detectada em apenas 2% dos 282 animais avaliados (Mettler et al. 1985). Recentemente também na Argentina, anticorpos neutralizantes para SLEV também foram detectados em amostras de equinos da Província de Santa Fé, no nordeste do país (Tauro et al. 2012). Na Colômbia, a detecção em equinos do aumento de anticorpos neutralizantes para SLEV em um curto período de tempo sugere circulação viral em 2007 (Mattar et al. 2011).

No Brasil, em inquérito sorológico realizado no início da década de 1990 através de NT com 432 equinos no Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul (MS),

a presença de anticorpos anti-SLEV não foi detectada (Iversson et al. 1993). Todavia, em inquérito semelhante realizado em 2007 com 135 equinos da mesma região, anticorpos neutralizantes para SLEV foram detectados em aproximadamente 40% dos animais avaliados, incluindo animais de três anos de idade sugerindo circulação de SLEV na região entre 2004 e 2007 (Pauvolid-Corrêa et al. 2010b). Em outro estudo realizado com amostras de equinos do Norte do Brasil e parte de MS, anticorpos neutralizantes para SLEV também foram detectados na região (Rodrigues et al. 2010). Em recente estudo experimental de uma nova abordagem para o diagnóstico de infecção por flavivírus em equinos baseada em IgG ELISA utilizando-se como antígeno peptídeos recombinantes do domínio III da proteína de envelope de SLEV, WNV e ROCV, a sororeatividade para SLEV foi detectada em equinos de SP, RJ, MS, PB e estado de Minas Gerais (Silva 2010).

Quanto aos hospedeiros invertebrados, atribui-se a transmissão de SLEV a hospedeiros vertebrados susceptíveis principalmente culicídeos do gênero *Culex*, como *Culex nigripalpus*, *Culex pipiens*, *Culex tarsalis* e *Culex quinquefasciatus* (Belle et al. 1964; Bailey et al. 1978; Karabatsos 1985; Flores et al. 2010), assim como espécies dos gêneros *Aedes*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Trichoprosopon* e *Wyeomyia* (Aitken et al. 1964; Anderson et al. 1957; Galindo et al. 1959; Galindo et al. 1964; Figueiredo 2007).

Todavia, a presença de SLEV também já foi detectada em aracnídeos identificados às espécies *Dermacentor variabilis* (McLean et al. 1985), *Dermanyssus gallinae* (Smith et al. 1944) e *Lyponyssus sylviarum* (Hammon et al. 1948). Na região amazônica, SLEV foi detectado através de isolamento viral não só em culicídeos *Culex* (*Culex*) spp. e *Sabethes belisarioi*, como também em laelapídeo *Gigantolaelaps* sp., ectoparasitos em roedores (Karabatsos 1985; Turell et al. 2005).

#### 1.3.1.2 Vírus do oeste do Nilo (WNV)

Em 1937 durante uma investigação para febre amarela um vírus até então desconhecido foi isolado a partir do sangue de uma mulher com febre branda em Omogo no distrito de *West Nile*, na época uma província localizada a oeste do Rio Nilo Branco no nordeste de Uganda (Smithburn et al. 1940). Desde então, WNV

esteve sempre associado a pequenos e esporádicos surtos auto limitantes de uma síndrome febril sem complicações chamada de febre do oeste do Nilo (Couissinier-Paris 2006). Apesar disso, WNV apresentava uma grande distribuição geográfica com relatos de circulação viral em diferentes países na África (Taylor et al. 1956; Schmidt & Mansoury 1963), Europa (Filipe & Pinto 1969; Ernk et al. 1971) e Ásia (Bernkopf et al. 1953; Pavri & Singh 1965; Gaidamovich & Sokhey 1973).

No início da década de 1990, o perfil epidemiológico da febre do oeste do Nilo passou a mudar quando em 1994, WNV até então envolvido em pequenos surtos esporádicos de quadros febris brandos causou uma epidemia de doença neurológica com alta taxa de mortalidade principalmente em crianças na Argélia (Le Guenno et al. 1996). Dois anos depois, a maior epidemia de febre do oeste do Nilo ocorrida na Europa apresentou um grande número de casos com acometimento neurológico no Vale do Danúbio e Bucareste na Romênia. Dos 393 casos detectados, 352 (89,56%) desenvolveram infecção aguda do sistema nervoso central (Tsai et al. 1998). Concomitantemente, surtos de febre do oeste do Nilo em população humana e animal com quadros neurológicos passaram a ser reportados no velho mundo alertando para a mudança do impacto da febre do Nilo Ocidental para a saúde pública e animal (Tber Abdelhaq 1996, Platonov et al. 2001).

Em 1999, WNV definitivamente reemergiu como um importante problema de saúde pública e animal no mundo quando foi detectado no hemisfério oeste pela primeira vez causando surtos de encefalite humana e animal simultaneamente a relatos de uma grande mortalidade de aves no nordeste dos EUA (CDC 1999).

Desde sua primeira detecção em agosto de 1999 até outubro de 2012 foram reportados nos EUA, mais de 35.660 casos humanos de infecção por WNV, com 1.431 fatais. A epidemiologia naquele país revela que aproximadamente 80% dos casos de infecção humana por WNV são assintomáticos e que entre os 20% que apresentam quadro clínico, a cerca de 40% desenvolvem doença neuroinvasiva, forma mais grave da infecção manifestada principalmente por meningite e encefalite. Menos frequentemente a doença neurológica pode se manifestar como uma síndrome de paralisia flácida aguda chamada poliomielite por WNV, que se caracteriza por uma inflamação da medula espinhal semelhante à causada pela infecção por *Poliovirus*. Aproximadamente 60% dos casos clínicos desenvolvem a

febre do Oeste do Nilo que se caracteriza por febre e sinais inespecíficos como fadiga, cefaleia e ocasionalmente *rash* cutâneo, gânglios linfáticos aumentados e dor nos olhos (CDC 2012).

O ciclo enzoótico de WNV envolve primariamente espécies de aves como hospedeiros amplificadores primários e mosquitos adultos ornitofílicos como vetores, que ocasionalmente infectam hospedeiros vertebrados terminais como equinos e humanos (Komar et al. 2003).

A principal forma de infecção por WNV em seres humanos ocorre através da hematofagia de culicídeos infectados e por isso maior número de casos de infecção humana sintomática por WNV é registrado do início da primavera até outono, período considerado de maior emergência de culicídeos adultos (Zeinad et al. 2004). Todavia, embora menos comum a transmissão viral sem o envolvimento de artrópodes vetores também vem sendo descrita por transfusão de sangue (CDC 2002c, 2007b), transplante de órgãos (Iwamoto et al. 2003; CDC 2005), amamentação (CDC 2002d) e transmissão intrauterina (CDC 2002b; Skupski et al. 2006; Paisley et al. 2006).

A susceptibilidade das aves à infecção por WNV varia entre as espécies de diferentes ordens. Espécies da ordem Passeriformes são as mais suscetíveis, apresentam elevada viremia e alta taxa de mortalidade. Nos EUA, epizootias por WNV em aves têm sido descritas principalmente em membros da ordem Passeriformes da família Corvidae. Espécies das ordens Chadriiformes e Anseriformes também são altamente susceptíveis à infecção e doença. Psitacídeos e galináceos são menos susceptíveis à infecção por WNV (McIntosh et al. 1969; Komar 2000; Komar et al. 2003; Banet-Noach et al. 2003; Julian et al. 2003; Austin et al. 2004).

Além de mais de 150 espécies de aves, pelo menos 30 espécies de outros grupos de vertebrados, principalmente mamíferos, são susceptíveis à infecção por WNV (van der Meulen et al. 2005). Todavia, salvo raras exceções, estas espécies não participam do ciclo de transmissão e por isso são considerados hospedeiros terminais. Os equinos, por exemplo, apesar de alta susceptibilidade quando infectados apresentam uma viremia baixa e curta, insuficiente para manutenção viral



no ciclo de transmissão e por isso apresentam baixa relevância como fonte de infecção viral aos artrópodes vetores (Bunning et al. 2002).

Em mamíferos, as epizootias causadas pelo WNV têm se mostrado mais graves em equinos, com muitos casos clínicos e às vezes com índices de mortalidade acima de 35% (Ostlund et al. 2000). No estado de New York nos EUA, mais de 20 mil casos de encefalomielite por WNV em equinos já foram relatados (Ward 2005). Embora o WNV seja altamente infeccioso em cavalos de todas as raças e idades indistintamente, normalmente o vírus apresenta baixa virulência nestes animais. Assim como no homem, apenas um pequeno percentual de equinos infectados apresenta quadro clínico (Phalen & Dahlhausen 2004). Cavalos com sinais clínicos podem apresentar de moderada a grave ataxia, fasciculações musculares e deficiência funcional de nervos cranianos. A febre não é um sinal comum da doença nestes animais (Trock et al. 2001). Os cavalos são considerados bons sentinelas para vigilância de WNV por várias razões, entre elas a fácil identificação dos animais infectados e doentes e a facilidade de coleta dos espécimes biológicos nestes animais (Dauphin et al. 2004).

Apesar do elevado número de casos em equinos, a doença nestes animais é imunoprevenível nos EUA desde 2002, quando foi licenciada pelo departamento de agricultura daquele país, uma vacina composta por vírus inativado para equinos (Connell 2003).

Entre as exceções de espécies que experimentalmente desenvolveram viremia suficiente para infecção de vetores e potencialmente poderiam participar como hospedeiros amplificadores no ciclo de transmissão de WNV estão o gato doméstico, o ranídeo *Pelophylax ridibundus*, popularmente conhecida como sapo do pântano e o crocodiliano *Alligator mississippiensis*, popularmente conhecido como aligátor americano (Kostyukov et al. 1985, 1986; Austgen et al. 2004; Klenk et al. 2004).

Em um estudo realizado para se avaliar a capacidade de transmissão horizontal de WNV entre aligátors americanos, a maioria dos indivíduos jovens experimentalmente infectados por via parenteral e enteral sustentou uma viremia  $>5 \log_{10}$  considerada infecciosa para o mosquito *Culex quinquefasciatus*. Também foi

demonstrado que indivíduos jovens experimentalmente infectados foram capazes de transmitir WNV a outros aligátors que não haviam sido infectados. O perfil virêmico e as múltiplas rotas de infecção sugerem que os aligátors jovens podem desempenhar relevante papel na transmissão de WNV em áreas de alta densidade populacional destes animais (Klenk et al. 2004).

Com relação aos hospedeiros invertebrados, WNV tem sido isolado em mais de 40 espécies de culicídeos e também em algumas espécies de ixodídeos e argasídeos (Lawrie et al. 2004). Assim como observado com SLEV, os culicídeos identificados a *Culex* apresentam maior relevância no ciclo de transmissão de WNV (Hubálek & Halouzka 1999; Molaei et al. 2006).

Durante a epizootia e epidemia de encefalite por WNV ocorrida nas cidades de New York e New Jersey nos EUA em 1999, a pesquisa viral em mais de 1.850 grupos específicos de mais de 32.000 culicídeos capturados, detectou através de isolamento viral a presença de WNV em 15 grupos, todos identificados a *Culex* (Nasci et al. 2001).

No ano seguinte, a análise por PCR de mais de 300.000 culicídeos detectou a presença de ácido nucléico viral em 363 grupos identificados a *Psorophora*, *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus* e *Culex*. Entretanto, dos 5.836 grupos identificados a *Culex* submetidos à PCR, a presença de ácido nucléico viral foi detectada em aproximadamente 5,8%, enquanto dos 2.345 grupos identificados aos outros gêneros, aproximadamente 0,9% foram soropositivos (White et al. 2001).

Entre as espécies de *Culex* em que mais frequentemente se detecta WNV estão *Culex pipiens*, *Culex restuans* e *Culex salinarius* (Andreadis et al. 2001; White et al. 2001; Nasci et al. 2001).

Na natureza, a capacidade de perpetuação do WNV em condições climáticas adversas em regiões de clima temperado é atribuída à transmissão vertical e manutenção viral durante a diapausa em mosquitos vetores, bem como a circulação de WNV em aves (Goddard et al. 2003; Farajollahi et al. 2005; Nemeth et al. 2009; Wheeler et al. 2012).

Após a sua introdução nos EUA em 1999, WNV rapidamente se espalhou pela América do Norte, atingindo também a América Central e do Sul (Komar & Clark 2006). Na América Latina, embora existam relatos de equinos soropositivos em países como México, Cuba, Guatemala, El Salvador, Guadalupe e Jamaica (Dupuis II et al. 2003; Blitvich et al. 2003b; Quirin et al. 2004; Cruz et al. 2005; Morales-Betoulle et al. 2006; Pupo et al. 2006), a circulação do vírus na América do Sul ainda não havia sido descrita até 2005, quando então foi identificada soropositividade para WNV em equinos na Colômbia (Mattar et al. 2005).

Em 2006, a circulação de WNV na América do Sul foi confirmada a partir de isolamento viral de tecido cerebral de equinos que haviam apresentado quadro de encefalite na Argentina (Morales et al. 2006). Em toda a América do Sul, evidências sorológicas da circulação de WNV já foram reportadas em aves e cavalos na Colômbia, Venezuela e Argentina (Mattar et al 2005; Bosch et al. 2007; Diaz et al. 2008; Tauro et al. 2012). Entretanto, apesar de evidências sorológicas da circulação de WNV na América do Sul, à exceção da Argentina, no restante do continente sul-americano casos de infecção clínica em seres humanos e animais ainda não foram reportados, bem como ainda também são desconhecidos potenciais vetores e hospedeiros amplificadores do ciclo de transmissão de WNV na região.

Na Argentina, entretanto, além do relato de casos de encefalite equina por WNV, recentemente também foram reportados casos sugestivos de infecção clínica humana por WNV no país (Morales et al. 2006; Artsob et al. 2009).

No Brasil, em virtude da comprovada circulação viral em países limítrofes, um programa de vigilância epizootiológica para WNV vem sendo realizado principalmente através de sorologia em aves. Em outubro de 2002, o primeiro inquérito sorológico realizado no Parque Nacional da Lagoa dos Peixes, localizado entre os municípios de Mostardas, Tavares e São José do Norte do RS, avaliou amostras de 522 espécimes de aves identificadas a 19 espécies (Brasil 2003). Em abril do ano seguinte, em outro inquérito sorológico desta vez realizado no município de Galinhos no estado do Rio Grande do Norte no nordeste brasileiro foram avaliados mais de 700 espécimes de aves identificadas a 23 espécies, com 17 migrantes (Brasil 2004c). Em novembro de 2003, em virtude da relevância epizootiológica do Parque Nacional da Lagoa dos Peixes considerado uma das mais

importantes áreas de pouso e internada de aves migratórias no país, um segundo inquérito sorológico foi realizado em amostras de 172 espécimes de aves identificadas a 19 espécies (Brasil 2004d). Nos três estudos realizados no sul e no nordeste do país não foram detectadas evidências da circulação de WNV nas aves capturadas.

Além das áreas investigadas no nordeste e sul do país, o Brasil abriga em seu território diferentes biomas como o Pantanal e a Amazônia que devido às características ecológicas estão susceptíveis à circulação de WNV (Pauvolid-Corrêa & Varella 2008).

Considerando esta hipótese, em 2007 uma investigação para identificar a circulação de WNV e outros arbovírus através de isolamento viral e RT-PCR em amostras de soro equino, bem como em amostras de culicídeos e ixodídeos foi iniciada na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de MS. Apesar da ausência de vestígios da circulação de WNV nas amostras estudadas, elevada prevalência de anticorpos neutralizantes para SLEV, flavivírus antígenicamente relacionado à WNV, foi detectada em equinos da região (Pauvolid-Corrêa et al. 2010, 2010b). Em um estudo experimental de uma nova abordagem para o diagnóstico de infecção por flavivírus em equinos baseada em IgG ELISA utilizando-se como antígeno peptídeos recombinantes do domínio III da proteína de envelope de SLEV, WNV e ROCV, a sororeatividade para WNV foi detectada em equinos no Brasil. Todavia, estes resultados não foram confirmados por testes mais específicos como NT para descartar reações cruzadas com outros flavivírus que circulam no país (Silva 2010).

#### 1.3.1.3 Vírus da febre amarela (YFV)

O YFV se mantém na natureza em dois ciclos de transmissão. O ciclo enzoótico silvestre envolvendo culicídeos primatófilos, como vetores e primatas não humanos como hospedeiros amplificadores, e o ciclo urbano que envolve o homem como hospedeiro amplificador e *Aedes aegypti* como vetor (Vasconcelos 2003).

Quando clinicamente manifestada, a infecção por YFV, chamada de febre amarela, se caracteriza por uma doença infecciosa febril aguda de curta duração e gravidade variável que acomete primariamente os primatas. Todos os gêneros de macacos do Novo Mundo são susceptíveis ao YFV e podem, portanto, atuar como hospedeiros desta arbovirose (Brasil 2005).

A febre amarela pode ser definida como uma doença de curta duração que pode se apresentar de forma oligossintomática até fulminante, em que os sinais clínicos clássicos de icterícia, albuminúria e hemorragias estão presentes. O YFV também causa infecções assintomáticas ou subclínicas que, junto com as formas leves da doença, somente são identificadas pelos exames laboratoriais específicos. Estima-se que pelo menos 90% dos casos de febre amarela são oligossintomáticos e raramente diagnosticados, e que somente 10% evoluem para formas graves associadas com elevada letalidade (Vasconcelos 2003).

Atualmente, em virtude da expressiva diminuição do ciclo urbano, a febre amarela é essencialmente uma zoonose endêmica sazonal em florestas africanas e sul-americanas delimitadas entre os paralelos 12°S e 12°N (Tauil et al. 2005). Epizootias atribuídas à infecção por YFV envolvendo primatas não humanos neotropicais são comumente reportadas e demonstram um coeficiente de morbidade e letalidade maior que as observadas na África (Vasconcelos et al. 1998).

Entre os principais hospedeiros vertebrados susceptíveis envolvidos no ciclo não urbano estão *Alouatta* spp., *Ateles* spp., *Cebus* spp., *Aotes* spp. e *Callithrix* spp. no Novo Mundo e *Galago senegalensis* no continente africano (Varma 1989b). Entre os primatas não humanos neotropicais, a susceptibilidade ao vírus varia entre as espécies. Os gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e *Ateles* apresentam alta susceptibilidade ao YFV com coeficientes de letalidade elevados, enquanto *Cebus* spp. apresentam baixos coeficientes de letalidade e geralmente desenvolvem imunidade (Brasil 2005).

Em relação aos hospedeiros invertebrados, apesar de relatos de infecção natural e capacidade vetorial da espécie de Ixodídeo *Amblyomma variegatum* na África e também, a demonstração experimental da capacidade vetorial de carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Ornithodoros rostratus* no Brasil, a principal forma de

transmissão natural de YFV ocorre através de culicídeos infectados (Aragão 1936; Germain et al. 1979).

As principais espécies de vetores atualmente envolvidas em ciclos de transmissão de YFV são *Aedes aegypti*, em ciclo urbano, e *Aedes africanus*, em ciclo silvestre no continente africano, e *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes chloropterus*, em ciclo silvestre na América do Sul (Varma 1989b; Vasconcelos et al. 2001b).

A outras espécies de culicídeos também têm se atribuído competência vetorial em ciclo de transmissão de YFV como *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus* e *Aedes simpsoni* na África, *Haemagogus lucifer*, *Haemagogus equinus*, *Haemagogus spegazzinii*, *Haemagogus mesodentatus* e *Anopheles neivai* na América Central e *Aedes scapularis*, *Haemagogus albomaculatus* e *Sabethes soperi* na América do Sul (Smithburn et al. 1949; Rodaniche et al. 1957; Rodaniche & Galindo 1957; Travassos da Rosa et al. 1984; WHO 1985; Dégallier et al. 1992; Vasconcelos et al. 1997; Thonnon et al. 1998; Vasconcelos et al. 2001, 2003). A espécie *Sabethes soperi* é considerada importante vetor em MS, sendo atribuída à espécie a epidemia de febre amarela silvestre ocorrida no início da década de 1990 naquele estado (Dégallier et al. 1992; Vasconcelos et al. 1998).

O ciclo urbano de febre amarela não é descrito nas Américas desde a década de 1950, quando foram reportados os últimos casos de transmissão urbana em Trinidad em 1954. No Brasil, a última epidemia descrita de febre amarela urbana foi reportada no Rio de Janeiro em 1929. Depois disso, os últimos casos de febre amarela por transmissão urbana no Brasil foram reportados no Acre em 1942. Desde então, apesar dos altos índices de infestação por *Aedes aegypti* em várias cidades do Brasil, não foram mais reportados casos de transmissão urbana de febre amarela no Brasil (Vasconcelos 2003).

Apesar da ausência de ciclo de transmissão urbana de YFV no Brasil, casos isolados não autóctones vêm sendo esporadicamente reportados em grandes cidades brasileiras (Filippis et al. 2001; Brasil 2008c). Evidências da circulação de indivíduos infectados por YFV em grandes centros urbanos associadas à grande

infestação por *Aedes aegypti* observada em todos os estados do país alertam para o risco de reurbanização da febre amarela no país (Tauil et al. 2005).

Apesar de diversos relatos de infecção sintomática por YFV no Novo Mundo até o início do século XX, atualmente a circulação viral restringe-se a África subsaariana, América do Sul e aos países centro-americanos Panamá e Trinidad e Tobago (Liceaga 1912; Fossier 1942; Heaton 1946; Elton 1952; Solorzano 1953; CDC 2007).

Entretanto e apesar de ser uma doença imunoprevenível há mais de cinco décadas, aproximadamente 200.000 casos de febre amarela ocorrem anualmente em todo o mundo, com 90% dos casos reportados na África. A partir da década de 1980, houve uma reemergência de febre amarela na África Subsaariana e também na América do Sul. Aproximadamente 18.700 casos de febre amarela, com a cerca de 4.500 fatais foram reportados de 1987 a 1991, o que representou o maior número de casos de febre amarela reportado em um período de cinco anos desde 1948 (Robertson et al. 1996).

Durante este período, diversas epidemias e pequenos surtos de febre amarela reportados em países da África Ocidental elevaram a incidência da doença no continente africano. A primeira epidemia de febre amarela reportada no Quênia em mais de 20 anos demonstrou que, além do aumento da incidência, uma mudança na distribuição da doença também já estava acontecendo. Na América do Sul, a maior epidemia de febre amarela desde a década de 1950 ocorreu no Peru, em 1995, quando casos da doença também foram reportados na Bolívia, Colômbia, Equador e no Brasil (Barnett 2007).

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

Entre 2007 e 2009, extensas epizootias e epidemias de febre amarela foram reportadas em diversos estados brasileiros e também no Paraguai. Iniciada em abril de 2007, uma epizootia de febre amarela em primatas não humanos foi reportada em 80 municípios do Brasil. A epizootia continuou se propagando e de dezembro de 2007 a janeiro de 2008, mais 88 municípios foram afetados. Durante esta epizootia, uma epidemia envolvendo 30 casos humanos confirmados, com 15 fatais também foi reportada de dezembro de 2007 a janeiro de 2008. Em fevereiro de 2008, o governo brasileiro iniciou uma campanha de vacinação nas áreas afetadas (WHO 2008).

De dezembro de 2007 a março de 2008, foram confirmados 38 casos humanos de febre amarela silvestre, com 20 casos fatais no Brasil. No mesmo período foram reportadas epizootias em primatas não humanos em mais de 250 municípios brasileiros, com 221 localizados no estado de Goiás e Distrito Federal (Brasil 2008d).

Também em 2008, a transmissão de YFV foi detectada no sudeste do Brasil. Isolados de YFV foram obtidos a partir de amostras de humanos, primatas não humanos e também de mosquitos confirmando a circulação de YFV no estado de São Paulo (Moreno et al. 2011).

Ainda em 2008 e 2009, a maior epizootia de febre amarela já descrita em primatas não humanos silvestres foi reportada no RS. A circulação de YFV foi detectada em 67 municípios do estado, onde 21 casos de infecção humana também foram reportados. Durante o trabalho de vigilância epizootiológica realizado em primatas não humanos no estado foram detectados entre outubro de 2008 a junho de 2009 aproximadamente 2.000 animais mortos. Dos 297 animais testados, 204 (69%) foram positivos para YFV (de Almeida et al. 2012).

Novamente em 2008, desta vez no Paraguai, 24 casos confirmados de febre amarela humana, com oito fatais, foram reportados de janeiro a março. Os casos foram reportados em três departamentos e também em áreas urbanas. Com o surto, mais de 1.5 milhões de pessoas foram vacinadas em campanhas realizadas pelo governo paraguaio para prevenir a ocorrência de novos casos nas regiões afetadas (WHO 2008b).



Recentemente, um grande surto de febre amarela foi reportado na África. Em 2012, um total de 732 casos suspeitos, incluindo 165 óbitos foi reportado em mais da metade dos 64 municípios da região de Darfur, no oeste do Sudão (WHO 2012).

#### 1.3.1.4 Vírus Dengue (DENV)

O DENV é um arbovírus que circula entre primatas e espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, e do ponto de vista ecológico apresenta muitas semelhanças ao YFV. Assim como o YFV, o DENV se mantém na natureza através de dois ciclos de transmissão, o ciclo silvestre e o ciclo urbano. O ciclo urbano que envolve o homem como hospedeiro vertebrado amplificador e duas espécies antropofílicas do gênero *Aedes* como vetores, e o ciclo silvestre que é mantido entre primatas não humanos e espécies primatófilas de *Aedes* em florestas do sudeste asiático e oeste da África (Vasilakis et al. 2011).

O DENV apresenta quatro antigenicamente distintos, mas geneticamente relacionados sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) agrupados ao complexo antigênico de DENV (Calisher et al. 1989). Para cada um dos quatro sorotipos de DENV são reconhecidos diferentes genótipos, com cinco para o DENV-1, quatro para o DENV-2, quatro para o DENV-3 e três para o DENV-4 (Rico-Hesse 2003). A circulação de alguns genótipos tem sido associada ao aumento de virulência no sul da Ásia e evidências recentes sugerem a disseminação destes genótipos para o sudeste asiático, Pacífico e também nas Américas (Kyle & Harris 2008).

A dengue, como é chamada a infecção clínica pelos quatro sorotipos de DENV, é a infecção viral transmitida por mosquito mais rapidamente disseminada em todo o mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência aumentou 30 vezes com um aumento da expansão geográfica para novos países e também, na última década, de áreas urbanas para áreas rurais. Estima-se que aproximadamente 50 milhões de novas infecções por DENV ocorram anualmente em todo o mundo e que 2.5 bilhões de pessoas vivam em países endêmicos (WHO 2009). Até a década de 1970, em apenas nove países havia relatos de dengue grave, desde então o número de casos aumentou mais de quatro vezes e continua aumentando. Em 1998, durante uma

pandemia sem precedentes, 1,2 milhão de casos foram reportados em 56 países (WHO 2012b).

Até meados da década de 1990, o sudeste asiático era a região com maior número de casos de dengue em todo o mundo. Desde então, o número de casos da doença aumentou em países da América Central e do Sul, que atualmente contribuem com mais da metade dos casos de dengue reportados em todo o mundo. O Brasil é o país com o maior número de casos reportados de dengue em todo o mundo, com três milhões apenas entre 2000 e 2005 (Teixeira et al. 2009).

No Brasil, o primeiro relato confirmado de casos de dengue aconteceu no final de 1981 e início de 1982 na cidade de Boa Vista, no estado de Roraima, na Região Norte do Brasil. Estima-se que aproximadamente 7.000 casos de dengue tenham sido causados por DENV-1 e DENV-4 (Osanai et al. 1983). Em 1986, quando o DENV-1 foi novamente detectado, desta vez na segunda cidade mais populosa do país, Rio de Janeiro, a dengue passou a ser considerado um problema nacional de saúde pública (Schatzmayr et al. 1986). No ano seguinte, algumas capitais do nordeste do país já apresentavam casos e a incidência alcançou 64.6 por 100 mil habitantes. O número total de casos acumulados em dois anos chegou a aproximadamente 130.000. Estima-se que em 1986 e 1987, mais de um milhão de pessoas foram infectadas por DENV-1 (Teixeira et al. 2009).

Na década de 1990, após as sucessivas introduções de DENV-2 e DENV-3 no RJ, que apresenta condições socioeconômicas e ambientais que favorecem o estabelecimento e manutenção do ciclo de transmissão, a dengue passou a ser reportada em todas as regiões do país (Schatzmayr et al. 1986; Nogueira et al. 1990, 2005; Brasil 2012). Em 2008, com a detecção de DENV-4 no norte do país o Brasil passou a ter em seu território a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV (Figueiredo et al. 2008).

De 1990 a 2011 foram descritos em todo o país 6.642.936 casos de dengue, dos quais 2.742.122 (41,2%) foram reportados na Região Sudeste, 2.346.682 (35,3%) na Região Nordeste, 797.038 (11,9%) na Região Centro-Oeste, 610.856 (9,2%) na Região Norte, e 146.238 (2,2%) na Região Sul (Brasil 2012).

A dengue é uma doença com um espectro clínico variável, que pode se manifestar como um quadro clínico autolimitado ou como doença grave, por vezes fatal. A infecção por um sorotipo produz uma imunidade permanente contra reinfeção pelo mesmo sorotipo, mas apenas uma proteção parcial e temporária para outros sorotipos (Cunha & Nogueira 2005).

Estudos soropidemiológicos conduzidos em Cuba e na Tailândia demonstraram que uma infecção secundária heterotípica, isto é, uma segunda infecção por um sorotipo diferente não só poderia se manifestar clinicamente, como também seria um fator de risco para o dengue grave, em um fenômeno conhecido como pecado original (Halstead et al. 1970, 1983; Sangkawibha et al. 1984). Características genéticas do hospedeiro bem como do DENV envolvido também são fatores que também podem influenciar para a evolução da dengue grave (WHO 2009).

Quando grave, a dengue pode levar a extravasamento de plasma, hemorragia grave e acometimento hepático, cardíaco e também neurológico (Nogueira et al. 2002; Poovorawan et al. 2006; Wichmann et al. 2009). Entretanto, assim como toda arbovirose, a maioria das infecções por DENV são subclínicas ou resultam em dengue clássico, que se caracteriza por um início súbito de febre, cefaleia, mialgia e artralgia. (WHO 2009).

Além do ciclo de transmissão urbano de DENV, o ciclo ancestral silvestre de DENV ainda existe e é mantido entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes* spp. nas florestas da sudeste asiático, principalmente Malásia, e África ocidental (Vasilakis et al. 2011). Enquanto na Ásia e nas Américas a principal forma de transmissão de DENV ao homem ocorre através do ciclo urbano de transmissão, envolvendo vetores antropofílicos, no oeste da África o ciclo de transmissão silvestre é predominante (Diallo et al. 2003).

Os quatro sorotipos de DENV que circulam em populações humanas emergiram independentemente de progenitores ancestrais silvestres que circulavam em primatas não humanos, acompanhando o estabelecimento de populações humanas grandes e densas o bastante para suportar a transmissão contínua entre humanos através de mosquitos (Wang et al. 2000).

Os isolados silvestres da Ásia e da África são ecologicamente e evolutivamente diferentes dos isolados endêmico-epidêmicos e também divergem entre si. Em um estudo experimental utilizando-se isolados silvestres e humanos de DENV-2 para se avaliar a capacidade de replicação em culturas de células humanas, não houve diferença significativa entre os dois ecotipos sugerindo que os isolados humanos podem não ter precisado de nenhuma adaptação para uma replicação mais eficiente em células humanas, o que implica potencial para reemergência dos isolados silvestres em ciclos endêmico-epidêmicos (Vasilakis et al. 2007).

Apesar da circulação de DENV silvestre não ser comumente detectada em vetores antropofílicos de dengue endêmico-epidêmica, sugerindo que os sorotipos de DENV silvestres estão confinados às áreas florestais, atualmente existem claras evidências que estes vírus têm entrado regularmente em contato com populações humanas destas áreas de transmissão silvestre, o que poderia levar à ocorrência de casos isolados de doença grave (Vasilakis et al. 2007, 2011).

Entretanto, à exceção de um caso de dengue grave na Malásia e outro recentemente reportado na África, até o momento apenas alguns casos brandos de dengue por DENV silvestres vêm sendo reportados (Franco et al. 2011).

Apesar de seres humanos ocasionalmente se infectarem com DENV silvestre no oeste da África e provavelmente na Ásia, diferente do que ocorre com o DENV endêmico-epidêmico, no ciclo silvestre o homem participa como um hospedeiro terminal em um ciclo que envolve espécies silvestres de *Aedes* e provavelmente primatas não humanos como hospedeiros amplificadores (Moncayo et al. 2004).

A circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 silvestres na Malásia foi descrita em mosquitos da espécie *Aedes niveus* e primatas sentinelas (Rudnick et al. 1967). Apesar de DENV-3 silvestre ainda não ter sido isolado na Ásia, evidências sorológicas reportadas em macacos sentinelas na Malásia, sugerem a sua circulação no país (Rudnick 1986).

Na África, apenas a circulação de DENV-2 silvestre vem sendo reportada. Em um extenso estudo sorológico realizado nas décadas de 1980 e 1990 no Senegal, evidências da circulação de DENV-2 silvestre foram detectadas em amostras

humanas e de primatas não humanos (Saluzzo et al. 1986). Na década de 1990, através de estudos evolutivos, a existência de um DENV-2 silvestre no oeste africano geneticamente diferente dos isolados endêmico-epidêmicos foi reportada (Rico-Hesse 1990). Ainda na década de 1990, durante uma epidemia de dengue no Senegal, DENV-2 foi isolado das espécies de vetores silvestres *Aedes luteocephalus*, *Aedes taylori* e *Aedes furcifer* e também de população humana (Zeller et al. 1992; Traore-Lamizana et al. 1994).

Em 1999, também no Senegal, 73 isolados de DENV-2 silve

stre foram obtidos a partir de amostras de mosquitos silvestres incluindo *Aedes aegypti formosus* e *Aedes vittatus*. Nenhum isolado ou mesmo evidência sorológica foi obtida a partir de amostras de primatas não humanos capturados na região e por isso a participação destes animais em ciclos de transmissão na região permanece desconhecida. A análise retrospectiva das epidemias ocorridas por DENV-2 no Senegal nos últimos 28 anos revela que um maior número de casos é detectado em intervalos de 5 a 8 anos como se observa também com a YFV silvestre (Diallo et al. 2003).

#### 1.3.1.5 Vírus Rocio (ROCV)

Durante a década de 1970, à infecção por ROCV foram atribuídas epidemias de meningoencefalite em comunidades costeiras da região do Vale do Ribeira, em SP (Tiriba et al. 1976). A região, localizada entre o estado do Paraná (PR) e SP, é partícipe do sistema da Serra do Mar e abriga a maior porção contínua e preservada de Mata Atlântica remanescente no Brasil (Brasil 2008a). Durante o programa de vigilância para circulação de arbovírus, conduzido na região desde a década 1960, entre 1975 e 1976 uma epidemia de encefalite com mais de 1.000 casos registrados em 20 municípios da região foi posteriormente atribuída à infecção por ROCV (Iversson 1977; Lopes et al. 1978).

Após a epidemia de 1975, apesar da detecção de infecções sintomáticas por ROCV até o início da década de 1980 (Iversson et al. 1992), em 80 casos

notificados de encefalite entre 1978 e 1983 na região, a infecção por ROCV foi confirmada em apenas um caso (Iversson & Coimbra 1984; Iversson et al. 1989).

No início da década de 1990, um inquérito soropidemiológico realizado com 182 moradores assintomáticos da Estação Ecológica de Juréia-Itatins localizada em SP detectou a presença de anticorpos anti-ROCV em 3% das amostras avaliadas (Romano-Lieber & Iversson 2000).

Apesar do maior número de relatos na Região Sudeste, a soropositividade para ROCV também já foi reportada no estado da Bahia (BA), no nordeste brasileiro (Straatmann et al. 1997). Apesar da classificação taxonômica ao grupo do vírus *Ntaya* (*Ntaya virus* ou NTAV) como um isolado de ILHV (King et al. 2012), a análise filogenética em recente caracterização genômica completa de ROCV revela que apesar da grande proximidade genética a ILHV, este vírus deve permanecer classificado como uma espécie distinta (Medeiros et al. 2007).

Testes realizados para se avaliar a reatividade cruzada de ROCV com outros 20 flavivírus através de IH, FC e NT revelou que ROCV apresenta maior reação cruzada com SLEV, ILHV, JEV e o vírus da encefalite de Murray Valley (*Murray Valley encephalitis virus* ou MVEV) (Lopes et al. 1978). Através de *Western blotting*, ROCV apresentou-se mais intimamente relacionado com MVEV do que com WNV, SLEV e JEV (Sakurai et al. 1985).

O ciclo natural de transmissão do ROCV não é bem conhecido, contudo a ausência de isolamento viral a partir de sangue de seres humanos durante a epidemia de encefalite no litoral de SP na década de 1970 sugere que seres humanos são hospedeiros terminais. Estudos ecológicos e experimentais indicam que as aves silvestres constituem os principais hospedeiros vertebrados e que aves domésticas podem atuar como hospedeiros amplificadores. Durante a epidemia de 1975, a circulação em aves foi confirmada através de isolamento viral em um espécime silvestre identificado a *Zonotrichia capensis*, popularmente conhecido como tico-tico (Lopes et al. 1978).

Em estudo experimental, indivíduos jovens e adultos de *Passer domesticus*, popularmente conhecido como pardal, desenvolveram viremia após inoculação de ROCV. Apesar dos animais inoculados apresentarem uma viremia rápida e em

baixos títulos, estes estudos experimentais corroboraram a hipótese de que aves silvestres estão envolvidas na transmissão de ROCV (Monath et al. 1978).

Em um extenso inquérito sorológico realizado em aves silvestres capturadas na região do Vale do Ribeira entre 1978 e 1990, a presença de anticorpos monotípicos inibidores de hemaglutinação por ROCV foi detectada em espécimes identificados a espécies residentes e de hábitos migratórios, como *Sporophila caerulescens*, popularmente conhecido como coleirinho (Ferreira et al. 1994).

A soropositividade em aves de hábitos migratórios associada à detecção de circulação viral em outras áreas supõe que o vírus está sendo por elas disseminado a outras regiões com características ecológicas semelhantes (Tavares-Neto et al. 1986; Iversson 1994; Tavares-Neto et al. 1996).

Não há registros de infecção clínica por ROCV em animais selvagens. Entretanto, em 1975 em estudo conduzido em área epidêmica 31,8% dos roedores, 60% dos marsupiais, 10,9% dos morcegos, 7,3% das galinhas, 25% dos patos e 28,5% dos pombos foram soropositivos (Lopes et al 1978b). Ainda sobre os animais domésticos, 10% dos 414 pacientes da Região do Vale do Ribeira em SP reportaram mortes de galinhas e porcos durante a epidemia. Todavia, a associação da infecção por ROCV a estes relatos não foi confirmada (Iversson 1980).

Com relação a hospedeiros invertebrados, a principal espécie envolvida no ciclo de transmissão ainda não é conhecida, entretanto o único isolamento viral em grupos de artrópodes ocorreu em espécimes de *Psorophora ferox* coletados durante a epidemia de 1975. No estudo com aproximadamente 38.900 espécimes de mosquitos de 88 espécies capturados em 1975 e 1976, ROCV foi isolado em cultura de células de embrião de pato a partir de um grupo de 18 espécimes de *Psorophora ferox* capturados em armadilha Shannon em fevereiro de 1976 (Lopes et al. 1981).

A comprovação experimental da capacidade de infecção e transmissão de ROCV por *Psorophora ferox* e *Aedes scapularis* associada às características biológicas da espécie *Aedes serratus* e do subgênero *Culex (Melanoconion)* spp. as sugerem como potenciais vetores deste arbovírus em ambiente silvestre (Forattini et al. 1978; Mitchell & Forattini 1984; Mitchell et al. 1986; Natal et al. 1998).

### 1.3.1.6 Vírus Ilhéus (ILHV)

Em 1944, durante investigação epidemiológica em área endêmica de febre amarela próxima à cidade de Ilhéus, BA, no nordeste do Brasil, a tentativa de isolamento viral de grupos de culicídeos compostos predominantemente pelas espécies *Aedes serratus* e *Psorophora ferox* detectou a presença de um novo vírus no Brasil. Além do isolamento viral, a detecção de soropositividade em trabalhadores locais e a demonstração experimental da capacidade de transmissão viral pelos culicídeos *Aedes serratus*, *Psorophora ferox* e *Aedes aegypti* confirmaram a circulação na BA de um novo arbovírus então denominado vírus Ilhéus (Laemmert & Hughes 1947).

A manutenção de ILHV na natureza é atribuída ao ciclo silvestre envolvendo *Psorophora ferox* como principal hospedeiro invertebrado. Entretanto, ILHV também já foi isolado em espécimes de *Psorophora albipes*, *Psorophora lutzii*, *Aedes serratus*, *Aedes fulvus*, *Aedes scapularis* e *Haemagogus leucocelaenus*. *Aedes angustivittatus*, *Culex caudelli*, *Culex nigripalpus*, *Culex vomerifer*, *Haemagogus capricornii*, *Sabethes chloropterus* e *Trichoprosopon* sp. na América do Sul e Central (Rodaniche & Galindo 1957b; Aitken 1960; Rodaniche & Galindo 1961; Galindo 1963; Rodaniche & Galindo 1963).

Entre os hospedeiros vertebrados domésticos, a soropositividade para ILHV tem sido identificada principalmente em equinos (Travassos da Rosa et al. 1997). A sorologia de 500 animais do Jockey Clube do Brasil na cidade do Rio de Janeiro identificou soropositividade para ILHV em 34,8% das amostras avaliadas (Travassos et al. 1961). Alguns anos mais tarde, anticorpos contra ILHV também foram detectados em amostras de animais de produção na província argentina de Tucuman (Holgado et al. 1967). Em outro inquérito sorológico realizado em território brasileiro, a avaliação de 432 equinos residentes na região do Pantanal Sul Mato-Grossense identificou soropositividade para ILHV em 115 animais, indicando a circulação do vírus naquela região (Iversson et al. 1993).

Com relação aos animais silvestres, um programa de vigilância epidemiológica para arbovírus realizada em região de Mata Atlântica em SP entre 1978 e 1990 avaliou mais de 39 mil espécimes de aves silvestres, identificando



anticorpos para ILHV em 20 espécies, com nove residentes, sete residentes com hábitos migratórios e apenas uma migratória estrita (Ferreira et al. 1994). Em 2001, em outro estudo de vigilância realizado com animais silvestres do Parque Ecológico do Tietê na cidade de São Paulo, a circulação de ILHV na avifauna local foi detectada através de isolamento viral e sorologia. Além das aves, a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação por ILHV também foi detectada em primatas não humanos identificados às espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* e em carnívoro identificado a *Nasua nasua* (Pereira et al. 2001) conhecidos respectivamente como sagui-de-tufo-branco, sagui-de-tufo-preto e quati.

Provas sorológicas positivas e isolamento viral em humanos no Brasil também vêm sendo relatados. Durante a década de 1950 na Amazônia, ILHV foi detectado em espécimes biológicos de animais sentinelas, culicídeos e em indivíduos humanos sintomáticos (Causey et al. 1961).

Durante a década de 1980, a soropositividade para ILHV em humanos também foi detectada no nordeste brasileiro (Tavares-Neto et al. 1986). Embora as infecções por ILHV normalmente sejam consideradas brandas ou assintomáticas e que a detecção de anticorpos anti-ILHV seja comum após infecção, ILHV foi isolado de pacientes humanos sintomáticos e soronegativos (Cruz 1994, Nassar et al. 1997). Recentemente foram relatados casos de infecção humana clínica por ILHV no Equador e também na Bolívia (Johnson et al. 2007; Venegas et al. 2012).

#### 1.3.1.7 Vírus Cacipacoré (CPCV), Vírus Iguape (IGUV) e Vírus Bussuquara (BSQV)

Até o momento, muito pouco se sabe acerca dos flavivírus CPCV, IGUV, e BSQV. Hospedeiros vertebrados e invertebrados e até mesmo os ciclos de transmissão destes flavivírus permanecem ainda pouco esclarecidos.

BSQV foi isolado pela primeira vez em dois de Março de 1956 a partir do sangue de um espécime sentinela de *Alouatta beelzebul*, popularmente conhecido como guariba, mantido em uma gaiola a 5 metros de altura no antigo Instituto Agrônômico do Norte, em Belém, PA. Uma alíquota de sangue foi inoculada

intracerebralmente em camundongos de três dias de idade que a partir do sexto dia pós-infecção (dpi) apresentaram sinais clínicos de doença. A emulsão de tecido cerebral destes camundongos se mostrou novamente patogênica quando inoculada em camundongos neonatos. Após algumas semanas, o primata se apresentou icterico e evoluiu para o óbito. Análises histopatológicas do fígado do animal revelaram lesões compatíveis com febre amarela. Entretanto, o vírus recém-isolado não foi neutralizado por uma amostra de soro imune para YFV. Após testes de IH, CF e NT com 14 diferentes flavivírus, BSQV apresentou baixa reação cruzada com todos e foi então reconhecido como um novo flavivírus (Gomes & Causey 1959).

Laboratorialmente o vírus forma placas em diferentes linhagens celulares como em células de rim de pato, células de embrião de galinha e de peru, BHK-21, VERO, MA-104 e HeLa. Desde que foi isolado pela primeira vez na década de 1950, BSQV foi isolado também a partir de camundongos sentinelas, roedores silvestres como *Proechimys guyannensis* e diferentes espécies de mosquitos principalmente *Culex* spp., como *Culex (Melanoconion) taeniopus*, *Culex vomerifer*, *Culex crybda*. Além de espécies de *Culex*, BSQV também já foi isolado de *Mansonia titillans*, *Coquillettidia venezuelensis* e *Trichoprosopon* sp. Experimentalmente, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* apresentaram altos títulos de BSQV em glândulas salivares (Karabatsos 1985).

Infecções em animais domésticos e selvagens não são reportadas. Há relatos da circulação de BSQV no Brasil, Colômbia e Panamá e um único relato, até o momento, de infecção clínica em humano apresentando um quadro de febre, dor de cabeça e artralgia (Srihongse & Johnson 1971; Karabatsos 1985).

CPCV foi isolado pela primeira vez a partir de amostra de sangue de um espécime macho adulto de ave silvestre *Formicarius analis*, popularmente conhecido como pinto-do-mato, também no PA em Julho de 1977. Após estudos sorológicos conduzidos com diferentes flavivírus, CPCV se mostrou diferente de outros flavivírus da Amazônia. Por FC, CPCV foi agrupado ao complexo JEV-MVEV-WNV, entretanto com diferenças com os membros do grupo. Outros testes adicionais realizados por NT utilizando 63 flavivírus revelaram que CPCV era diferente de todos os outros flavivírus. CPCV não apresentou relação antigênica com nenhum outro flavivírus e por isso não foi colocado a nenhum complexo dos flavivírus (Karabatsos 1985).

Entretanto, de acordo com o nono relatório sobre taxonomia viral, CPCV está assim como WNV e SLEV, taxonomicamente agrupado ao complexo do JEV (King et al. 2012).

Desde seu isolamento, evidências sorológicas para a circulação de CPCV foram detectadas por IH primariamente em aves, mas também em uma amostra de roedor e em seres humanos no PA. Até o momento, não são conhecidos vetores de CPCV no Brasil. Em um estudo conduzido na área em que CPCV foi isolado no PA, a análise de culicídeos e flebotomíneos foi negativa para a presença de vírus (Karabatsos 1985).

Até a década de 2000, casos de infecção humana clínica ou mesmo isolamento de CPCV eram desconhecidos. Entretanto, recentemente foi reportado o isolamento de CPCV a partir de um caso humano grave com suspeita de febre amarela no estado de Rondônia (RO), caracterizando o primeiro isolamento de CPCV em seres humanos (Batista et al. 2011). Também foi reportada recentemente a detecção molecular de CPCV em grupos de *Culex* e *Anopheles* capturados também em RO e em espécimes de *Aedes aegypti* capturados no estado do Amazonas (Henriques 2008; Figueiredo 2010). Até o momento, evidências sorológicas da circulação de CPCV em animais domésticos não vêm sendo reportada.

Com relação ao IGUV, dados a respeito do ciclo de transmissão e hospedeiros partícipes também são escassos. Desde o primeiro isolamento viral a partir de roedores sentinelas, no final da década de 1970 na região do Vale do Ribeira em SP, raros relatos acerca de evidência sorológica de infecção por IGUV vêm sendo reportados. Soros humanos e de animais, submetidos a testes de IH apresentaram anticorpos monotípicos para IGUV, evidenciando circulação em pássaros, roedores silvestres, marsupiais, morcegos, aves domésticas e seres humanos (Coimbra et al. 1993). Evidências sorológicas da circulação de IGUV também foram detectadas em aves silvestres e de hábitos migratórios, capturadas na mesma região em que o vírus foi originalmente isolado, no Vale do Ribeira em SP (Ferreira et al. 1994)

Em FC, IH e NT, IGUV apresenta reações sorológicas cruzadas com outros flavivírus como ILHV, SLEV, ROCV YFV e DENV (Bocato-Chamelet et al. 2001).

Até o momento, não são conhecidos casos de infecção clínica em humanos ou animais. Com relação aos hospedeiros invertebrados, IGUV foi isolado em 1994, a partir de espécimes de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* capturados em área florestal da Serra do Mar em SP (Bocato-Chamelet et al. 2001).

#### 1.4 O LOCAL ESCOLHIDO PARA A PESQUISA

O Pantanal é uma vasta planície sedimentar de aproximadamente 140.000 Km<sup>2</sup> localizada na América do Sul entre os meridianos de 55° e 58° de longitude oeste e os paralelos de 16° e 22° de latitude sul. A planície é limitada pelo planalto central brasileiro a leste e pela elevação andina a oeste (Junk & Cunha 2005).

A região pertence à Sub-bacia hidrográfica do rio Paraguai que por sua vez integra a bacia hidrográfica do rio da Prata, abrangendo território brasileiro, boliviano e paraguaio. Entretanto, a cerca de 85% da região pantaneira encontram-se no Brasil em uma área de aproximadamente 600 km no sentido norte-sul e em alguns pontos 250 km no sentido Leste-Oeste. Em território brasileiro, estima-se que 35,5% da região se localizam no estado de Mato Grosso (MT) e 65,5% em MS (Alho et al. 1988).

O Pantanal brasileiro, caracterizado por apresentar um território aluvial de baixa altitude e relevo plano, está dividido com base nos critérios de regime hídrico, relevo, fitofisiografias e textura do solo, nas seguintes Sub-regiões: Cáceres (MT) 9,01%, Poconé (MT) 11,63%, Barão de Melgaço (MT) 13,15%, Paiaguás (MT/MS) 19,60%, Paraguai (MT/MS) 5,90%, Nhecolândia (MS) 19,48%, Aquidauana (MS) 3,62%, Miranda (MS) 3,17%, Abobral (MS) 2,05%, Porto Murtinho (MS) 2,78% e Nabileque (MS) 9,61% (Adámoli 1982; Silva & Abdon 1998) (Figura 1.2).

Apesar das diferenças climáticas de uma sub-região para outra, do ponto de vista da intensidade e da distribuição de chuva e temperatura (Moraes et al. 2000), o clima na região apresenta basicamente duas estações climáticas distintas, a estação chuvosa que vai de novembro a abril e a estação seca entre maio e outubro.

Segundo a classificação de Koppen, o clima é do tipo Aw, quente e úmido, apresentando temperatura média anual de 25,4°C, com temperaturas mais baixas nos meses de junho e julho e com temperaturas mais altas nos meses de dezembro e janeiro (Soriano 1999; Soriano & Galdino 2002). A precipitação anual das chuvas chega a 1500 milímetros concentrados nos meses de verão, sobretudo janeiro e fevereiro. A alternância de fortes estiagens e de grandes enchentes é o mecanismo regulador que exerce um perfeito controle sobre a atividade da maior parte dos abundantes seres vivos que habitam o Pantanal (Ravazzani et al. 1990).

Em virtude das características peculiares da planície, foi selecionada ao longo dos séculos a exploração extensiva da pecuária de corte em pasto nativo como a principal atividade econômica na região. A presença de grandes espelhos d'água principalmente no verão limita a área de pastejo do gado que associado à composição da flora forrageira do Pantanal, considerada de baixa qualidade impõe a necessidade de grandes áreas de pasto para o rebanho bovino da planície (Seidl et al. 1998).

No Pantanal são necessários em média 3,6 hectares para cada cabeça de gado, enquanto no cerrado do planalto adjacente a média é de um hectare para um ou até dois animais, durante todo o ano e dependendo do tipo de solo e qualidade da pastagem. Nestas condições, a bovinocultura de corte é desenvolvida. Embora apenas 12% das propriedades pantaneiras tenham área igual ou superior a 10.000 hectares, juntas abrangem 56% da área total do Pantanal. Propriedades com áreas de 1.000 a 10.000 hectares representam 69% das fazendas e abrangem 43% da área total (Cadavid Garcia 1986).

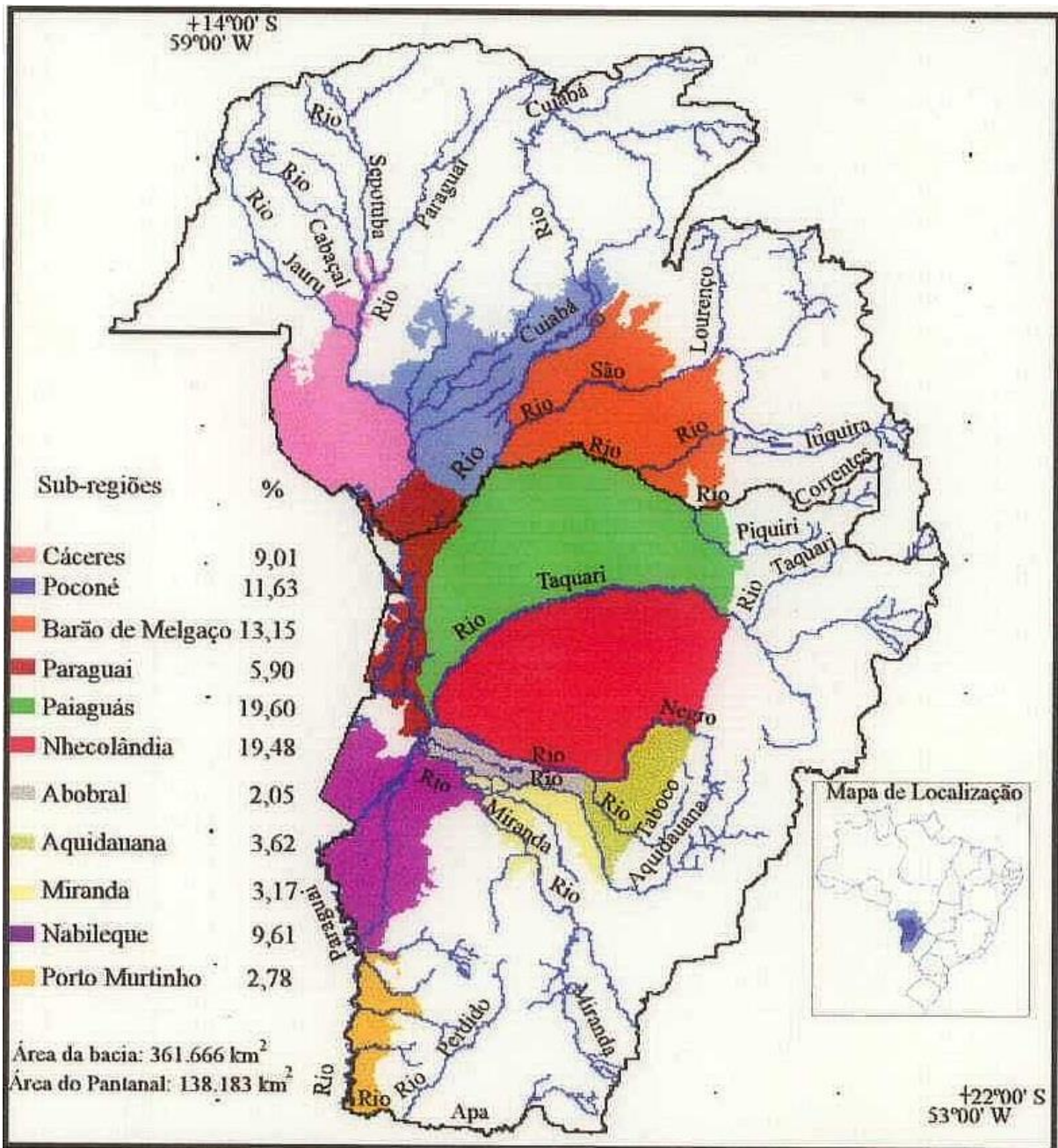


Figura 1.2 – Sub-regiões do Pantanal de MS (Silva & Abdon 1998).

#### **1.4.1 Avifauna de hábitos migratórios**

Periodicamente o Brasil é visitado por milhares de aves que realizam movimentos sazonais entre América do Norte e América do Sul (Sick 1983; Morrison et al. 1989; Chesser 1994). Dentre as espécies que são registradas em território nacional, destacam-se aquelas que migram com a proximidade do inverno no hemisfério norte, chamado inverno boreal que ocorre de dezembro a março (Antas 1994). Estas aves são consideradas as grandes migrantes em virtude das grandes distâncias percorridas entre os pontos de reprodução no Ártico até o Brasil. Para alcançar a Patagônia, ponto principal de concentração dessas aves, entram pelo país pela costa atlântica e pela Amazônia, cruzando a região central da América do Sul através do Pantanal (Sick 1983).

As espécies migrantes vêm ao Brasil à procura de locais de invernada, onde encontrarão alimentação farta, propiciando-lhes a continuidade do seu ciclo de vida (Telino-Junior et al. 2003). Do estado do Amapá (AP) ao RS são encontrados vários locais de invernada, os quais são de extrema importância para conservação e manutenção destas espécies, entre eles a Ilha de Campechá no estado do Maranhão (MA), a Lagoa do Peixe no RS, a Coroa do Avião em PE e o Pantanal em MT e MS (Sick 1983; Sick 1997; Azevedo et al. 2001; Brasil 2003; Telino-Junior et al. 2003; Nunes & Tomás 2004).

O Pantanal, em sua complexidade ecológica, alberga uma das maiores e mais ricas concentrações de aves do planeta, especialmente as aquáticas, mais adaptadas às condições ambientais da planície (Ravazzani et al. 1990).

Em revisão e atualização da listagem de espécies registradas na região foi reportada a ocorrência de espécimes identificados a 470 espécies com 133 de hábitos migratórios (Mauro & Tomás 1994; Tubelis & Tomás 2002; Nunes & Tomás 2004). As espécies migrantes observadas no Pantanal apresentam-se taxonomicamente distribuídas em 32 famílias de distintas ordens, contudo 48% destas espécies estão classificadas à ordem Passeriformes.

Entre as famílias mais abundantes, 25,5% das espécies foram identificadas a Tyrannidae, 12% Scolopacidae e 9% Anatidae. (Sick 1997). De acordo com hábito migratório, das 133 espécies migrantes catalogadas no Pantanal, 34 são migrantes

de longa distância setentrionais, oriundas do extremo norte do continente americano como *Anas cyanoptera* e *Pandion haliaetus*, respectivamente conhecidas como marreca-carijó e águia pescadeira, 24 migrantes de longa distância meridionais, oriundas do extremo sul da América do Sul como *Anas versicolor* e *Callonetta leucophrys*, respectivamente conhecidas como marreca-cri-cri e marreca-de-coleira, 34 migrantes do sul do continente americano, oriundas de países como Uruguai e Argentina como *Bubulcus ibis* e *Mycteria americana*, respectivamente conhecidas como garça-vaqueira e cabeça-seca e 41 oriundas de deslocamentos regionais dentro do Brasil como *Myiozetetes cayanensis*, *Rynchops niger* e *Himantopus melanurus* (Nunes & Tomás 2004), respectivamente conhecidas como bentevizinho, talha-mar e pernilongo.

#### 1.4.2 Fauna de culicídeos

Com relação às populações de culicídeos encontradas em MS, em um estudo realizado para se avaliar a riqueza e abundância de culicídeos em uma área impactada do estado, foram capturados espécimes adultos identificados a 86 espécies, demonstrando que a área de estudo apresenta relativa riqueza com presença de espécies consideradas potenciais vetores de arbovírus (Gomes et al. 2007).

No Pantanal de MT, em estudo realizado com objetivo de se avaliar o hábito alimentar dos mosquitos, a presença de sangue de aves foi detectada em 35% das amostras reagentes ao teste de precipitina, sangue de roedores em 22%, sangue humano em 9% e sangue equino em 8%. As espécies *Mansonia titillans*, *Culex nigripalpus*, *Aedeomyia squamipennis* e *Psorophora albigena* foram respectivamente as mais frequentes e reagiram para todos os anti-soros utilizados, demonstrando ecletismo alimentar. Os anofelinos identificados neste estudo, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles mattogrossensis* e *Anopheles triannulatus* demonstraram um comportamento essencialmente zoofílico, não tendo sido identificada nestes, a presença de sangue humano (Alencar et al. 2005).

Em relação aos cavalos e humanos, cada um teve seu sangue detectado em oito espécies de culicídeos, sendo que *Aedeomyia squamipennis*, *Culex nigripalpus*,



*Culex (Melanoconion) spp.*, *Mansonia indubitans*, *Mansonia titillans* e *Psorophora albigena* apresentaram vestígios de sangue destas duas espécies de vertebrados (Alencar et al. 2005). A detecção de sangue de aves em 35% dos culicídeos avaliados infunde relevância epidemiológica da região, uma vez que a ornitofilia de espécies como *Culex nigripalpus* favorece a veiculação de arbovírus entre aves silvestres, mamíferos domésticos e o homem (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). À exceção de *Aedeomyia*, todos os outros gêneros supracitados já foram relacionados, mediante comprovação de infecção natural ou evidências epidemiológicas, à transmissão de arbovírus (Forattini 1965).

Em 2007, em estudo realizado na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de MS foram capturados e coletados espécimes de culicídeos identificados a 22 espécies. Cinco espécies foram identificadas entre os exemplares coletados durante hematofagia em equinos, 18 durante hematofagia em membros da equipe de investigação, sete através de captura com armadilha luminosa tipo CDC e 11 com barraca de Shannon. A identificação de *Psorophora albigena* em mais de 50% dos espécimes capturados e coletados no mês de fevereiro e a sua ausência entre os exemplares identificados em novembro sugerem complexidade ecológica da sub-região, inferindo a necessidade e importância da entomologia de culicídeos no estudo das arboviroses no Pantanal (Pauvolid-Corrêa et al. 2010).

#### **1.4.3 Cavalos Pantaneiros**

Diversas pesquisas para circulação de arbovírus em equinos foram desenvolvidas no Brasil, principalmente através de inquéritos sorológicos (Travassos et al. 1961; Bruno-Lobo et al. 1961; Causey et al. 1962; Shope et al. 1964; Lopes & Sacchetta 1974). Entre os mais recentes trabalhos envolvendo a pesquisa de arbovírus em equinos no Brasil, estão Iversson et al. (1993) e Pauvolid-Corrêa et al. (2010b) avaliando animais no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Fernández et al. (2000) no PR e Rodrigues et al. (2010) na Amazônia.

No Pantanal estima-se que convivam cerca de 120 mil equinos (Santos et al. 1995) e mais três milhões de bovinos distribuídos em mais de mil fazendas que variam entre 1.000 a 25.000 hectares (Cadavid Garcia 1986; Seidl et al. 1998;

Santos et al. 2005). O Cavalo Pantaneiro, a principal raça de equinos encontrada na região, é um fator de importância econômica e social no Pantanal, a adaptação às condições ecológicas da região atribuída a um processo de seleção quase natural ao longo de dois séculos de colonização permitiu a estes animais a expressão de características como rusticidade e resistência fundamentais para o manejo da bovinocultura extensiva pantaneira (Sereno et al. 1996; Miserani et al. 2002).

As práticas de manejo do rebanho equino no Pantanal, especialmente manejo sanitário, podem estar aquém das tecnicamente recomendáveis devido às grandes extensões e condições peculiares da região (Cadavid Garcia 1986). Na maioria das fazendas não existem internadas exclusivas para os cavalos e os animais são mantidos juntamente com os animais silvestres e bovinos em pastagens nativas (Santos et al. 1993).

Em 1992, um estudo sobre arboviroses realizado com 432 equinos no Pantanal em MS identificou uma soroprevalência de 1,2% para WEEV, 6,7% para EEEV, 26,6% para ILHV, 28,2% para o vírus Maguari (*Maguari virus* ou MAGV) e 15,7% para o vírus Tacaiuma (*Tacaiuma virus* ou TCMV) (Iversson et al. 1993). Em 2007, em inquérito sorológico semelhante realizado na mesma Sub-região da Nhecolândia com 135 equinos não vacinados para encefalite viral, foi identificada soropositividade para WEEV em 41,7% dos animais, EEEV em 56,6%, SLEV em 40% e ausência de soropositividade para MAYV (Pauvolid-Corrêa et al. 2010b). Quanto à vacinação dos animais pantaneiros, em estudo baseado em inquéritos com proprietários de cavalos, realizado em 1989, 1990 e 1991, verificou-se que a profilaxia através de vacinações contra encefalite, garrotilho e raiva, era feita por 80, 73 e 60% dos produtores questionados, respectivamente (Santos et al. 1995).

#### **1.4.4 Crocodilianos do Pantanal**

A ordem Crocodylia no Brasil é representada pelas espécies *Paleosuchus palpebrosus*, *Caiman yacare*, *Caiman crocodilus*, *Caiman latirostris*, *Paleosuchus trigonatus* e *Melanosuchus Niger* identificadas à família Alligatoridae e respectivamente conhecidas como jacarépaguá, jacaré-do-pantanal, jacaretinga,

jacaré-de-papo-amarelo, jacaré-coroa e jacaré-açu (Rebelo & Lugli 2001; Campos 2003; Campos & Mourão 2004; Mourão & Campos 2004; Campos et al. 2007).

No Pantanal, apesar de alguns registros da ocorrência de jacarepaguá no entorno da planície, o jacaré-do-pantanal é a espécie de maior ocorrência e está amplamente distribuída em todas as sub-regiões pantaneiras (Breyer 1987; Campos et al. 2004; Campos et al. 2007). Em virtude da variedade de macro ambientes da região, espécimes identificados a esta espécie podem ser encontrados em uma grande diversidade de ambientes aquáticos e terrestres característicos da região, como as lagoas de água doce e salobra, os rios intermitentes e permanentes e em áreas de campo e cerrado cujas proporções e estabilidade são variáveis entre as sub-regiões e a época do ano (Santos 1997; Campos et al. 2003).

Diversos estudos vêm sendo realizados acerca das características fisiológicas, nutricionais, comportamentais e biológicas da espécie contribuindo de forma significativa para a sua conservação no Pantanal (Campos et al. 2004; Campos et al. 2005; Coutinho et al. 2005). Entretanto, o estudo das doenças infecciosas e parasitárias em indivíduos identificados a esta espécie ainda são escassos. À exceção de alguns trabalhos envolvendo a protozoologia e raros a virologia, aspectos sobre a circulação de arbovírus em jacarés-do-Pantanal são desconhecidos (Aquino-Shuster & Duszynski 1989; Ramos et al. 2002; Lima & Silva 2004; Viana & Marques 2005).

Apesar de escasso o estudo das infecções virais em indivíduos identificados a esta espécie, diversos trabalhos envolvendo a virologia em outras espécies de crocodilianos vêm sendo reportados. A circulação e até mesmo epizootias atribuídas a partículas virais identificadas a família *Poxviridae* vêm sendo registradas por todo o mundo em fazendas de criação de crocodilianos (Jacobson et al. 1979; Pandey et al. 1990; Penrith et al. 1991; Huchzermeyer et al. 1991; Buenviaje et al. 1998).

Além de *Poxviridae*, a detecção de espécies de outras famílias como *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Herpesviridae* também vêm sendo reportada em crocodilianos através de detecção de ácido nucléico, isolamento viral ou evidências sorológicas (Nir et al. 1969; McCowan et al. 2004; Govett et al. 2005; Davis & Spackman 2008).

Após a deflagração de sucessivas epizootias e epidemias por WNV em território norte-americano a partir do final da década de 1990, alguns trabalhos têm demonstrado a circulação de WNV em crocodilianos (Miller et al. 2003; Steinman et al., 2003; Jacobson et al. 2005). Em estudo realizado nos EUA em 2003, a exposição experimental por via parenteral e enteral de espécimes jovens de *Alligator mississippiensis* WNV demonstrou que a grande maioria dos animais apresentou uma viremia durante de um a oito dias, considerada suficiente para infecção do principal culicídeo vetor de WNV no sudeste daquele país. Este achado sugere participação de animais jovens no ciclo de WNV nos EUA, principalmente em áreas de alta densidade populacional desta espécie de crocodiliano (Klenk et al. 2004).

#### **1.4.5 Atividade e circulação humana no Pantanal de MS**

Apesar da Sub-região da Nhecolândia apresentar a segunda maior área do Pantanal com 27.000 km<sup>2</sup> e ser considerada a maior e mais diversa área de lagos subtropicais do mundo com aproximadamente 10.000 lagos (Silva & Abdon 1998, Almeida et al. 2011) a sub-região apresenta uma baixa densidade demográfica. No último censo realizado em 2010, a população era de aproximadamente 22.500 pessoas (IBGE 2012). Entretanto, em anos recentes MS vem ganhando notoriedade por seu significativo potencial turístico, sobretudo, no segmento do ecoturismo, dada à exuberância de suas riquezas naturais. Pelo menos 40% dos atrativos turísticos do estado são naturais e ecológicos (SEPLANCT 2003). Em 2005, MS recebeu 519.752 turistas, representando um aumento de 23,9% em relação ao ano anterior e quase dez pontos percentuais acima do incremento médio nacional no mesmo período, que foi de 12,5% (Silveira 2006; Júnior 2006). Estes números demonstram que o turismo em MS está crescendo gradativamente, com destaque para Bonito, Campo Grande e Corumbá. O Pantanal localizado na região de Corumbá é uma das regiões consideradas prioritárias para o desenvolvimento da atividade turística segundo o Programa de Regionalização do Turismo-Roteiros do Brasil e é a região que mais recebe turistas no MS, tendo a pesca como a principal atividade turística. Em 2000, a cerca de 380.600 turistas visitaram Corumbá em busca do Pantanal (Oliveira et al 2009).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Regiões como o Pantanal que recebem populações de aves migratórias e apresentam condições ambientais e climáticas favoráveis à proliferação de artrópodes hematófagos estão susceptíveis à circulação de arbovírus (Pauvolid-Corrêa & Varella 2008). Ao deslocamento de aves migratórias se atribui a disseminação de WNV pelo hemisfério oeste (Rappole et al. 2000). Focos de infecção por WNV têm sido reportados não só em áreas urbanas, mas principalmente em ecossistemas úmidos, como deltas de rios e planícies inundáveis, sobretudo na Europa como descrito na França (Joubert et al. 1970), Romênia (Tsai et al. 1998), Itália (Autorino et al. 2002) e Grécia (Danis et al. 2011). Em 2010, a segunda maior epidemia por WNV na Europa ocorreu na região central da Macedônia, onde estão localizados 70% das áreas úmidas do país. A região também abriga a maior concentração de aves migratórias da Grécia (Danis et al. 1970). Na América do Sul, evidências sorológicas da circulação de WNV na Venezuela foram encontradas em maior prevalência em áreas de vales e região dos Llanos (Bosch et al. 2007).

Relatos recentes de doença clínica humana por WNV na Argentina associada ao isolamento viral em equinos clinicamente doentes no mesmo país, além das evidências sorológicas da circulação de WNV em equinos e aves na Colômbia, Venezuela e Argentina respectivamente sugerem disseminação e manutenção de WNV em território sul-americano (Mattar et al. 2005; Morales-Betoulle et al. 2006; Morales et al. 2006; Bosch et al. 2007; Diaz et al. 2008; Artsob et al. 2010).

A identificação no Pantanal de diversas espécies de culicídeos previamente reportadas como vetores de arbovírus com características antropofílicas associada à movimentação de populações de aves migratórias e às evidências sorológicas em equinos da região da circulação de arbovírus, incluindo elevada prevalência de anticorpos neutralizantes para SLEV, flavivírus antígenicamente relacionado à WNV, sugerem o Pantanal como uma importante área para a investigação da circulação de arbovírus no Brasil (Iversson et al. 1993; Nunes & Tomás 2004; Pauvolid-Corrêa et al. 2010, 2010b).

O recente isolamento de SLEV de um paciente humano clinicamente doente em território brasileiro (Rocco et al. 2005) associado a recente detecção de 40% de soroprevalência para SLEV em equinos na Sub-região da Nhecolândia (Pauvolid-Corrêa et al. 2010b) reitera a necessidade e importância de medidas de vigilância epidemiológica, como a manutenção de inquéritos sorológicos em populações humanas e animais, no monitoramento da circulação deste arbovírus no Brasil.

Recentes relatos de infecção humana clínica por flavivírus como o ILHV no Equador e Bolívia e, principalmente, a confirmação recente de um caso grave de infecção humana por CPCV alertam para a importância da constante vigilância para a circulação de outros flavivírus, que podem estar sendo mantidos em ciclos de transmissão enzoóticos silenciosos no país (Johnson et al. 2007; Batista et al. 2011; Venegas et al. 2012).

A suspeita de participação de crocodilianos em ciclos de transmissão de WNV nos EUA associada a alguns fatores como alta prevalência deste grupo de animais na região do Pantanal e a escassez de dados epizootiológicos acerca dos crocodilianos da região, justificam a investigação para a circulação de arbovírus neste grupo de animais no Pantanal.

Por fim, considerando as características ecológicas do Pantanal, que fazem da região uma área de alta susceptibilidade à circulação enzoótica de arbovírus, associada à visita anual de milhares de pessoas, principalmente em virtude do turismo da pesca (Oliveira et al. 2009), o estudo de arbovírus na região pantaneira contribui não só para a atualização do conhecimento científico sobre os arbovírus circulantes na região, como também para o monitoramento das arboviroses em território nacional e eventual circulação de arbovírus não previamente detectados no país.

Desta forma, considerando que ainda não existem relatos de infecção humana por NJLV e que CXFV é um flavivírus específico de insetos (Karabatsos 1985, Hoshino et al. 2007), no presente estudo 12 flavivírus, incluindo WNV e todos os 11 flavivírus que circulam no Brasil previamente associados à infecção humana, clínica ou não, foram pesquisados por técnicas moleculares e sorológicas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Investigar a circulação de WNV e outros flavivírus no Pantanal de MS.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Buscar em populações de equídeos, ovinos e crocodilianos, evidências sorológicas da circulação de WNV e de outros 11 flavivírus na região do Pantanal de MS.
- Detectar em populações de crocodilianos, culicídeos e ixodídeos, através de métodos moleculares, a circulação de flavivírus no Pantanal de MS.
- Isolar arbovírus de populações de crocodilianos, culicídeos e ixodídeos do Pantanal de MS.
- Contribuir para o conhecimento sobre a fauna de culicídeos e ixodídeos do Pantanal de MS.
- Contribuir para o sistema de vigilância da circulação de arbovírus no Brasil.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

O presente estudo foi desenvolvido pelo Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz e referência macrorregional de dengue e febre amarela da Fundação Oswaldo Cruz (LABFLA) e contou com apoio e participação de quatro outras instituições de pesquisa. O trabalho de campo foi realizado pelo LABFLA com o apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Embrapa Pantanal). As identificações das amostras de ixodídeos e culicídeos foram realizadas respectivamente pelo Laboratório de Biodiversidade Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz e referência nacional em vetores das riquetsioses da Fundação Oswaldo Cruz (LABE) e pelo LABFLA. As análises do material foram realizadas em parte no LABFLA, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), no Instituto Nacional de Enfermidades Virales Humanas “Dr Julio Maiztegui” (INEVH), Argentina e no Centers for Disease Control and Prevention (CDC), EUA.

#### **3.2 AUTORIZAÇÕES E LICENÇAS**

##### **3.2.1 Licença do comitê de ética no uso de animais**

O projeto de tese foi submetido e aprovado pelo comitê de ética no uso de animais, vice-presidência de pesquisa e laboratórios de referência da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde para o uso científico no uso de animais. Licença LW-1/12, protocolo P-74/10-5 (Anexo A).

##### **3.2.2 Autorização do sistema de autorização e informação em biodiversidade**

O plano de coletas e capturas de crocodilianos e artrópodes foi submetido e autorizado pelo sistema de autorização e informação em biodiversidade, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente



(MMA) para capturas, coletas e manuseio de fauna silvestre in situ. Autorização para atividades com finalidade científica N° 18363-1 e N° 18363-2 (Anexo B, C).

### **3.2.3 Licença de exportação de parte das amostras para Argentina**

A exportação de parte das amostras de soro de crocodiliano e de artrópodes para o INEVH, Pergamino, Buenos Aires, Argentina foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), MMA. Licença de exportação N° 09BR003279/DF, CITES selo 516939 e Licença de exportação N° 09BR002829/DF (Anexo D, E).

### **3.2.4 Licença de exportação de parte das amostras para os EUA**

A exportação de parte das amostras de soro de crocodiliano e de artrópodes para o CDC, Fort Collins, Colorado, Estados Unidos foi autorizada pelo IBAMA, MMA. Licença de exportação N° 11BR005933/DF, CITES selo 518904 e licença de exportação N° 11BR005932/DF (Anexo F, G).

### **3.2.5 Autorização de exportação de todas as amostras**

As exportações de alíquotas de todas as amostras de soro equino, ovino, crocodiliano e de artrópodes para a Argentina e Estados Unidos foram autorizadas pelo serviço de defesa sanitária agropecuária, departamento de saúde animal, secretaria de defesa agropecuária, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento através de emissão de certificado zoosanitário internacional pelo serviços e seções de gestão da vigilância agropecuária.

### **3.2.6 Autorização das fazendas para as coletas de sangue**

As coletas de sangue dos animais de algumas propriedades visitadas foram agendadas pela pesquisadora Márcia Furlan Nogueira da Embrapa Pantanal após contato prévio com os proprietários ou encarregados destas propriedades. O principal objetivo destas coletas de sangue era a obtenção de amostras de soro equino a serem utilizadas em um estudo para anemia infecciosa equina, desenvolvido pela pesquisadora.

Além disso, parte das amostras de soro ovino também foi coletada para ser utilizada em um estudo para brucelose ovina, desenvolvido pela pesquisadora Raquel Juliano Soares também da Embrapa Pantanal.

Ao final das coletas de sangue, alíquotas de soro de equinos e ovinos destas propriedades foram entregues, respectivamente, às pesquisadoras Márcia Furlan Nogueira e Raquel Juliano Soares e o restante utilizado no presente estudo.

Em algumas propriedades as coletas de sangue foram realizadas após contato direto do LABFLA com proprietários ou encarregados de cada propriedade (Anexo H).

Em todas as coletas houve participação de encarregados e funcionários das propriedades visitadas.

As coletas de sangue de crocodilianos foram realizadas com a participação da pesquisadora Zilca Campos da Embrapa Pantanal, nas propriedades em que a pesquisadora vem desenvolvendo estudos ecológicos sobre o jacaré-do-Pantanal.

### 3.3 METODOLOGIA DAS AMOSTRAGENS

#### 3.3.1 Amostragens

Todas as amostragens, incluindo coletas de sangue em populações de equídeos, ovinos e crocodilianos, bem como captura e coleta de culicídeos e ixodídeos foram conduzidas no município de Corumbá na Sub-região da Nhecolândia do Pantanal de MS (18°18' - 19°15'S, 57°05' - 55°24'W). Um total de 20 propriedades da região, denominadas de PA até PU, totalizando uma área de aproximadamente 3.150 km<sup>2</sup> foi amostrado. A propriedade PC da Embrapa Pantanal foi utilizada como base de apoio, área de amostragem e laboratório de campo durante todo o trabalho (Figuras 3.1, 3.2, 3.3).

Amostragens foram realizadas nos dois períodos ecologicamente distintos da região, no período das chuvas, entre dezembro e maio, caracterizado por presença de grandes áreas alagadas e índice pluviométrico elevado e também no período da seca, entre junho e novembro, caracterizado por grandes áreas secas e baixo índice pluviométrico. Cada propriedade foi amostrada em apenas um período do ano, com exceção para a propriedade PC em que amostragens de culicídeos foram realizadas nos dois períodos ecologicamente distintos.



Figura 3.1- Localização da área de estudo na América do Sul (Google Earth).



Figura 3.2- Localização da área de estudo no Brasil (Google Earth).



Figura 3.3- Localização das propriedades na área de estudo (Google Earth).



### 3.3.1.1 Coleta de sangue em população de equídeos

Em 2009 e 2010, em uma amostragem por conveniência foram coletadas amostras de sangue de 892 equídeos de 18 propriedades, totalizando uma área amostrada de aproximadamente 2.700 km<sup>2</sup>. As coletas foram realizadas nos dois períodos ecologicamente distintos da região, em fevereiro e outubro de 2009 e abril, setembro e outubro de 2010.

Em 2009, foram coletadas amostras de sangue de equídeos em quatro propriedades em fevereiro e em dez propriedades em outubro. Em 2010, as amostragens foram conduzidas em outras quatro propriedades em abril, setembro e outubro (Quadro 3.1).

Durante as coletas de sangue, informações de cada animal acerca da espécie (equinos, asininos ou muares), raça, idade, pelagem, sexo, condição de doma, vacinação, evidências de sinais clínicos, histórico de doenças, viagens etc. eram obtidas com o encarregado responsável de cada propriedade através de questionário (Anexo I).

Dos 892 animais estudados, 849 (95,2%) eram equinos e 43 (4,8%) eram muares. Entre os muares, 26 (60,5%) eram mulas e 17 (39,5%) burros. Dos 849 equinos, 391 (46,1%) eram machos castrados, 368 (43,3%) éguas, 86 (10,1%) garanhões e quatro (0,5%) animais não tiveram sexo registrado (Figura 3.4).

Com relação à idade dos animais, 336 (37,7%) animais não tinham qualquer registro de idade e 556 (62,3%) tinham a data ou ao menos o ano de nascimento. Entre os animais com idade conhecida no momento da venopunção, 103 (18,5%) tinham de 10 meses até dois anos, 173 (31,1%) de três a cinco anos e 280 (50,4%) com seis ou mais anos (Figura 3.5).

Quadro 3.1 – Distribuição das coletas de sangue por mês e propriedade.

Mês de coleta	Número de equídeos coletados	Propriedades amostradas
Fevereiro 2009	168	PA, PB, PE e PF
Outubro 2009	499	PH, PM, PL, PP, PN, PS, PQ, PR, PI e PJ
Abril 2010	85	PG
Setembro/Outubro 2010	140	PC, PD e PO
Total	892	PA, PB, PC, PD, PE, PF, PG, PH, PI, PJ, PL, PM, PN, PO, PP, PQ, PR, PS

Em relação às raças dos 849 equinos, 471 (55,5%) eram mestiços, 292 (34,4%) eram da raça Cavalão Pantaneiro e 86 (10,1%) Quarto de Milha (Figura 3.6).

Sobre a condição de doma dos 849 equinos, 570 (67,1%) eram domados, 234 (27,6%) não domados, 44 (5,2%) eram considerados redomão, isto é, estavam em processo de doma durante a amostragem e um (0,1%) animal não tinha sua condição de doma anotada (Figura 3.7) (Fotos 3.1, 3.2, 3.3).

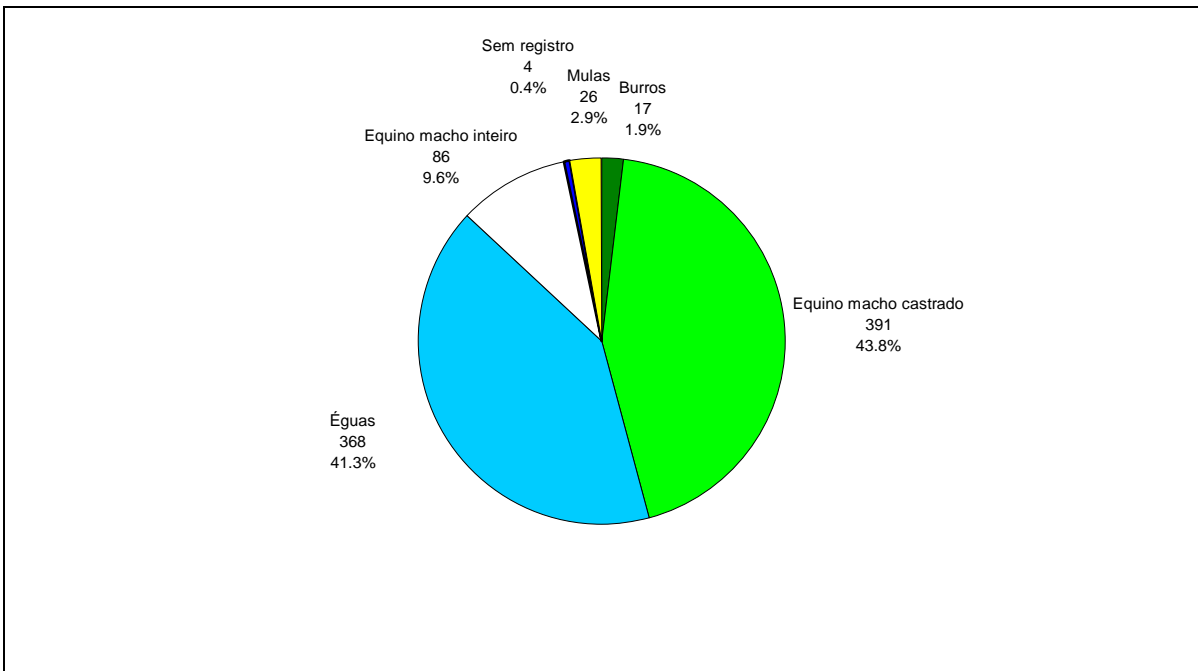


Figura 3.4– Distribuição por sexo e espécie dos equídeos amostrados.

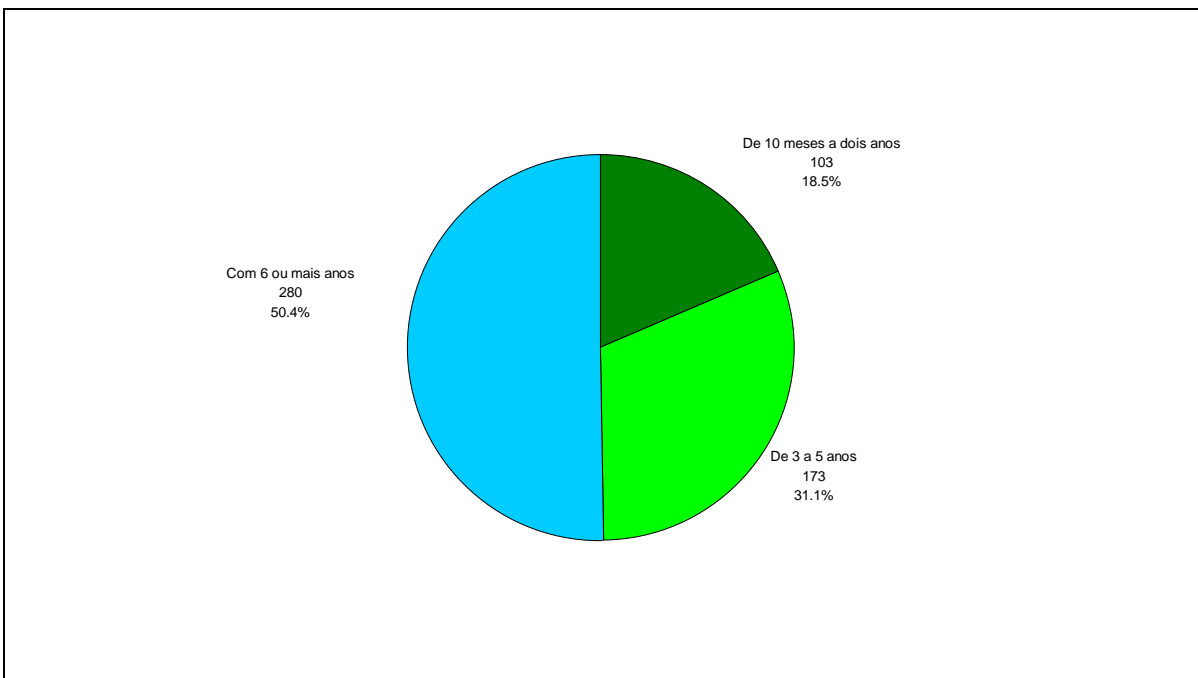


Figura 3.5 – Distribuição por idade dos equídeos com registro de idade.

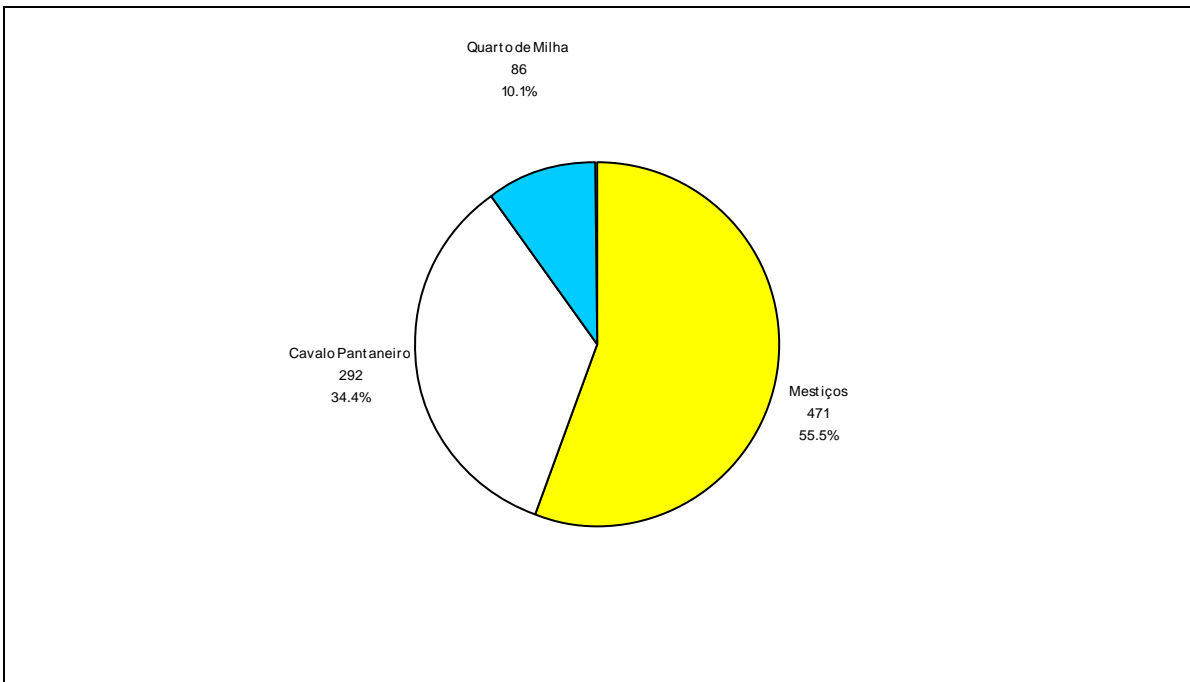


Figura 3.6 – Distribuição por raças dos equinos.

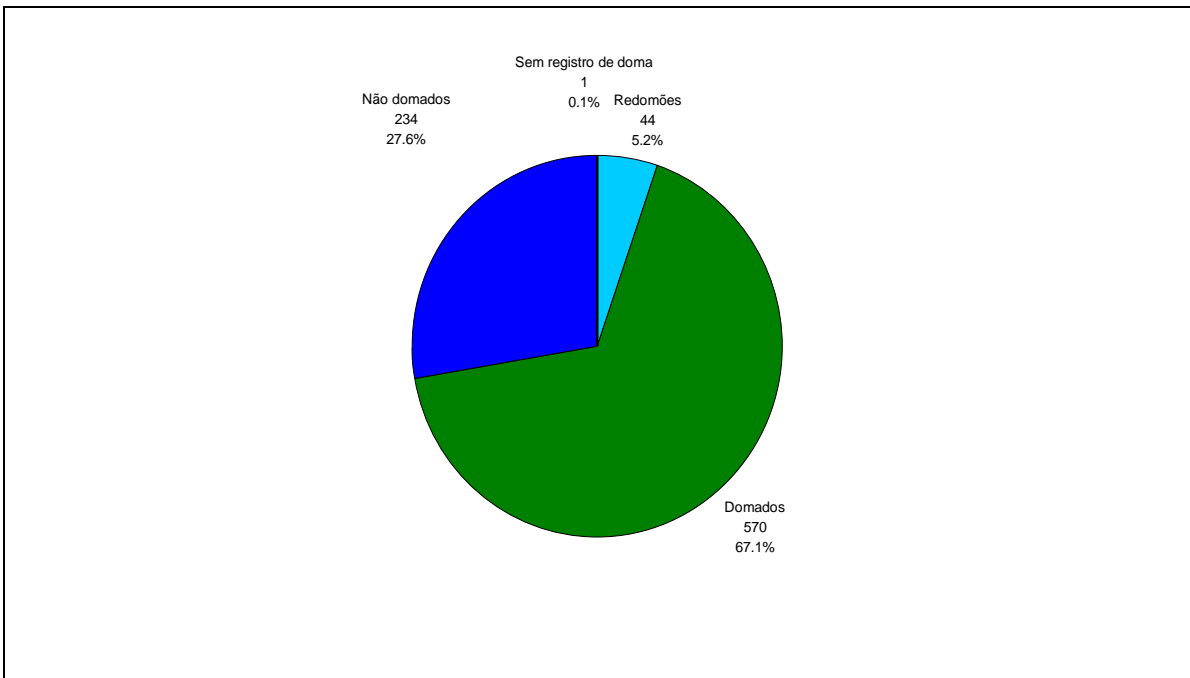


Figura 3.7 – Distribuição por condição de doma dos equinos.





Foto 3.1 – Equinos domados da propriedade PN após a coleta de sangue no Pantanal de MS em 2009. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa



Foto 3.2 – Coleta de sangue em equino não domado da propriedade PR no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.



Foto 3.3 – Coleta de sangue em equino domado na propriedade PG no Pantanal de MS em 2010. Foto: Propriedade PG.

Embora não tenham sido realizados exames clínicos nos animais submetidos à venopunção, à exceção de um equino encontrado doente e apresentando um quadro de desordem neurológica de origem desconhecida (Foto 3.4), todos os animais amostrados estavam aparentemente hígidos no momento da venopunção.

Entretanto, muitos animais apresentavam lesões sugestivas de mordedura por morcego hematófago (Foto 3.5). Um equino em aparente boa condição corporal e sugestivo de morte recente foi encontrado em uma propriedade não amostrada. A causa da morte não foi determinada (Foto 3.6).

Após assepsia com gaze embebida em álcool iodado no local da venopunção, oito mililitros de sangue total em tubo sem anticoagulante com gel separador eram coletados utilizando-se agulha 25X8 mm através de sistema a vácuo. Após a coleta e leve compressão no local da venopunção, um medicamento comercial de propriedade larvicida, repelente, cicatrizante, antisséptica e hemostática era aplicado ao local da venopunção antes da liberação dos animais.





Foto 3.4 – Equino doente apresentando quadro neurológico sem diagnóstico definido na propriedade PJ no Pantanal de MS em 2009. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



Foto 3.5 – Coleta de sangue em equino jovem não domado com lesão sugestiva de mordedura por morcego hematófago na propriedade PM no Pantanal de MS em 2009. Foto: Jorge UFMS.





Foto 3.6 – Equino encontrado morto por causa desconhecida em propriedade não amostrada no Pantanal de MS. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.

### 3.3.1.2 Coleta de sangue em população de ovinos

As coletas de sangue em ovinos foram realizadas em nove propriedades, totalizando uma área de aproximadamente 1.350 km<sup>2</sup>. Os animais foram coletados durante o período de seca na região. Um total de 238 animais com a maioria sem raça definida foi estudado, com 139 (58,4%) animais de sete propriedades em outubro de 2009 e 99 (41,6%) animais de duas propriedades em outubro de 2010. Dos 238 animais coletados, 183 (76,9%) eram fêmeas, seis (2,5%) eram machos castrados e 49 (20,6%) eram machos inteiros (Figura 3.8).

Em todas as propriedades os ovinos eram mantidos em criações extensivas ou semiextensivas. Nestes tipos de manejo no Pantanal, os animais compartilham o campo com equídeos, bovinos e com espécies silvestres (Foto 3.7). A maioria dos ovinos amostrados era animais sem raça definida, naturalizados do Pantanal, com exceção de alguns animais da raça Suffolk.

Para a coleta de sangue, os animais eram mantidos em estação e contidos fisicamente pelos trabalhadores rurais das fazendas (Foto 3.8). Após assepsia no local da venopunção com gaze embebida em álcool iodado, oito mililitros de sangue total eram venopuncionados através de veia jugular externa, com agulha 25X8 mm em tubos sem anticoagulante e com gel separador através de sistema a vácuo.

Alguns animais tinham parte dos pelos ao redor do pescoço cortados para facilitar o acesso às veias jugulares e após a coleta e leve compressão no local da venopunção, um medicamento comercial de propriedade larvicida, repelente, cicatrizante, antisséptica e hemostática era aplicado ao local da venopunção antes da liberação dos animais.

Durante as coletas de sangue, informações de cada animal acerca da idade, sexo, vacinação, evidências de sinais clínicos, viagens etc. eram obtidas com o encarregado responsável de cada propriedade.



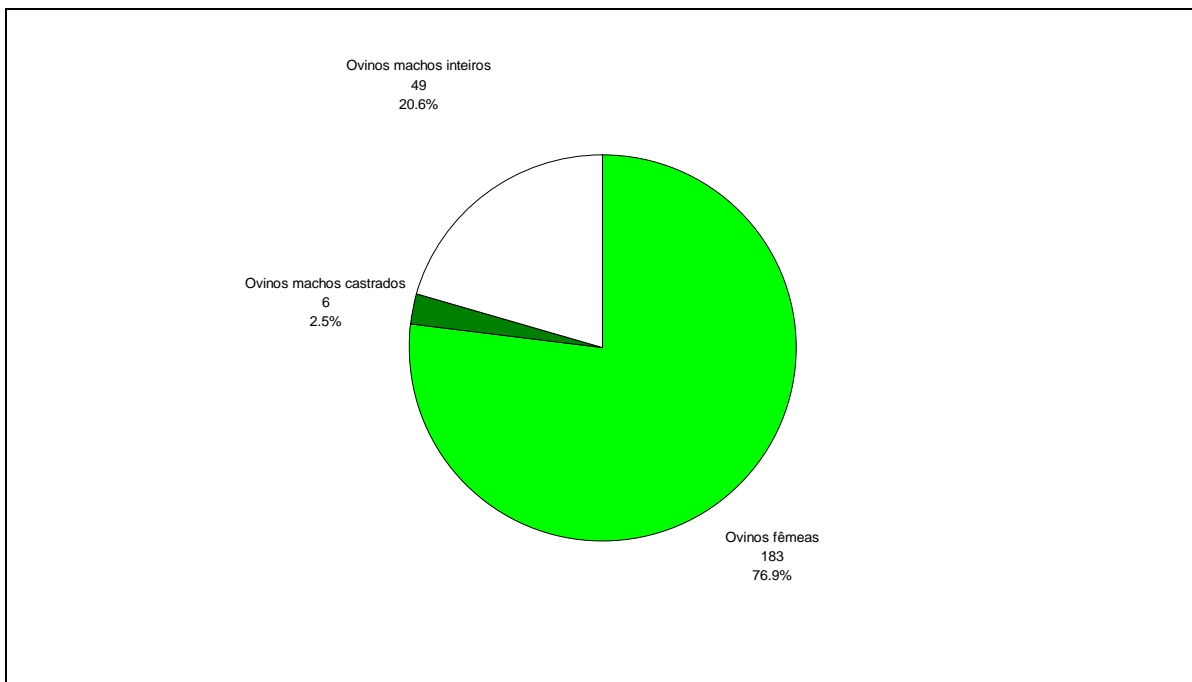


Figura 3.8 – Distribuição por sexo dos ovinos.



Foto 3.7 – Ovinos em criação semiextensiva na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



Foto 3.8 – Coleta de sangue em ovinos em criação semiextensiva na propriedade PS no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.

### 3.3.1.3 Coleta de sangue em população de crocodilianos

As coletas de sangue dos crocodilianos foram realizadas durante os procedimentos de captura realizados pela equipe da Dra. Zilca Campos, como parte dos estudos ecológicos da espécie *Caiman yacare*, popularmente conhecida como jacaré-do-Pantanal, desenvolvidos pela Embrapa Pantanal.

Animais jovens de aproximadamente até 1,5 m de comprimento foram preferidos e capturados em áreas de elevada concentração destes animais em duas propriedades da região (Foto 3.9). Animais foram capturados utilizando-se cambão quando observados em áreas de mata (Foto 3.10) ou a partir de canoas em ambientes lênticos formados por rios intermitentes (Foto 3.11), quando então eram levados às margens para o início dos procedimentos. Em área de trabalho montada à sombra, os animais eram mantidos com cambão (Foto 3.12) e tinham a boca e as pálpebras mantidas fechadas por fita adesiva plástica (Foto 3.13) para pesagem (Foto 3.14), morfometria, definição de sexo e marcação com anilha metálica em membrana interdigital de membro posterior esquerdo pelo grupo de estudo de crocodilianos da Embrapa Pantanal. Os animais uma vez amordaçados e com os olhos vendados se mantinham imóveis durante todo o procedimento não havendo necessidade de qualquer outro tipo de contenção além da física.

Ao final dos procedimentos realizados pela equipe da Embrapa Pantanal e após assepsia local com algodão embebido em álcool iodado, amostras de cinco mililitros de sangue total de cada animal foram coletadas através de agulha 25X8 mm em tubos sem anticoagulante através de sistema a vácuo. As venopunções foram realizadas a partir de veia jugular interna entre a primeira e segunda vértebra cervical como previamente descrito (Olson et al. 1975) (Foto 3.15).





Foto 3.9 – Área com alta concentração de jacarés-do-Pantanal escolhida para captura e coleta de sangue na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



Foto 3.10 – Jacaré-do-Pantanal observado em área de mata na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.





Foto 3.11 – Captura de jacarés-do-Pantanal em ambiente lântico na propriedade PU no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.



Foto 3.12 – Jacaré-do-Pantanal capturado na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.





Foto 3.13 – Jacaré-do-Pantanal capturado tendo as pálpebras fechadas por fita adesiva plástica na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.





Foto 3.14 – Jacaré-do-Pantanal sendo pesado pela equipe da Embrapa Pantanal na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.



Foto 3.15 – Coleta de sangue em jacaré-do-Pantanal na propriedade PD no Pantanal de MS em 2011. Foto: Zilca Campos.

Após leve compressão e assepsia local, os animais eram mantidos em observação por 10 minutos e depois soltos no local de captura. Todo o procedimento era realizado apenas com contenção física e durava até 20 minutos.

Um total de 90 animais silvestres da espécie jacaré-do-Pantanal foi amostrado, com oito (8,9%) em uma propriedade em outubro de 2009, durante a estação seca, e 82 (91,1%) em outra propriedade em fevereiro de 2009 e Janeiro de 2011 durante a estação das chuvas. A escolha pela captura de um maior número de animais durante a estação chuvosa é justificada pela maior emergência de culicídeos adultos observada durante este período o que poderia eventualmente aumentar as chances de detecção de animais em viremia.

Dos 90 animais venopuncionados, 67 (74,4%) eram machos e 23 (25,6%) eram fêmeas (Figura 3.9). O comprimento dos animais variou de 39,5 a 116 cm (média 91,6 cm) e o peso de 4 a 34 kg (média 16,8 kg).

#### 3.3.1.4 Acondicionamento das amostras de sangue

Após as coletas, todas as amostras de sangue de equinos, ovinos e crocodilianos foram identificadas e mantidas em caixas térmicas com gelo reciclável até a chegada à base de pesquisa. Após a separação dos elementos figurados por centrifugação em temperatura ambiente, os soros eram transferidos para criotubos de cinco mililitros e então congelados em nitrogênio líquido, até o envio para o LABFLA.

#### 3.3.1.5 Capturas e coletas de artrópodes

Um total de 4.514 artrópodes, com 4.445 culicídeos e 69 ixodídeos foi capturado e coletado em 15 propriedades, totalizando uma área amostrada de 2.400 km<sup>2</sup>. Para as capturas de culicídeos foram utilizadas armadilhas luminosas tipo CDC para captura de culicídeos no ambiente, e capturadores de Castro para a captura de culicídeos em equinos, crocodilianos, membros da equipe e em repouso em ambiente intradomiciliar.

A armadilha luminosa tipo CDC contém uma pequena lâmpada e um motor com hélice e é utilizada para a coleta de insetos em ambiente de pouca ou nenhuma luminosidade. Os insetos, machos e fêmeas, atraídos pela fonte luminosa são sugados pelo movimento da hélice e ficam presos em uma câmara fechada com tela. O capturador de Castro é um tubo de sucção constituído de um tubo de borracha ligado a um tubo de vidro. A abertura anterior do tubo de vidro é colocada sobre o inseto e é feita sucção suave, fechando-se depois a abertura com o dedo e transferindo-se os insetos para um frasco umidificado e ventilado (Marcondes 2001). O capturador de Castro foi utilizado para a captura de culicídeos, principalmente fêmeas durante hematofagia em equinos, crocodilianos e membros da equipe, e também para captura de culicídeos de ambos os sexos observados durante repouso em ambiente intradomiciliar. Os ixodídeos foram coletados manualmente de animais venopuncionados aleatoriamente escolhidos que se apresentavam parasitados no momento da venopunção.

#### **3.3.1.5.1 Culicídeos**

Os culicídeos foram capturados em áreas aleatoriamente selecionadas em nove propriedades visitadas para a coleta de sangue nos vertebrados, totalizando uma área amostrada de aproximadamente 1.580 km<sup>2</sup>. Das 72 capturas realizadas, 12 foram negativas, com nenhum espécime capturado. Entre as 60 capturas positivas, 36 (60%) foram conduzidas no período das chuvas e 24 (40%) no período da seca (Figura 3.10). Entre as 36 capturas realizadas no período das chuvas, 21 (58,3%) foram realizadas em fevereiro de 2009 e 15 (41,7%) em abril de 2010. Entre as 24 capturas realizadas durante o período da seca, 12 (50%) foram realizadas em outubro de 2009 e 12 (50%) em outubro de 2010 (Figura 3.11).

Entre as 60 capturas positivas, em 27 (45%) se utilizou armadilha luminosa tipo CDC, em 17 (28,3%) o capturador de Castro em membros da equipe, em dez (16,7%) se utilizou o capturador de Castro em cavalos, três (5%) o capturador de Castro em jacarés e em três (5%) se utilizou o capturador de Castro no ambiente intradomiciliar (Figura 3.12).



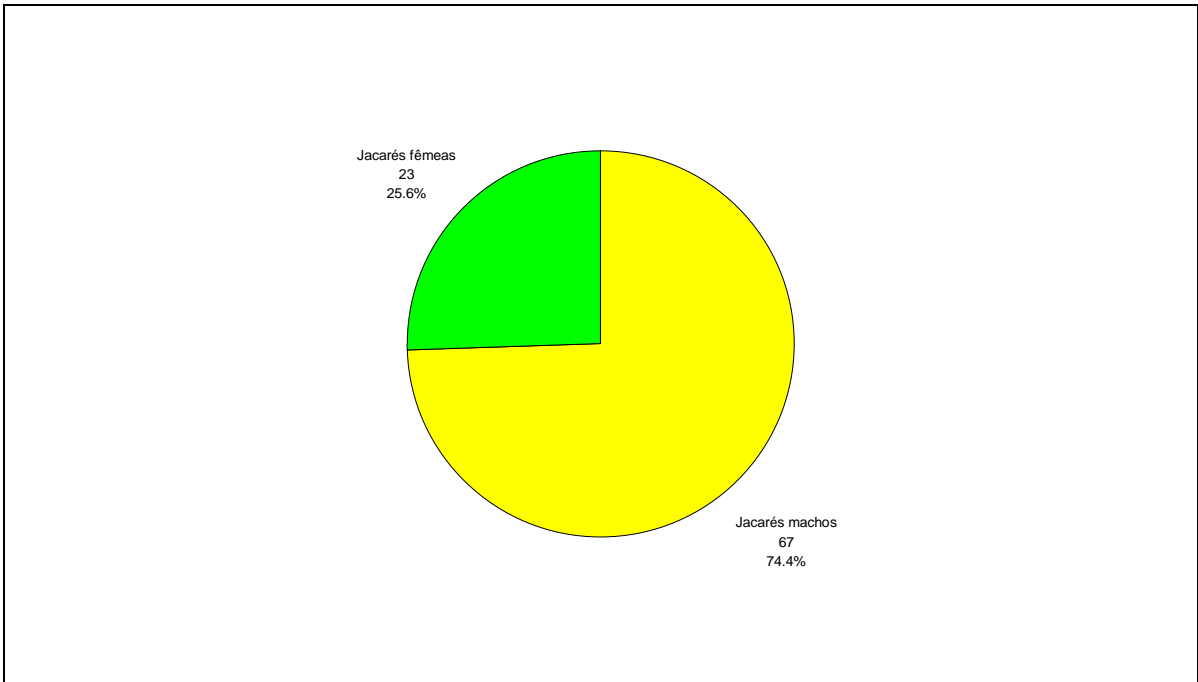


Figura 3.9 – Distribuição por sexo dos jacarés-do-Pantanal.

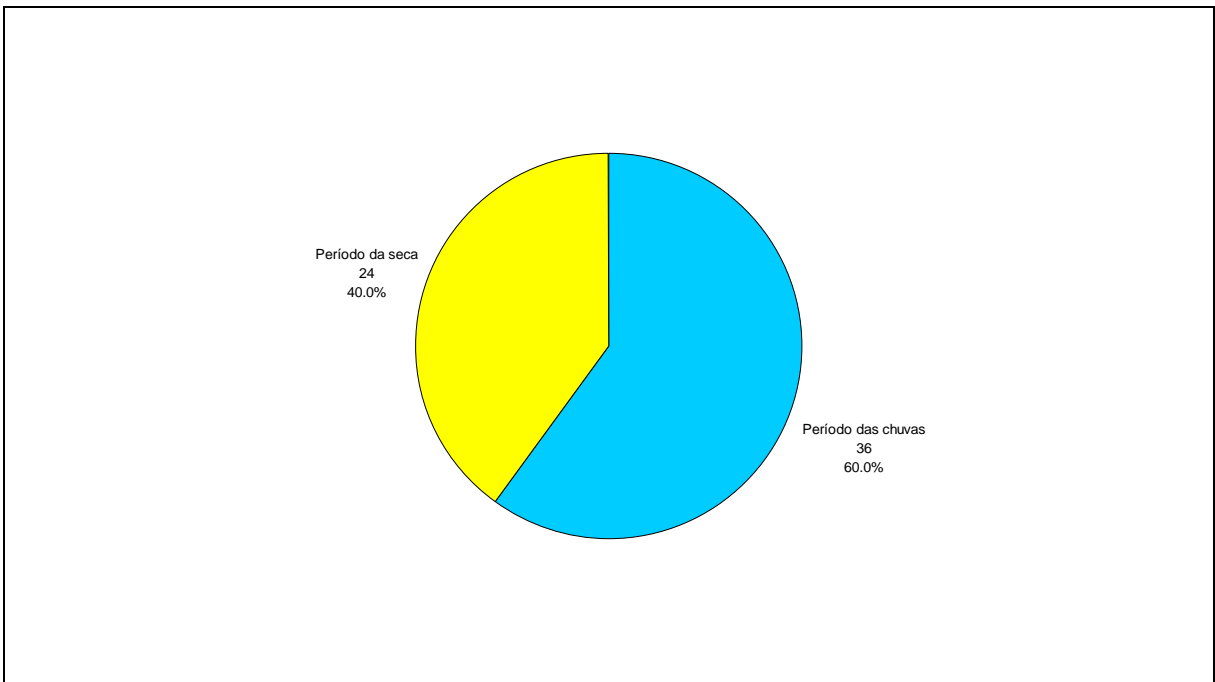


Figura 3.10 – Número de capturas de culicídeos por períodos ecologicamente distintos.

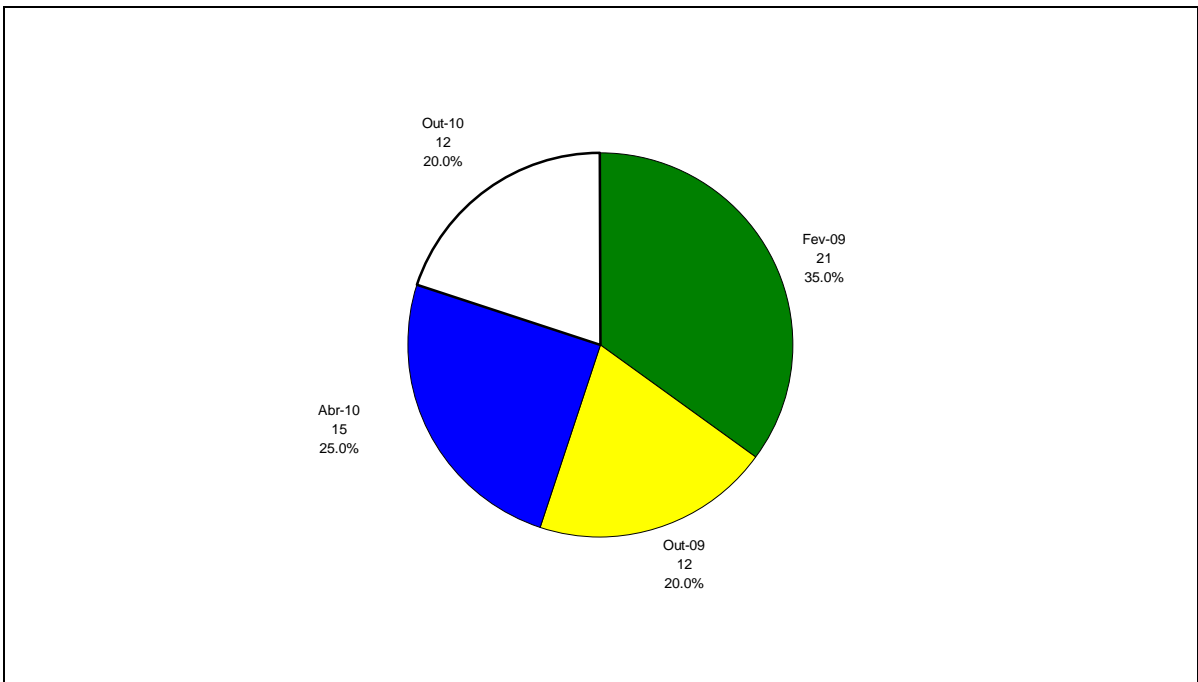


Figura 3.11 – Número de capturas de culicídeos por mês e ano.

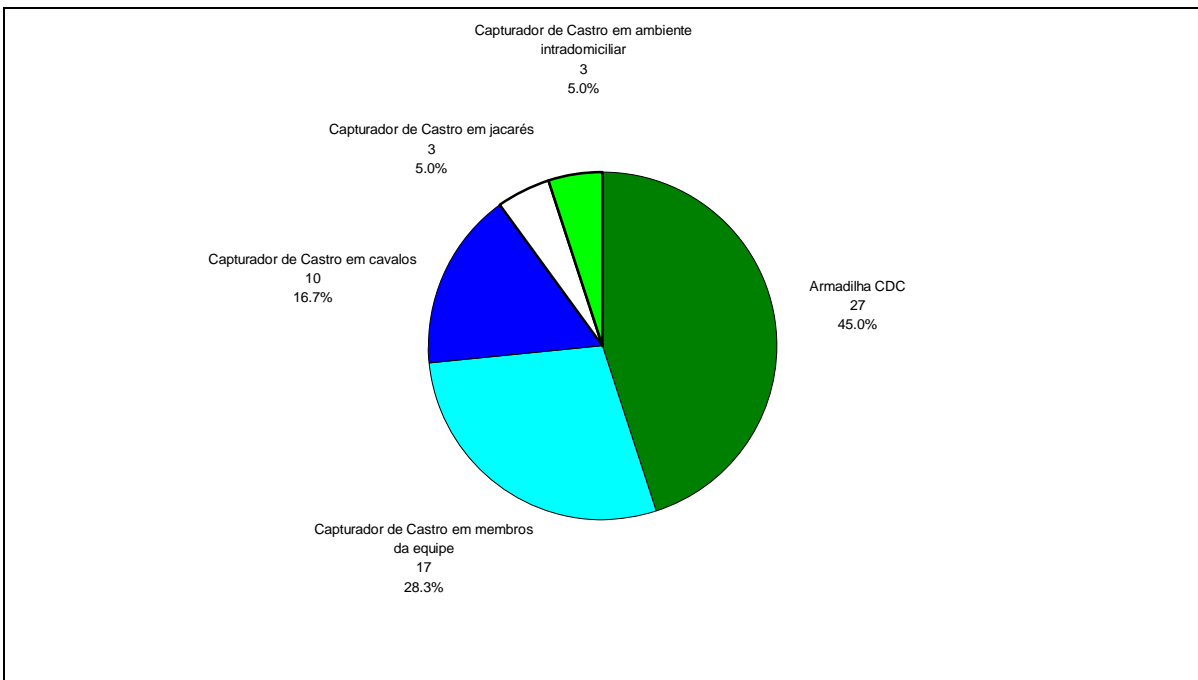


Figura 3.12 – Número de capturas por métodos utilizados.

Primariamente as capturas com armadilhas luminosas tipo CDC (Foto 3.16) foram realizadas em períodos noturnos de 12 horas, das 18h00min às 06h00min, e as capturas com capturador de Castro em equinos (Foto 3.17), membros da equipe (Foto 3.18) e crocodilianos (Foto 3.19) em sessões de 2h principalmente no período crepuscular, das 17h00min às 19h00min. Dependendo da quantidade de culicídeos observados durante a captura as sessões eram prolongadas. As três capturas utilizando-se capturador de Castro em ambiente intradomiciliar foram realizadas em uma das moradias de uma das propriedades em período vespertino em sessões de uma hora, entre 5h30min e 6h30min. As três capturas de culicídeos em crocodilianos foram realizadas em quatro animais, dois de uma propriedade e dois de outra, escolhidos aleatoriamente dentre os animais capturados para coleta de sangue. Os animais eram mantidos próximo à área de trabalho durante o período crepuscular das 17h00min às 19h00min e depois liberados. Durante as sessões eram capturados os culicídeos visualizados pousados no animal (Foto 3.17).

Os culicídeos adultos vivos capturados eram levados ao laboratório de campo onde eram imobilizados por resfriamento e identificados através de estereomicroscopia em placa refrigerada adaptada, por caracterização morfológica de acordo com chave dicotômica (Lane 1953; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Após identificação, os culicídeos foram agrupados em grupos de até 50 indivíduos de acordo com espécie, sexo, o tipo de captura, local, data e horário da amostragem e então congelados em nitrogênio líquido para envio ao LABFLA, onde foram mantidos a -70°C para posteriores análises.



Foto 3.16 – Armadilha luminosa tipo CDC na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.





Foto 3.17 – Mosquitos durante hematofagia em equino na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.



Foto 3.18 – Mosquitos sendo capturados durante hematofagia em membro da equipe na propriedade PC no Pantanal de MS em 2010. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



Foto 3.19 – Mosquitos sendo capturados durante hematofagia em jacaré-do-Pantanal na propriedade PU no Pantanal de MS em 2009. Foto: Dinair Couto-Lima.

### **3.3.1.5.2 Ixodídeos**

Os ixodídeos eram coletados apenas quando visualizados nos equídeos, ovinos e crocodilianos venopuncionados. Buscas ativas para captura de ixodídeos no ambiente não foram realizadas. Ixodídeos foram coletados em 28 equinos de nove propriedades visitadas e apenas um exemplar em um dos crocodilianos venopuncionados.

Após as coletas, os espécimes eram agrupados de acordo com o animal em que foram coletados, e então congelados em nitrogênio líquido para envio ao LABFLA e posterior identificação a ser realizada pelo LABE.

No LABE, a identificação específica dos aracnídeos foi realizada em placa refrigerada adaptada através de chave dicotômica para as famílias e gêneros americanos da ordem Ixodida e chave para determinação das espécies dos diferentes gêneros de ixodídeos existentes no Brasil, elaboradas por Aragão & Fonseca (1961). Após a identificação, o material foi novamente levado ao LABFLA onde foi mantido a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

## **3.4 ANÁLISES LABORATORIAIS**

Todas as etapas laboratoriais envolvendo manipulação celular, viral e das amostras biológicas compostas por soro sanguíneo de equinos, ovinos e de crocodilianos, bem como artrópodes foram realizadas com uso de barreiras de contenção primária através da utilização de equipamentos de proteção individual como jaleco, máscara, luvas e equipamentos de proteção coletiva como cabine de segurança biológica II Tipo B em Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB-2) e em Laboratório de Biossegurança 3 (NB-3) de contenção secundária.

### **3.4.1 Processamento das amostras**

#### **3.4.1.1 Trituração dos artrópodes**

Todas as amostras de artrópodes foram distribuídas no momento da identificação no campo em grupos de até 50 espécimes de culicídeos e até 10 espécimes de ixodídeos.

Entretanto, o número de espécimes por tubo precisou ser alterado de acordo com o tamanho e condição de ingurgitação dos espécimes. Para diminuir toxicidade nas culturas celulares, alguns grupos com grande número de espécimes maiores ou ingurgitados foram divididos em dois ou mais grupos no momento da trituração. Ao final, 388 grupos de culicídeos e 41 de ixodídeos foram submetidos ao isolamento viral em culturas de células C6/36.

##### **3.4.1.1.1 Culicídeos**

Um total de 83 grupos de culicídeos foi macerado utilizando-se pistilos e recipientes de louça estéreis, enquanto os 305 grupos restantes foram macerados através da utilização de esferas de cobre em agitador.

Para a utilização de pistilo, culicídeos eram macerados em 500  $\mu$ L de meio de maceração composto por PBS, 10% albumina bovina a 7.5% ou SFB, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100  $\mu$ g/mL] e Anfotericina B 1  $\mu$ g/mL. O volume final aproximado de 500  $\mu$ L de suspensão de macerado era então aspirado e mantido em duas alíquotas de 250  $\mu$ L a -70°C, para posterior utilização em isolamento viral e técnicas moleculares.

Para a utilização das esferas, os grupos de culicídeos eram transferidos a novos tubos contendo 1 mL de meio de trituração BA-1 acrescidos de mais L-Glutamina, antibióticos e antifúngicos para uma concentração final de penicilina [200 U/mL], estreptomicina [200  $\mu$ g/mL], Anfotericina B [2  $\mu$ g/mL] e L-Glutamina 2 mM.

A cada tubo era adicionado uma esfera de chumbo revestida em cobre (Premium Grade BBs airgun shot steel BB cal. 4.5 mm COPPERHEAD®). Após agitação em *vortex* por 5 minutos, os tubos eram centrifugados por 2min a 0°C. O sobrenadante era transferido para um novo e os dois tubos eram congelados para posterior isolamento viral e detecção molecular.

#### **3.4.1.1.2 Ixodídeos**

Em virtude das características anatômicas dos ixodídeos, todos os 41 grupos foram macerados com pistilos de louça ou vidro estéreis, utilizando-se 1 mL de diluente BA-1 acrescido de L-Glutamina, antibióticos e antifúngico como descrito para os culicídeos. As teleóginas tiveram o idiossoma previamente rompido com agulha estéril, antes da maceração. O produto triturado foi aspirado e mantido em tubos tipo eppendorff de 1,5 mL em congelador a -70°C, para posterior isolamento viral e detecção molecular.

### **3.4.2 Cultivos celulares**

A maioria dos arbovírus pode ser propagada em sistemas hospedeiros vivos representados por culturas de células (ATCC 1979). No presente estudo, para a realização das diferentes técnicas empregadas foram utilizados três diferentes tipos celulares. As linhagens celulares originadas de células renais de primata *Cercopithecus aethiops* (VERO) e de roedor *Mesocricetus auratus* (BHK-21), bem como de células de culicídeos *Aedes albopictus* (C6/36) (Stim 1969; White 1987).

As linhagens celulares utilizadas no presente estudo eram mantidas de acordo com as práticas de manutenção celular realizadas pelas instituições INEVH, FMRP, LABFLA e CDC, onde as amostras foram analisadas.

Brevemente, eram realizadas passagens semanais a fim de se manter condições bioquímicas ótimas para o desenvolvimento e manutenção da monocamada de células. Depois de retirado o meio de manutenção e após sucessivas lavagens da monocamada celular com solução salina fosfato

(*phosphate buffer saline* ou PBS), às garrafas era adicionada tripsina para desprendimento da monocamada celular (VERO E76, E6; BHK-21 clone 15). Após o uso da tripsina, a suspensão celular era utilizada ou descartada e novo meio de cultura acrescido de antibióticos e antifúngico com 10% de soro fetal bovino (SFB) era adicionado às garrafas, que eram então incubadas em estufa com controle de CO<sub>2</sub>, umidade e temperatura, que variava de acordo com a linhagem celular, com normalmente 5% CO<sub>2</sub> e 28°C para a C6/36 e 37°C para VERO e BHK-21. Alternativamente, em INEVH, a linhagem celular C6/36 havia sido adaptada e era mantida a 34°C para maior susceptibilidade celular à propagação por WNV.

### 3.4.3 Isolamento viral e teste de placas

Um total de 4.514 artrópodes, com 4.445 culicídeos e 69 ixodídeos respectivamente distribuídos em 388 e 41 grupos, além de 90 amostras de soro e 50 de coágulo de crocodilianos foram submetidos ao teste de placas em VERO e isolamento viral em C6/36 e VERO (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 – Número de amostras submetidas ao isolamento viral, teste de placas e métodos moleculares para detecção de arbovírus.

	Isolamento viral em VERO	Isolamento viral em C6/36	Teste de placas	RT-PCR convencional	RT-PCR tempo real
Soro de crocodilianos	30	60	60	30	60
Coágulo de crocodilianos	-	50	50	-	50
Culicídeos	-	388 grupos	305 grupos	Grupos positivos no isolamento viral	305 grupos
Ixodídeos	-	41 grupos	41 grupos	-	41 grupos

(-) Não submetidos ao método relacionado.



### 3.4.3.1 Isolamento viral em VERO e C6/36

#### **3.4.3.1.1 Células VERO**

Para o isolamento viral em células VERO, alíquotas diluídas de 30 amostras de soro de crocodilianos foram inoculadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (T25), com monocamadas sem-confluentes.

Brevemente, após a retirada do meio de crescimento por derramamento, às T25 foram adicionadas alíquotas diluídas de acordo com o volume de cada amostra, em 1:5 ou 1:10 em meio de cultura de células acrescido de antibióticos e antifúngico. Após a inoculação, as T25 foram submetidas à incubação por 1h em estufa a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, com leve movimentação a cada 15 minutos, para melhor adsorção viral. Ao fim deste período, às culturas foram adicionados meio de manutenção com 2% de SFB, antes de nova incubação em mesmas condições por dez dias.

As garrafas eram visualizadas diariamente por microscopia de luz a fim de se detectar possível ECP na monocamada celular. Ao sinal de qualquer alteração nas monocamadas celulares as células e sobrenadante eram coletados então congelados com 20% SFB a -70°C. Independentemente do resultado do isolamento viral, as 30 amostras de crocodilianos foram posteriormente submetidas à RT-PCR convencional genérico para flavivírus e alfavírus, como descrito por Sánchez-Seco et al. (2001, 2005).

#### **3.4.3.1.2 Células C6/36**

Para o isolamento viral em células C6/36, 388 grupos de culicídeos, 41 grupos de ixodídeos e 60 amostras de soro e 50 de coágulo de crocodilianos foram inoculados em T25, tubos ou poços de placas de seis poços com células C6/36 com monocamadas semi-confluentes.

Brevemente, após a retirada do meio de crescimento por derramamento, às T25, tubos e poços foram adicionadas alíquotas dos triturados de artrópodes. Após a inoculação, as células foram submetidas à incubação por 1h em estufa a 5% CO<sub>2</sub>



a 28°C, com leve movimentação a cada 15 minutos, para melhor adsorção viral. Ao fim deste período, às culturas foi adicionado meio de manutenção com 2% de SFB, antes de nova incubação em mesmas condições por dez dias. As culturas eram visualizadas diariamente por microscopia de luz a fim de se detectar possível ECP na monocamada celular. Ao sinal de qualquer alteração nas monocamadas celulares as células e sobrenadante eram coletados então congelados com 20% SFB a -70°C.

Para 83 grupos de artrópodes, as amostras positivas no isolamento viral foram submetidas à RT-PCR convencional genérico para flavivírus e alfavírus, como descrito por Sánchez-Seco et al. (2001, 2005). Enquanto que para os 305 grupos de artrópodes restantes, independentemente do resultado todas as amostras foram posteriormente submetidas à PCR em tempo real para flavivírus como descrito por Moureau et al. (2007).

#### 3.4.3.2 Teste de placas

O teste de placas foi realizado em 60 das 90 amostras de soro e 50 de coágulo de crocodilianos, bem como em 305 grupos de culicídeos e 41 de ixodídeos.

Para o teste de placas, alíquotas diluídas de amostras de crocodilianos e artrópodes foram inoculadas em duplicatas em placas de seis poços com células VERO. As placas eram utilizadas 48h após preparadas quando apresentavam monocamada semi-confluyente. Todas as amostras foram submetidas a dois testes de placas, realizados com diferentes períodos de incubação.

Brevemente, após a retirada do meio de crescimento por derramamento, as culturas celulares foram inoculadas com alíquotas de 100 µL dos triturados de artrópodes e em mesmo volume amostras de crocodilianos diluídas em 1:5 ou 1:10 de acordo com o volume de cada amostra. Após a inoculação, as células foram submetidas à incubação por 1h em estufa a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, com leve movimentação a cada 15 minutos, para melhor adsorção viral. Ao fim deste período, as monocamadas celulares receberam uma cobertura de solução de 1%

de agarose (*overlay*) e foram então novamente incubadas em mesmas condições de temperatura por dois e cinco dias. Ao fim deste período, as monocamadas receberam uma segunda camada da mesma solução, desta vez contendo corante e foram novamente incubadas por mais 24h. Após a última incubação, as placas de seis poços foram levadas a uma fonte luminosa e visualizadas para a presença de placas, isto é, áreas descoloridas de destruição celular causada por unidades formadoras de placas. Em caso de visualização de placas, as duas camadas de solução de agarose eram retiradas e as áreas das placas eram raspadas e suspensas em diluente com 20% de SFB, para congelamento a -70°C.

Testes de placas em que a segunda solução de agarose era aplicada com 48h após a inoculação tinham como objetivo principal a detecção de vírus que produzem destruição celular em um curto período, como os alfavírus. Desta forma, a coloração realizada em 48h permitiria a detecção de placas antes da destruição total da monocamada celular.

A realização do teste de placas com coloração da monocamada celular cinco dias após a inoculação da amostra, permite a detecção de vírus que apresentam um período de incubação mais lento, como os flavivírus. Neste caso, a coloração não é realizada também com 48h, porque o corante normalmente utilizado, vermelho neutro, leva a toxicidade celular impedindo a formação e visualização de placas na monocamada celular.

Independentemente do resultado, todas as amostras submetidas ao teste de placas foram posteriormente submetidas à RT-PCR em tempo real para flavivírus como descrito por Moureau et al. (2007).

#### **3.4.4 ELISA de Bloqueio**

O ELISA de bloqueio utilizado no presente estudo foi desenvolvido primariamente para a pesquisa de anticorpos anti-WNV em amostras de aves, para ser utilizado como parte do monitoramento da circulação de WNV em populações de aves como descrito por Blitvich et al. (2003c). Posteriormente, em um estudo experimental utilizando-se hospedeiros vertebrados de outros grupos, como

equinos, felinos e suínos, o ELISA de bloqueio se mostrou também eficaz na detecção de infecção pregressa por WNV em outros grupos de animais (Blitvich et al. 2003).

O princípio do ELISA de bloqueio é a detecção de amostras que, por apresentarem anticorpos específicos, se ligam ao antígeno previamente fixado à microplaca impedindo a ligação ao antígeno, do anticorpo monoclonal (MAb). Após a lavagem, o MAb não ligado ao antígeno é retirado impedindo a reação colorimétrica que seria desencadeada entre a ligação de MAb e o antígeno e a peroxidase adicionada na última etapa do ensaio. Desta forma, reação não colorimétrica de uma amostra indica a presença de anticorpos específicos e, por conseguinte, positividade.

Diferentes MAbs foram testados para sua especificidade para WNV. Brevemente, MAb 2B2 é específico para WNV e para o vírus Koutango (*Koutango virus* ou KOUV), também membro do grupo da JEV. O MAb 3.1112G é WNV específico, MAb 6B5A-2 é SLEV específico e MAb 3H6 e 6B6C-1 são reativos ao grupo dos flavivírus. Todos os MAb detectam epítopos da proteína E, com exceção do MAb 3.1112G, específico para WNV, que detecta epítopo da proteína NS1 (Blitvich et al. 2003).

No presente estudo, o ELISA de bloqueio utilizando-se MAb 6B6C-1 foi usado para a pesquisa de flavivírus, como um método de triagem nas 1.220 amostras de vertebrados estudadas. As amostras positivas no ELISA de bloqueio eram então submetidas ao PRNT.

#### 3.4.4.1 Preparação de antígeno

A preparação de antígeno foi realizada com WNV isolados na Argentina e nos EUA (AREq002 e NY99) em culturas de células C6/36, que permite a propagação títulos mais altos de WNV quando comparado com VERO. O protocolo completo utilizado para a produção de antígenos para o ELISA de bloqueio está descrito no Anexo (J).

Brevemente, para garrafas de 150 cm<sup>2</sup> (T150) de células C6/36 com 48h, um índice de multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 foi utilizado e o volume de suspensão viral a ser utilizado, calculado. Uma T150 e uma T25 de células C6/36 foram utilizadas para infecção e controle, respectivamente. Após descarte do meio de cultura, 1 mL de meio de manutenção e 5 mL de suspensão viral diluída foram adicionados à T25 e T150, respectivamente.

As duas garrafas foram incubadas a 28°C com 5%CO<sub>2</sub> por 1h com leve movimentação a cada 15 minutos. Ao final deste período, 20 mL e 10 mL de meio de manutenção foram respectivamente adicionados a T150 e T25, que foram então incubadas em mesmas condições por cinco dias. Células C6/36 não apresentam uma evidente alteração quando infectadas por WNV e o pico de replicação de WNV em C6/36 ocorre 120h após a infecção.

Após a incubação, a T25 controle foi descartada e a T150 teve a monocamada celular raspada. Todo o volume da garrafa foi então transferido para tubo e então centrifugado. O sobrenadante do tubo foi descartado e o precipitado de células lavado por três vezes em solução borato salina. Após a última lavagem, o precipitado foi resuspenso em solução detergente e então submetido à sonicação para desintegração do precipitado celular. Após a ruptura das membranas celulares liberando antígenos a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante fracionado e armazenado em diferentes tubos para evitar sucessivos descongelamentos futuros.

#### **3.4.4.1.1 Cálculo da diluição do antígeno e do MAb 6B6C-1**

Antes de se iniciar o ELISA de bloqueio é preciso avaliar a melhor diluição a ser utilizada do antígeno e do MAb 6B6C-1. Inicialmente, o antígeno foi diluído de 1:40 até 1:5120 e o MAb de 1:250 até 1:4000. O protocolo completo do teste de diluição do antígeno e anticorpo monoclonal 6B6C-1 está descrito no Anexo (K).

Brevemente, o teste com diferentes diluições de antígeno e MAb é realizado para se descobrir as maiores diluições de antígeno e MAb que produzem uma reação colorimétrica satisfatória. Caso haja uma diferença significativa de reação

colorimétrica entre as diluições testadas, um novo teste com diluições intermediárias pode ser realizado para se encontrar a melhor diluição a ser utilizada.

#### **3.4.4.1.2 Execução do ELISA de Bloqueio**

Para o ELISA de bloqueio realizado no presente estudo foi utilizado o MAb 6B6C-1 que apresenta reatividade ao grupo dos flavivírus. Um total de 1.220 amostras de soro em diluição 1:10, com 238 amostras de ovinos, 892 de equídeos e 90 de crocodilianos foram testadas em triplicatas para reatividade ao antígeno WNV.

As amostras de ovinos e crocodilianos, bem como de um grupo de 724 amostras de equídeos coletadas a partir de novembro de 2009, que apresentaram resultados no ELISA de bloqueio entre 20% e 29% de inibição, foram repetidos duas vezes para confirmação do percentual de inibição. As amostras que apresentaram em ao menos em um dos três ensaios um percentual de inibição  $\geq 30\%$  foram então submetidas ao PRNT<sub>90</sub>. O protocolo utilizado para a realização do ELISA de bloqueio está descrito no Anexo (L).

Brevemente, após fixação de antígeno de WNV em microplaca, uma solução proteica a base de leite foi utilizada para bloquear ligações inespecíficas. Amostras de soro diluídas a 1:10 foram então testadas para reatividade com o antígeno utilizado. Após incubação seguida de sucessivas lavagens, alíquotas diluídas de MAb 6B6C-1 foram adicionadas à reação. As amostras de soro que bloquearam a reação colorimétrica de antígeno-anticorpo entre MAb e o antígeno de WNV foram mensuradas quantitativamente por espectrofotometria em leitor de ELISA.

Primariamente, as amostras que apresentam 30% ou mais de inibição da ligação do MAb 6B6C-1 ao antígeno WNV são consideradas soropositivas para presença de anticorpos específicos para flavivírus. O critério de soropositividade descrito por Blitvich et al. (2003c) foi calculado na observação de que amostras de soro de aves negativas para WNV apresentaram um percentual máximo de inibição inespecífica de 24,3%, deste modo a utilização de 30% como critério de

soropositividade seria suficiente para minimizar a detecção de reações inespecíficas. No presente estudo, para um grupo de 168 amostras de equídeos de quatro propriedades amostradas em fevereiro de 2009 (PA, PB, PE, PF) um critério mais conservador foi utilizado e foram consideradas soropositivas as amostras que apresentaram um percentual de inibição igual ou maior que 35%. Para as 724 amostras de equídeos restantes e todas as amostras de ovinos e crocodilianos o critério de soropositividade menos conservador de 30% ou mais de inibição foi utilizado.

#### **3.4.5 Teste de neutralização por redução de placas (PRNT)**

Em cultura de diversas linhagens celulares a replicação dos arbovírus provoca destruição celular progressiva e difusa, o ECP. Quando se utiliza sobre a monocamada celular uma cobertura de alta densidade, restringe-se o ECP ao foco inicial de replicação impedindo que as novas partículas virais recém-replicadas se dispersem pelo meio que está sobre as células causando ECP em outros pontos da monocamada celular. Desta forma, utilizando-se esta cobertura de alta densidade considera-se que cada ECP observado, agora chamado de placa, foi originado por apenas uma partícula viral, agora chamada de unidade formadora de placa (UFP). Assim teoricamente o número de placas observado é o mesmo número de partículas virais inicialmente inoculadas.

O princípio básico do PRNT consiste em avaliar a capacidade que uma amostra tem, quando inoculada com a suspensão viral sobre a monocamada celular, de neutralizar UFP reduzindo a formação de placas. Nas amostras soropositivas com anticorpos neutralizantes será observado um número menor do que o esperado de placas. Se a amostra não apresentar anticorpos neutralizantes, o número de placas observado deverá ser próximo ou o mesmo do que previamente calculado para a suspensão viral.

Ao final de um período que varia de acordo com o arbovírus testado, o título de anticorpos de cada amostra foi determinado como o inverso da diluição sérica em que foram observados 90% ou mais de redução do número de UFP observado no controle viral do ensaio (PRNT<sub>90</sub>). Assim, as amostras de soro em diluição igual

ou maior que 1:10 que apresentaram 10% ou menos do número de placas do controle viral foram consideradas em presença de anticorpos neutralizantes para o arbovírus pesquisado.

No presente estudo, em virtude do grande número de flavivírus circulando no Brasil, muitos deles em ciclos de transmissão enzoóticos semelhantes, além da utilização de PRNT<sub>90</sub>, as amostras foram consideradas positivas para determinado arbovírus quando o título de anticorpos para um arbovírus foi quatro vezes ou mais alto do que o título de anticorpos de todos os outros flavivírus estudados. Apesar do provável grande número de amostras positivas que não puderam ser detectadas considerando este critério de positividade, principalmente para aquelas amostras co-infectadas, este critério conservativo foi escolhido para minimizar a detecção de amostras positivas por reação cruzada.

Todas as amostras de soro de equino, ovino e crocodiliano que foram positivas no ELISA de bloqueio foram submetidas ao PRNT para WNV e outros flavivírus previamente reportados no Brasil.

Paralelamente, amostras de soro de crocodilianos, ovinos e equídeos, que foram soronegativas no ELISA de bloqueio foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV para avaliação de especificidade de ELISA de bloqueio na detecção de infecção pregressa por WNV.

Os vírus testados por PRNT<sub>90</sub> foram WNV, SLEV, ROCV, CPCV, IGUV, ILHV, BSQV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e YFV.

Além da utilização em NB-3 de suspensões virais selvagens de WNV e SLEV, também foram utilizados para a realização de ensaios de PRNT<sub>90</sub> em NB-2, WNV e SLEV quiméricos, derivados de YFV vacinal 17D com expressão de proteínas de envelope pré-membrana (prM-E) e de membrana (E) como descrito por Arroyo et al. (2001), Pugachev et al. (2004) e Komar et al. (2009). Além de WNV e SLEV, também foram utilizados DENV-3 quimérico também em derivado vacinal de YFV, assim como também o próprio YFV vacinal 17D.

Com exceção do CPCV que foi submetido ao PRNT<sub>90</sub> em cultura de células VERO e também em células BHK-21 clone 15, todos os outros flavivírus foram submetidos ao PRNT<sub>90</sub> em cultura de células VERO.

Inicialmente, todas as suspensões virais a serem utilizadas para os ensaios foram tituladas e em caso de baixo título e ou volume, propagadas em culturas de células, como descrito detalhadamente em Anexo (M).

Antes do início da realização do PRNT<sub>90</sub>, todas as amostras de soro foram inativadas a 56°C por 30min para minimizar a reação inespecífica do sistema complemento e inativação de eventual agente patogênico. Depois de inativadas, todas as amostras soropositivas no ELISA de bloqueio foram inicialmente testadas em diluições únicas de 1:10 ou 1:20 para sua capacidade de neutralizar em 90% a formação de placas pelo WNV e os flavivírus de vertebrados que circulam no Brasil.

As amostras soropositivas na triagem foram então submetidas em duplicata a um novo PRNT<sub>90</sub>, desta vez nas seis diluições seguintes. Amostras em diluição 1:10 soropositivas na triagem foram submetidas a um novo PRNT<sub>90</sub> em diluições de 1:20 até 1:640, e as amostras soropositivas na triagem em diluição 1:20 foram submetidas a um novo PRNT<sub>90</sub> em diluições de 1:40 até 1:1280. Ao final, cada amostra teve os títulos de anticorpos neutralizantes para os flavivírus testados comparados entre si. Aquelas amostras em que o título de anticorpos foi quatro vezes ou mais alto para um flavivírus do que para os outros estudados foi considerada soropositiva.

As amostras em que a diferença entre os títulos foi menor que quatro vezes foram consideradas amostras soropositivas para flavivírus indeterminado. Todas as amostras com título  $\geq 1:10$  foram consideradas em presença de anticorpos neutralizantes. As amostras que foram soropositivas no ELISA de bloqueio e que apresentaram título de anticorpos neutralizantes  $< 1:10$  para todos os flavivírus testados foram consideradas soronegativas para anticorpos neutralizantes. O protocolo completo e detalhado do PRNT<sub>90</sub> utilizado está em Anexo (N).



### 3.4.6 Técnicas moleculares

#### 3.4.6.1 Extração de RNA

Um total de 12 suspensões virais, assim como todas as 90 amostras de soro e 50 de coágulo crocodiliano e também 706 amostras, incluindo 305 grupos de artrópodes e suas respectivas passagens em culturas de células foram submetidos à extração de ácido nucléico viral através de kit comercial (QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit QIAGEN) ou através de *Bio robot Universal System*<sup>®</sup> (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 3.4.6.2 RT-Nested-PCR convencional genérico para flavivírus

Um total de 30 amostras de soro de crocodiliano e dois grupos de culicídeos que produziram ECP em cultura de células C6/36 foi submetido a *RT-Nested-PCR* genérico modificado em INEVH para detecção de fragmento genômico de flavivírus e alfavírus. A técnica que utiliza iniciadores degenerados desenhados para detecção de fragmentos de 143 pares de bases em área conservada do gene NS5 em flavivírus e 195 pares de bases no gene nsP4 em alfavírus é baseada no sequenciamento nucleotídico para identificação viral (Sánchez-Seco et al. 2001, 2005). Após amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e então visualizados em transiluminador ultravioleta.

#### 3.4.6.3 PCR em tempo real genérico para flavivírus

Todos os 12 flavivírus utilizados para a PRNT<sub>90</sub>, assim como 60 amostras de soro e 50 de coágulo crocodiliano e também 476 amostras, incluindo 305 grupos de artrópodes e suas respectivas passagens em culturas de células foi submetido à PCR em tempo real baseado em iniciadores universais desenhados para amplificação de um fragmento de 269 a 272 nucleotídeos da região terminal N do gene NS5. A técnica que utiliza o sistema QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR (Qiagen) é indicada para detecção de novos flavivírus e também se baseia no

sequenciamento nucleotídico para identificação viral (Moureau et al. 2007). Como a principal vantagem do sistema SYBR Green está a não necessidade de sonda e como desvantagem a possibilidade de gerar sinais falso-positivos, já que o fluoróforo pode se ligar a sequências não específicas de DNA duplo-fita uma vez que a molécula de SYBR Green I se liga a qualquer DNA duplo-fita.

No presente estudo, as curvas de dissociação foram utilizadas para a identificação de amostras positivas. Amostras foram consideradas positivas quando a curva de dissociação medida pela perda de fluorescência ocorreu em temperatura acima de 75°C indicando um produto amplificado maior que dímeros formados pelos iniciadores. Além disso, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma perda de fluorescência acima de 90 unidades relativas de fluorescência (RFU) para descartar *background* de fluorescência de amostras negativas. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em IQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

#### 3.4.6.4 Sequenciamento nucleotídico

As amostras positivas no PCR em tempo real foram selecionadas para purificação e sequenciamento nucleotídico usando os dois iniciadores em duas reações separadas. Os produtos da PCR em tempo real foram submetidos à purificação através de kit (QIAquick PCR purification kit, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e então submetidas à reação de sequenciamento utilizando-se Big Dye V3.1 kit (Applied Biosystems) em DNA Engine® PTC-200 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

Os produtos da reação de sequenciamento foram então purificados usando Big Dye Xterminator product (Applied Biosystems) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador de 16 capilares 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems/HITACHI). As sequências foram então montadas utilizando-se o software Lasergene 9 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) e então comparadas com sequências em *Genbank* database usando BLASTN algoritmo.

### 3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE SOROPOSITIVIDADE

As percentagens das amostras positivas foram analisadas via Excell (Microsoft) através de teste de qui-quadrado. Os valores de p menor que 0.05 foram considerados estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMOSTRAS VIRAIS UTILIZADAS PARA PRNT<sub>90</sub>

#### 4.1.1 **Confirmação da identidade por sequenciamento nucleotídico**

Foram utilizados para a PRNT<sub>90</sub> isolados de flavivírus mantidos para diagnóstico no INEVH, FMRP-USP e CDC. Os isolados utilizados no CDC foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico para confirmação de identidade.

##### 4.1.1.1 Vírus do oeste do Nilo (WNV)

A sequência nucleotídica da porção terminal N do gene NS5 da amostra de WNV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a WNV (West Nile virus isolate WNV-1/BID-V5046, partial genome), acesso JN819325.1.

##### 4.1.1.2 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)

A sequência nucleotídica da suspensão de SLEV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a SLEV (St. Louis encephalitis virus strain BeAr 23379 polyprotein gene, partial cds), acesso EF158048.1.

#### 4.1.1.3 Vírus Ilhéus (ILHV)

A sequência nucleotídica da suspensão de ILHV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a ILHV (Ilheus virus strain Original, complete genome), acesso AY632539.4.

#### 4.1.1.4 Vírus da febre amarela (YFV) (17D)

A sequência nucleotídica da suspensão de YFV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a YFV (Yellow fever virus 17D YF-VAX Vero adapted Series C P11, complete), acesso JN811143.1.

#### 4.1.1.5 Vírus Bussuquara (BSQV)

A sequência nucleotídica da suspensão de BSQV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a BSQV (Bussuquara virus strain BeAn 4073, complete genome), acesso AY632536.4.

#### 4.1.1.6 Vírus Cacipacoré (CPCV)

A sequência nucleotídica da suspensão de CPCV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a CPCV (Cacipacore virus strain BeAn 327600 NS5 protein (NS5) gene, partial), acesso AF013367.1.

#### 4.1.1.7 Vírus Iguape (IGUV)

A sequência nucleotídica da suspensão de IGUV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a IGUV (Iguape virus strain SPAn 71686, complete), acesso AY632538.4.

#### 4.1.1.8 Vírus Rocio (ROCV)

A sequência nucleotídica da suspensão de ROCV utilizada no presente estudo apresentou homologia de 98% a ROCV (Rocio virus strain SPH 34675, complete genome), acesso AY632542.4.

#### 4.1.1.9 Vírus Dengue 1 (DENV-1)

A sequência nucleotídica da suspensão de DENV-1 utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a DENV-1 (Dengue virus 1 isolate DENV-1/US/BID-V2097/1986, complete genome), acesso FJ562106.1.

#### 4.1.1.10 Vírus Dengue 2 (DENV-2)

A sequência nucleotídica da suspensão de DENV-2 utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a DENV-2 (Dengue virus 2 strain DENV-2/ID/1183DN/1977, complete genome), acesso GQ398257.1.

#### 4.1.1.11 Vírus Dengue 3 (DENV-3) (ChimericVax Dengue 3 virus)

A sequência nucleotídica da suspensão de DENV-3 utilizada no presente estudo apresentou homologia de 97% a YFV (Yellow fever virus 17D YF-VAX Vero adapted Series C P11, complete), acesso JN811143.1.

#### 4.1.1.12 Vírus Dengue 4 (DENV-4)

A sequência nucleotídica da suspensão de DENV-4 utilizada no presente estudo apresentou homologia de 99% a DENV-4 (Dengue virus 4 isolate DENV-4/US/BID-V2431/1995, complete genome), acesso GQ199880.1.

## 4.2 ELISA DE BLOQUEIO ESPECÍFICO PARA FLAVIVÍRUS

Parte dos resultados do ELISA de bloqueio assim como da PRNT<sub>90</sub> foram publicados no periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Pauvolid-Corrêa et al. 2011) (Anexo O).

No ELISA de bloqueio primariamente foram consideradas soropositivas e sequencialmente testadas em PRNT<sub>90</sub> para presença de anticorpos específicos para flavivírus, as amostras que apresentaram um percentual de inibição da ligação de MAb 6B6C-1 com o antígeno de WNV (NY99 e AReq002) igual ou acima de 30%. Um total de 1.220 amostras de soro, com 892 de equídeos, 238 de ovinos e 90 de crocodilianos foi submetido ao ELISA de bloqueio.

### 4.2.1 Amostras de soro de equídeos

Para um grupo de amostras de 168 equídeos coletados em fevereiro de 2009, foi utilizado como critério de soropositividade um percentual de inibição igual ou maior que 35% de inibição. Para as outras 724 amostras de equídeos restantes, um percentual igual ou maior que 30% de inibição foi utilizado como critério de soropositividade.

Considerando os critérios de soropositividade previamente descritos, do total de 892 amostras de soro de equídeo avaliadas, 426 (47,8%) foram soronegativas e 466 (52,2%) soropositivas para a presença de anticorpos específicos para flavivírus (Figura 4.1). Dentre as 466 amostras soropositivas, 12 (2,6%) eram redomões, 375 (80,5%) eram domados, 74 (15,9%) eram não domados e cinco (1,1%) não tinham registro de doma.

Com relação ao sexo e espécie dos equídeos amostrados, dez (58,8%) dos 17 burros e dez (38,5%) dentre as 26 mulas foram soropositivas. Entre os equinos, dos 391 machos castrados e 86 inteiros, a soropositividade para anticorpos anti-flavivírus foi detectada em 254 (65%) e 23 (26,7%) animais, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Por fim, dentre as 368 éguas avaliadas, 168 (45,7%) foram soropositivas (Figura 4.2).

Com relação à soropositividade por faixa etária, dentre os 103 animais com idade entre 10 meses e dois anos, 14 (13,6%) foram soropositivos e entre os 173 animais com idade entre três e cinco anos, 49 (28,3%) apresentaram soropositividade. Na faixa etária com o maior número de animais, dos 280 equídeos com seis ou mais anos, 193 (68,9%) foram soropositivos ( $p < 0.05$ ) (Figura 4.3).

O único equídeo que apresentava sinais clínicos de desordem neurológica no momento da venopunção era um equino macho castrado da raça Cavalo Pantaneiro e da propriedade PJ. O animal número 1077 era domado, não apresentava registro de idade, viagens ou vacinação e foi venopuncionado em Outubro de 2009. A amostra de soro do animal 1077 foi soropositiva no ELISA de bloqueio com um percentual de inibição de 65,6%.

A média de soropositividade entre as 18 propriedades foi de 51,3%. Entre as quatro propriedades em que se utilizou como critério de soropositividade percentual de inibição  $\geq 35\%$ , a média de soropositividade foi de 54% e entre as 14 propriedades em que se utilizou um critério menos conservador de  $\geq 30\%$ , a média de soropositividade foi de 51% ( $p > 0.05$ ) (Figura 4.4).

Foram detectados animais soropositivos em todas as 18 propriedades em que equídeos foram amostrados e a soroprevalência variou de 9,3% na propriedade PS até 80,6% em PH ( $p < 0.05$ ) (Quadro 4.1).

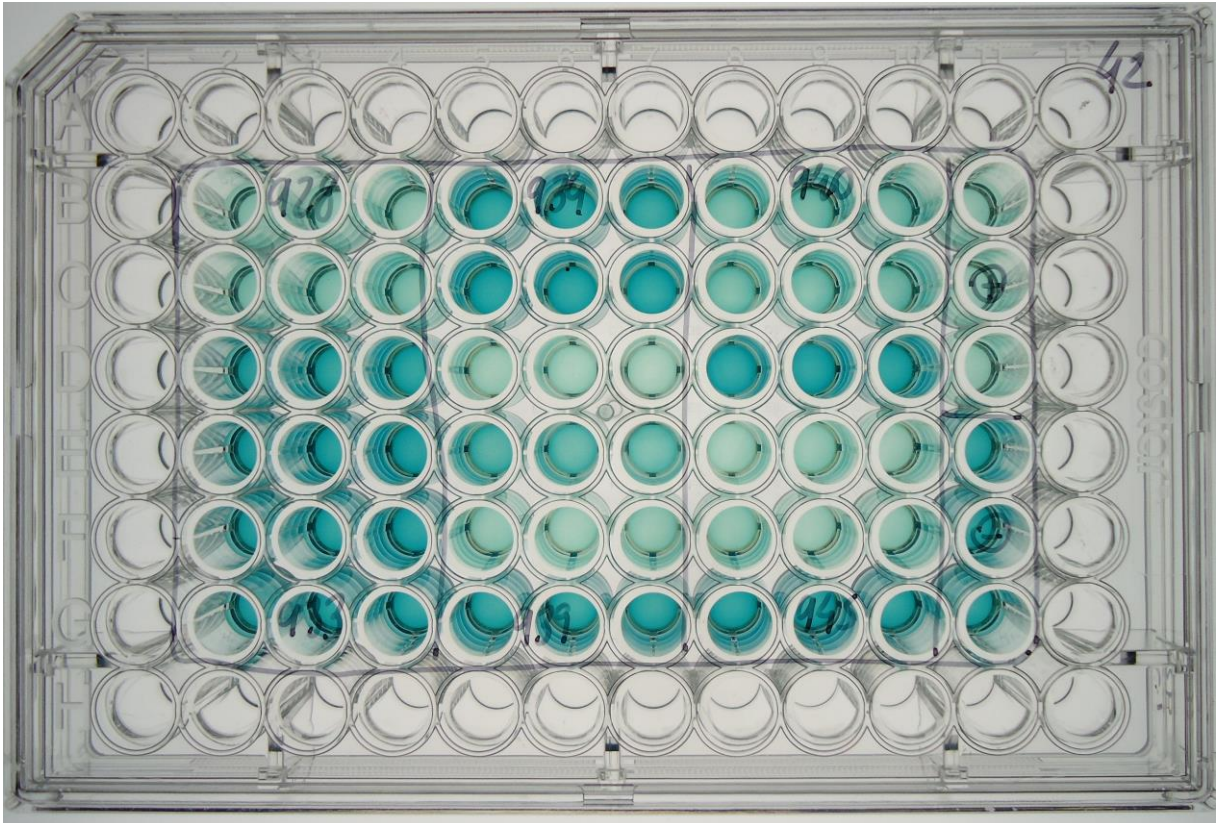


Foto 4.1 – Microplaca de ELISA de bloqueio com as amostras de soro em triplicata do equídeo 928 até equídeo 945. Controle positivo poço B11 até D11 e controle negativo do poço E11 até G11. Amostras 928, 929, 936, 937, 938, 941, 943 e 944 foram soropositivas. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



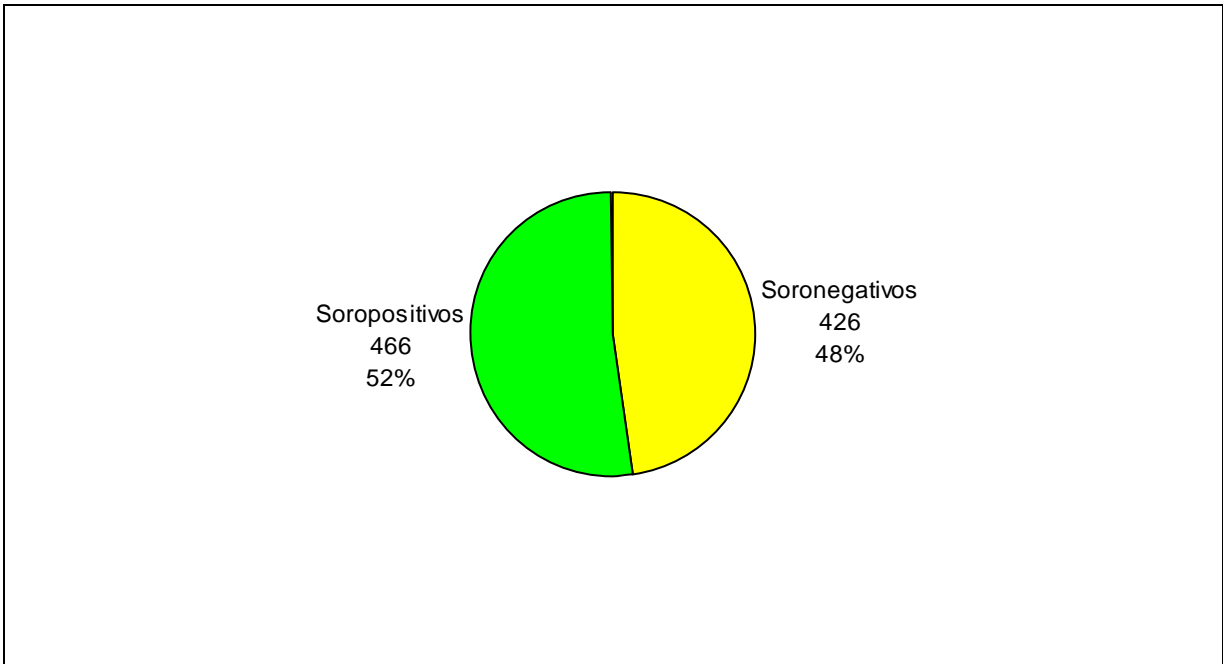


Figura 4.1 – Soropositividade de equídeos no ELISA de bloqueio para flavivírus.

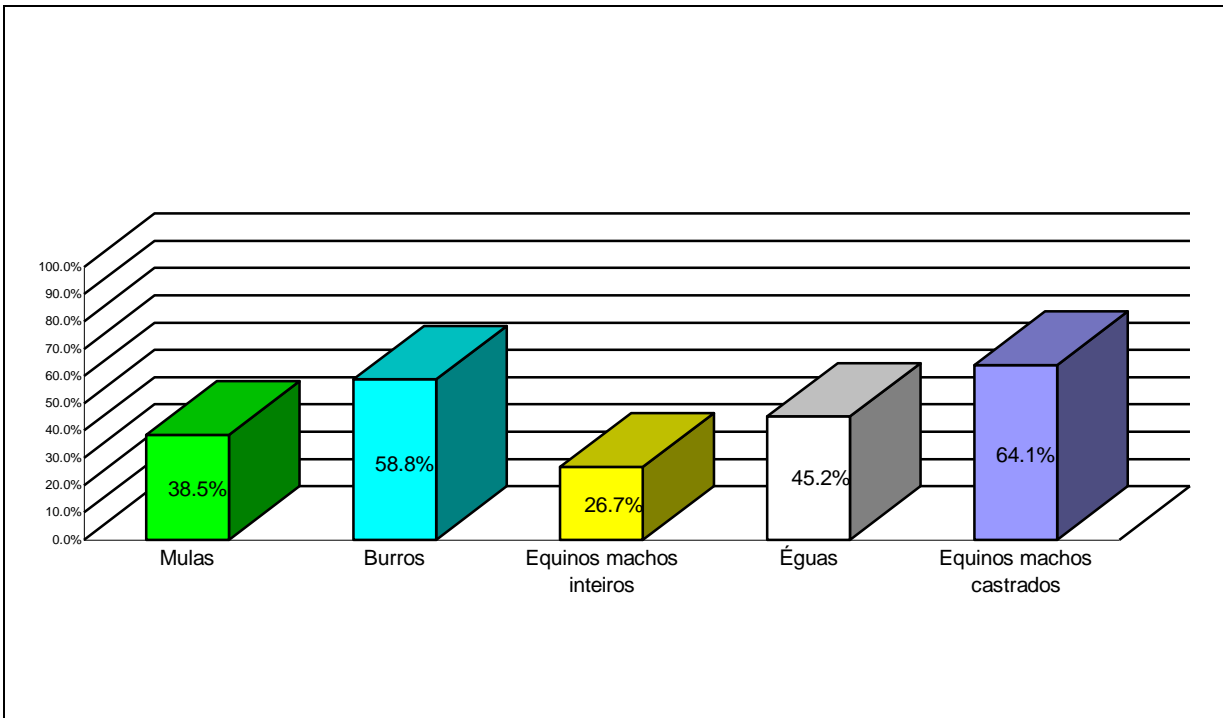


Figura 4.2 – Soropositividade de equídeos no ELISA de bloqueio para flavivírus por sexo e espécie.

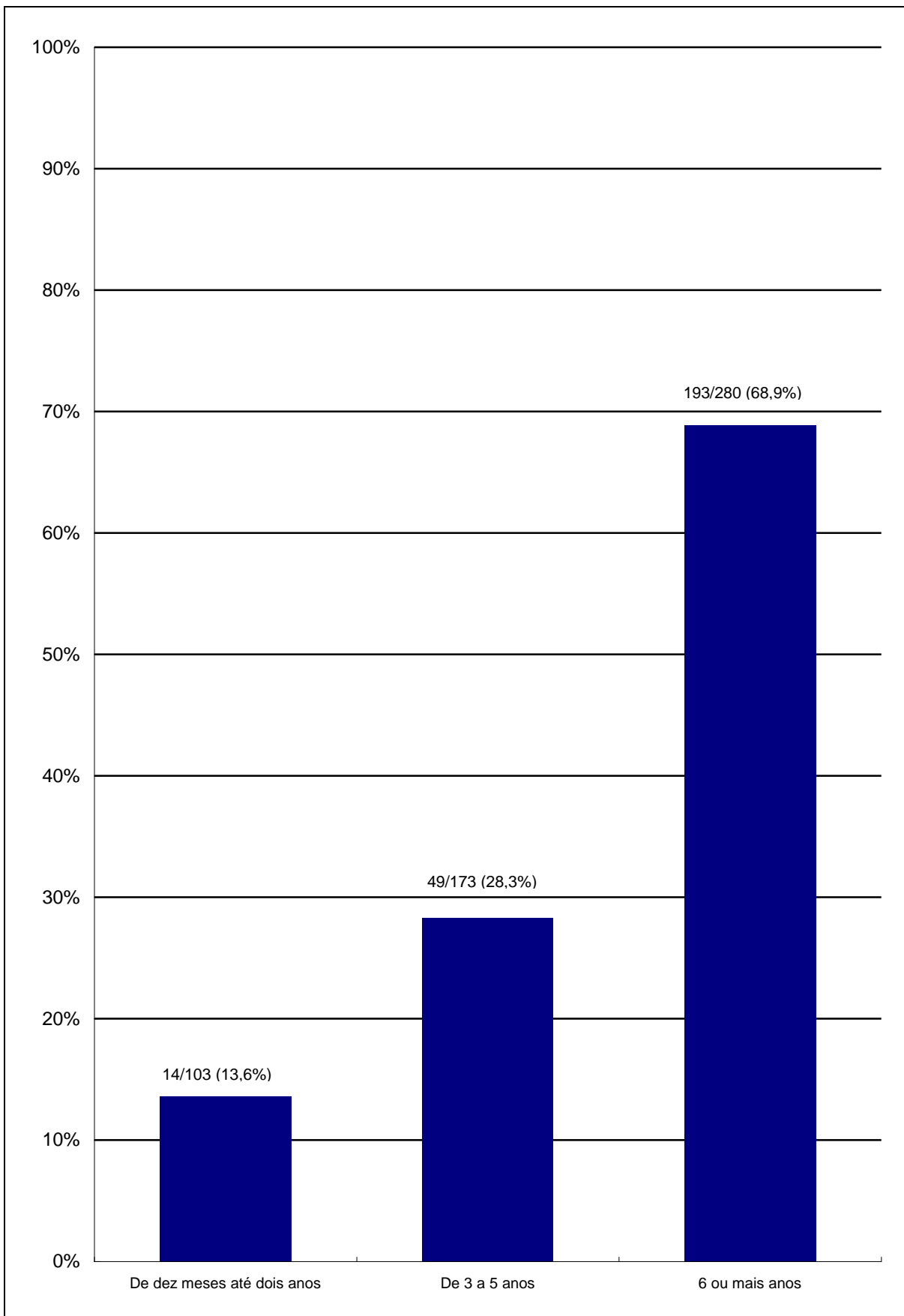


Figura 4.3 – Soropositividade de equídeos no ELISA de bloqueio para flavivírus por faixa etária em animais com registro de idade.

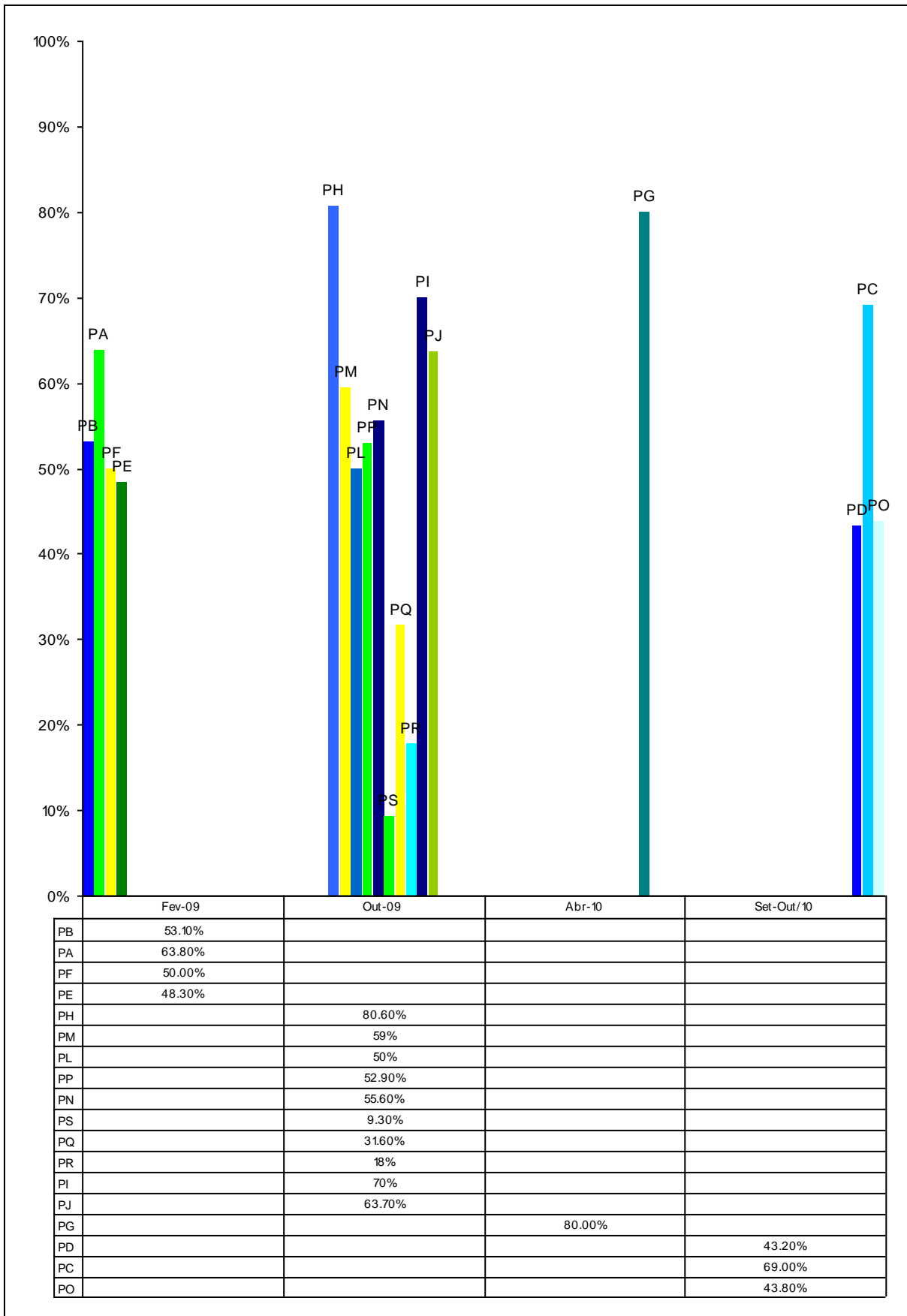


Figura 4.4 – Soropositividade de equídeos por propriedade no ELISA de bloqueio para flavivírus.

Quadro 4.1 – Número de equídeos soropositivos no ELISA de bloqueio.

Propriedades	Período de coleta	Número total de equídeos estudados	Número de soropositivos ELISA de bloqueio	Percentual de soropositividade
PA	Fev/09	58	37	63,80%
PB	Fev/09	49	26	53,10%
PE	Fev/09	29	14	48,30%
PF	Fev/09	32	16	50%
PH	Out/09	31	25	80,60%
PI	Out/09	20	14	70%
PJ	Out/09	124	79	63,70%
PL	Out/09	16	8	50%
PM	Out/09	32	19	59,40%
PN	Out/09	45	25	55,60%
PP	Out/09	34	18	52,90%
PQ	Out/09	19	6	31,60%
PR	Out/09	135	24	17,80%
PS	Out/09	43	4	9,30%
PG	Abr/10	85	68	80%
PC	Set-Out/10	87	60	69%
PD	Set-Out/10	37	16	43,20%
PO	Set-Out/10	16	7	43,80%
Total	Fev-Out/09 e Abr-Set-Out/10	892	466	52,2%

#### 4.2.2 Amostras de soro de ovinos e de crocodilianos

Entre as 238 amostras de soro de ovino e 90 amostras de soro de jacarés-do-Pantanal, submetidas ao ELISA de bloqueio, nenhuma foi soropositiva (Foto 4.2, 4.3).



Foto 4.2 – Microplaca de ELISA de bloqueio com as amostras de soro em triplicata do ovino 185 até ovino 202. Controle positivo poço B11 até D11 e controle negativo do poço E11 até G11. Todas as amostras foram soronegativas. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.

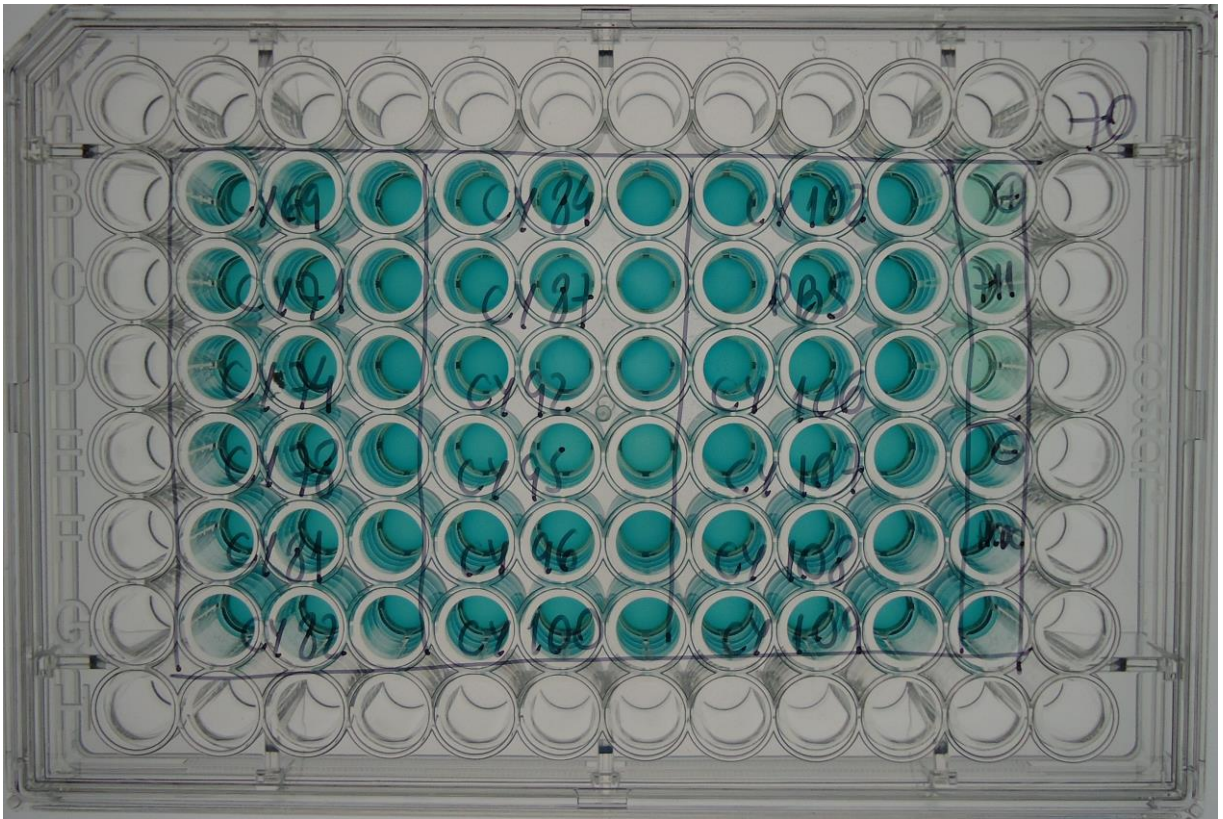


Foto 4.3 – Microplaca de ELISA de bloqueio com as amostras de soro em triplicata dos crocodilianos 69, 71, 74, 78, 81, 82, 84, 87, 92, 95, 96, 100, 102, PBS (controle negativo aleatório), 106, 107, 108 e 109. Controle positivo do B11 até D11 e controle negativo do E11 até G11. Todas as amostras foram soronegativas. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.

## 4.3 PRNT

### 4.3.1 Amostras de soro de equídeos

Foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub>, 466 amostras de soro de equídeo soropositivas no ELISA de bloqueio. Entre estas, 93 amostras coletadas em fevereiro de 2009 foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para as quimeras WNV e SLEV, assim como para os vírus selvagens ROCV, CPCV e ILHV, enquanto que as 373 amostras restantes foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para os vírus selvagens WNV, SLEV, BSQV, ILHV, DENV1, DENV-2, DENV-4, ROCV, CPCV, IGUV e para a quimera DENV-3 e vírus vacinal YFV.

Paralelamente foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV selvagem amostras soronegativas no ELISA de bloqueio, para detecção de amostras com evidência de infecção pregressa por WNV que não foram detectadas no ELISA de bloqueio utilizado como triagem no presente estudo.

Das 93 amostras soropositivas no ELISA de bloqueio coletadas em fevereiro de 2009, 18 (19,35%) foram soropositivas para ILHV, nove (9,7%) para SLEV, cinco (5,4%) para WNV, três (3,22%) para CPCV e 56 (60,2%) para flavivírus indeterminado.

Duas amostras tiveram título <1:10 para todos os flavivírus pesquisados e foram consideradas em ausência de anticorpos neutralizantes para os cinco flavivírus estudados.

Das 373 amostras de soro de equídeos coletadas em outubro de 2009 e abril, setembro e outubro de 2010 soropositivas no ELISA de bloqueio, 76 (20,4%) foram soropositivas para ILHV, 48 (12,9%) para SLEV, 22 (5,9%) para WNV, dois (0,5%) para CPCV, um (0,3%) para ROCV e 219 (58,7%), com diferença entre títulos menor do que quatro vezes, foram consideradas soropositivas para flavivírus indeterminado. Por fim, cinco amostras que apresentaram títulos de <1:20 para WNV e SLEV e <1:10 para todos os outros flavivírus pesquisados foram consideradas em ausência de anticorpos neutralizantes para os flavivírus estudados.

Entre as 466 amostras de soro de equídeo soropositivas no ELISA de bloqueio, 94 (20,2%) foram soropositivas para ILHV, 57 (12,2%) para SLEV, 27 (5,8%) para WNV, cinco (1,1%) para CPCV, uma (0,2%) para ROCV e 275 (59%) para flavivírus indeterminado e sete (1,5%) foram consideradas soronegativas por PRNT<sub>90</sub> (Quadro 4.2).

Do total de 892 amostras de soro de equídeo coletadas de fevereiro de 2009 até outubro de 2010, 426 (47,8%) foram soronegativas no ELISA de bloqueio. Entre as 466 (52,2%) amostras soropositivas no ELISA de bloqueio, 275 (30,8%) foram soropositivas para flavivírus indeterminado, 94 (10,5%) foram soropositivas para ILHV, 57 (6,4%) para SLEV, 27 (3%) para WNV, cinco (0,6%) para CPCV, uma (0,1%) para ROCV e sete (0,8%) foram consideradas soronegativas por PRNT<sub>90</sub> (Figura 4.5).

O equino 1077, que apresentava sinais clínicos sugestivos de desordem neurológica no momento da venopunção foi soropositivo para flavivírus indeterminado por PRNT<sub>90</sub> (Quadro 4.2).

Com relação aos flavivírus que apresentaram evidências sorológicas de circulação na região estudada, soropositividade por PRNT<sub>90</sub> para ILHV e para SLEV foram detectadas em 17 propriedades cada. WNV em 12, CPCV em três e ROCV que apresentou apenas um animal soropositivo em uma propriedade (Figura 4.6).

Um total de 94 (10,5%) equídeos foi considerado soropositivo para ILHV. Entretanto, das 892 amostras de soro de equídeos testadas, 356 (39,9%) apresentaram anticorpos neutralizantes para ILHV, isto é, títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:10, e dentre estas 221 (62,1%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40 (Foto 4.4).

Com relação ao SLEV, apesar do resultado final de 57 (6,4%) amostras soropositivas, 288 (32,3%) apresentaram anticorpos neutralizantes e destas 185 (64,2%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40 (Foto 4.5).

Um total de 27 (5,8%) equídeos foi considerado soropositivo para WNV. Entretanto, 206 (23,1%) apresentaram anticorpos neutralizantes para WNV e entre estes, 91 (44,2%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40 (Foto 4.6).



Com relação ao ROCV, 148 (16,6%) apresentaram anticorpos neutralizantes e destes 29 (19,6%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40 (Foto 4.7).

Cinco equídeos (1,1%) foram soropositivos para CPCV. Entretanto, 173 (19,4%) apresentaram anticorpos neutralizantes e destas 50 (28,9%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40 (Foto 4.8).

Não foram detectados animais soropositivos por PRNT<sub>90</sub> para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, BSQV ou IGUV em equinos na região. Entretanto, foram detectados baixos títulos de anticorpos neutralizantes para DENV-1 1:10 (n=4); DENV-2 1:10 (n=3); DENV-4 1:10 (n=1); YFV 1:10 (n=9), 1:20 (n=2) e 1:40 (n=2); BSQV 1:10 (n=11), 1:20 (n=1) e 1:40 (n=1); IGUV 1:10 (n=61) e 1:20 (n=4). Todas as amostras apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> <1:10 para DENV-3 (Quadro 4.2).

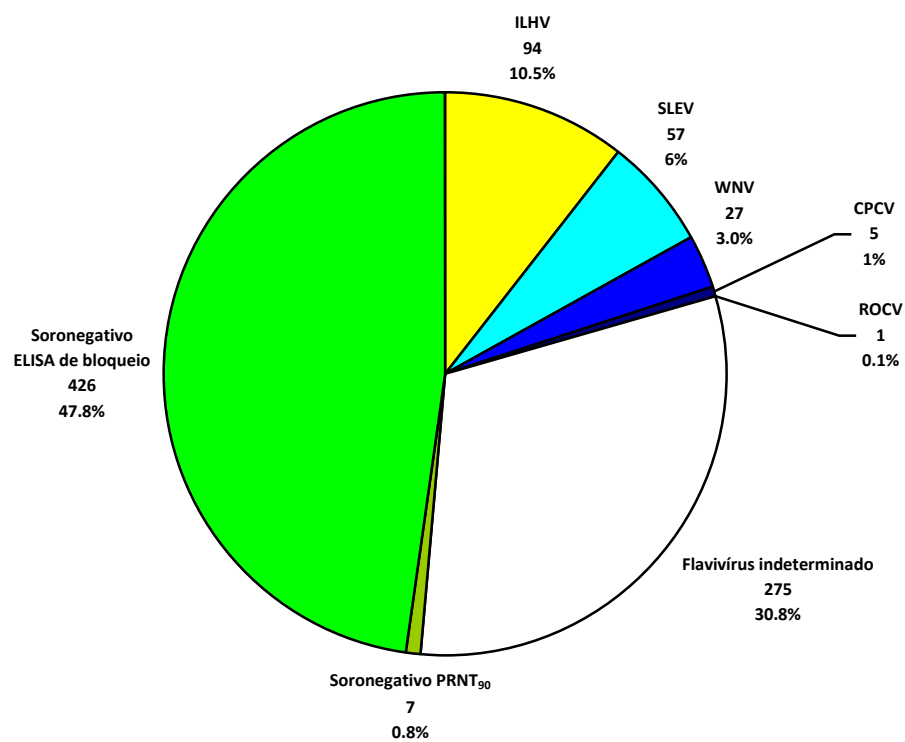


Figura 4.5 – Soropositividade de equídeos por PRNT<sub>90</sub>.

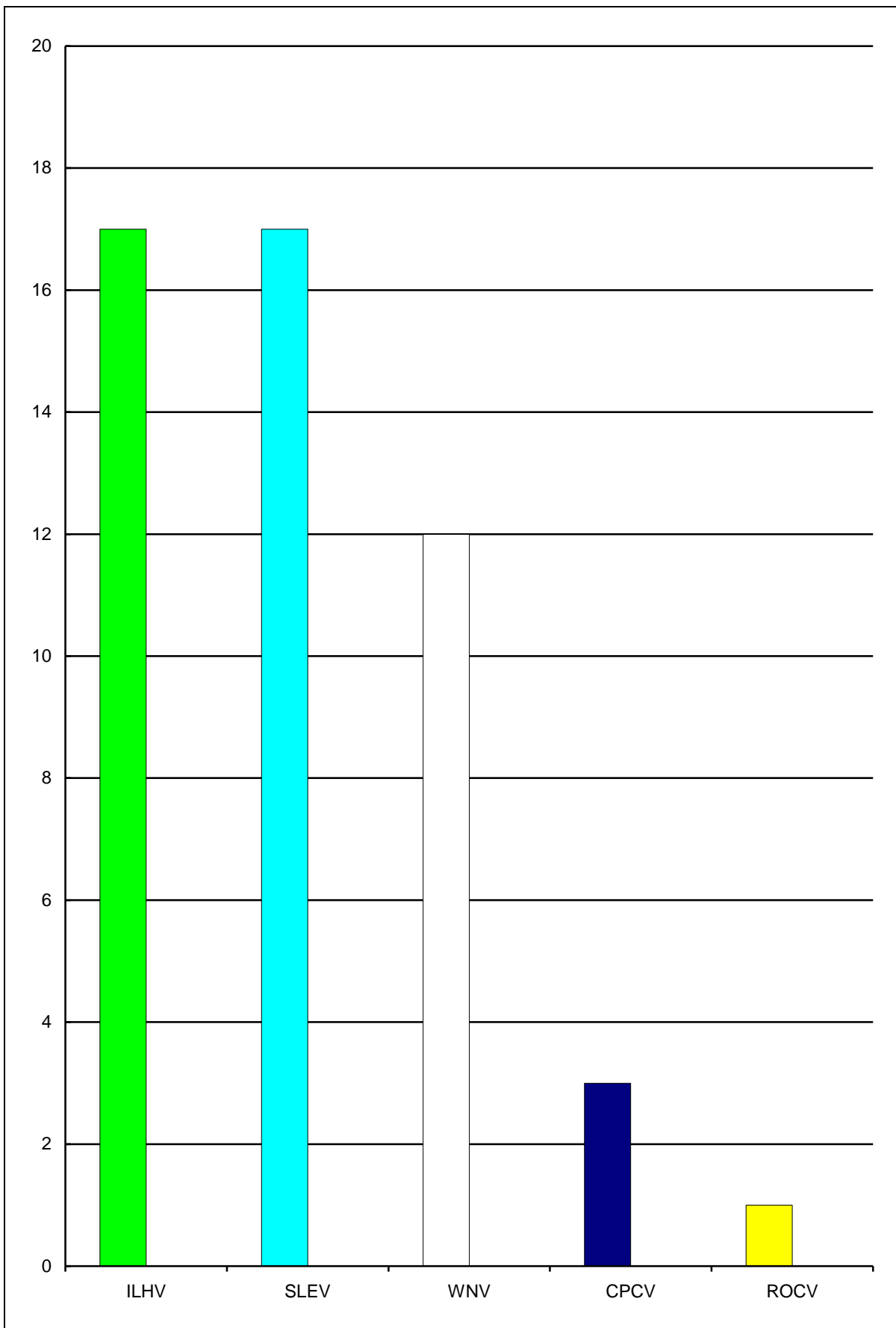


Figura 4.6 – Número de propriedades em que equídeos soropositivos por PRNT<sub>90</sub> foram detectados.

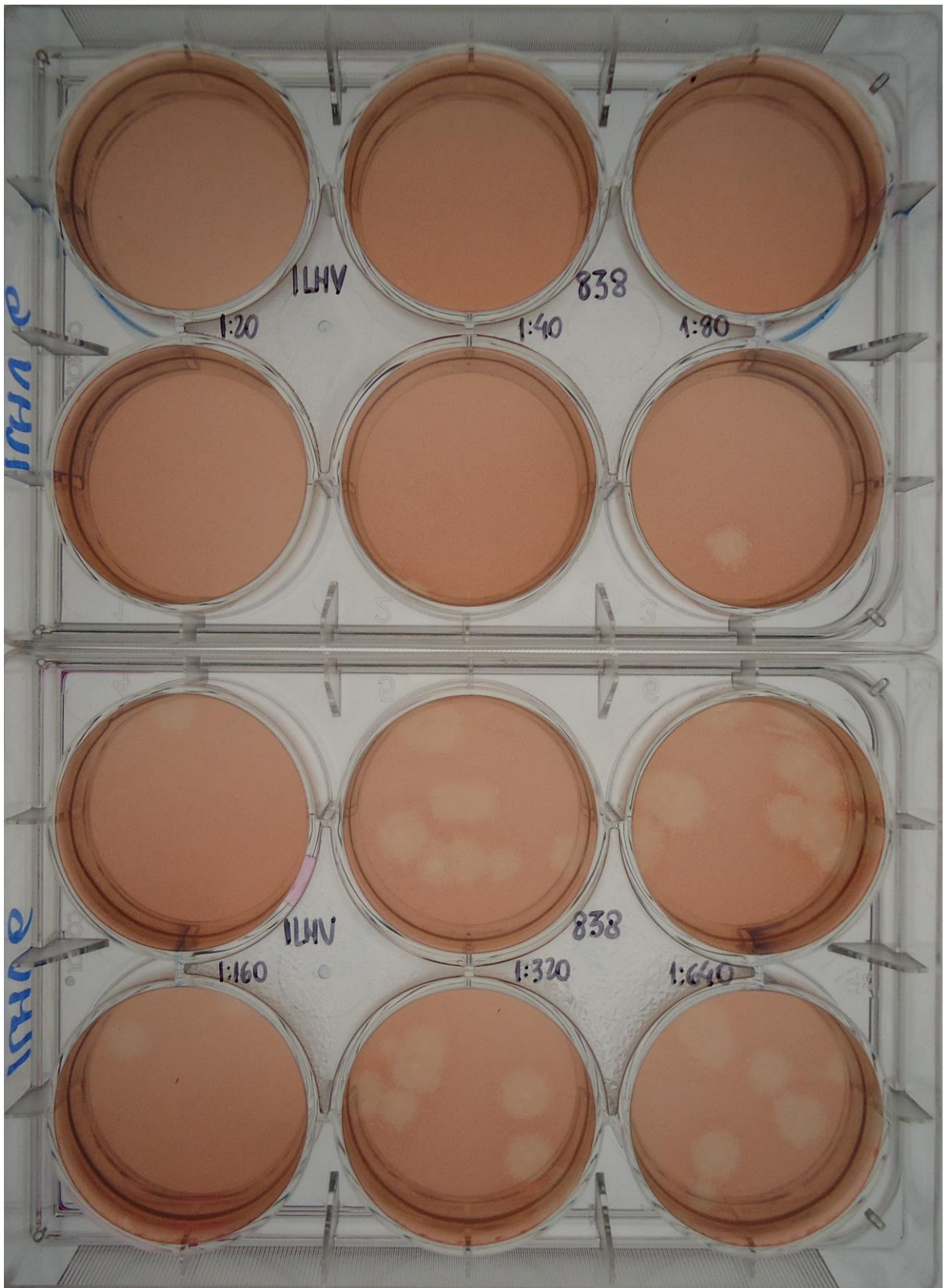


Foto 4.4 – Microplacas de PRNT<sub>90</sub> para ILHV com a amostra de soro do equídeo 838 em seis diluições em duplicatas. O título de PRNT<sub>90</sub> para ILHV desta amostra foi de 1:160. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



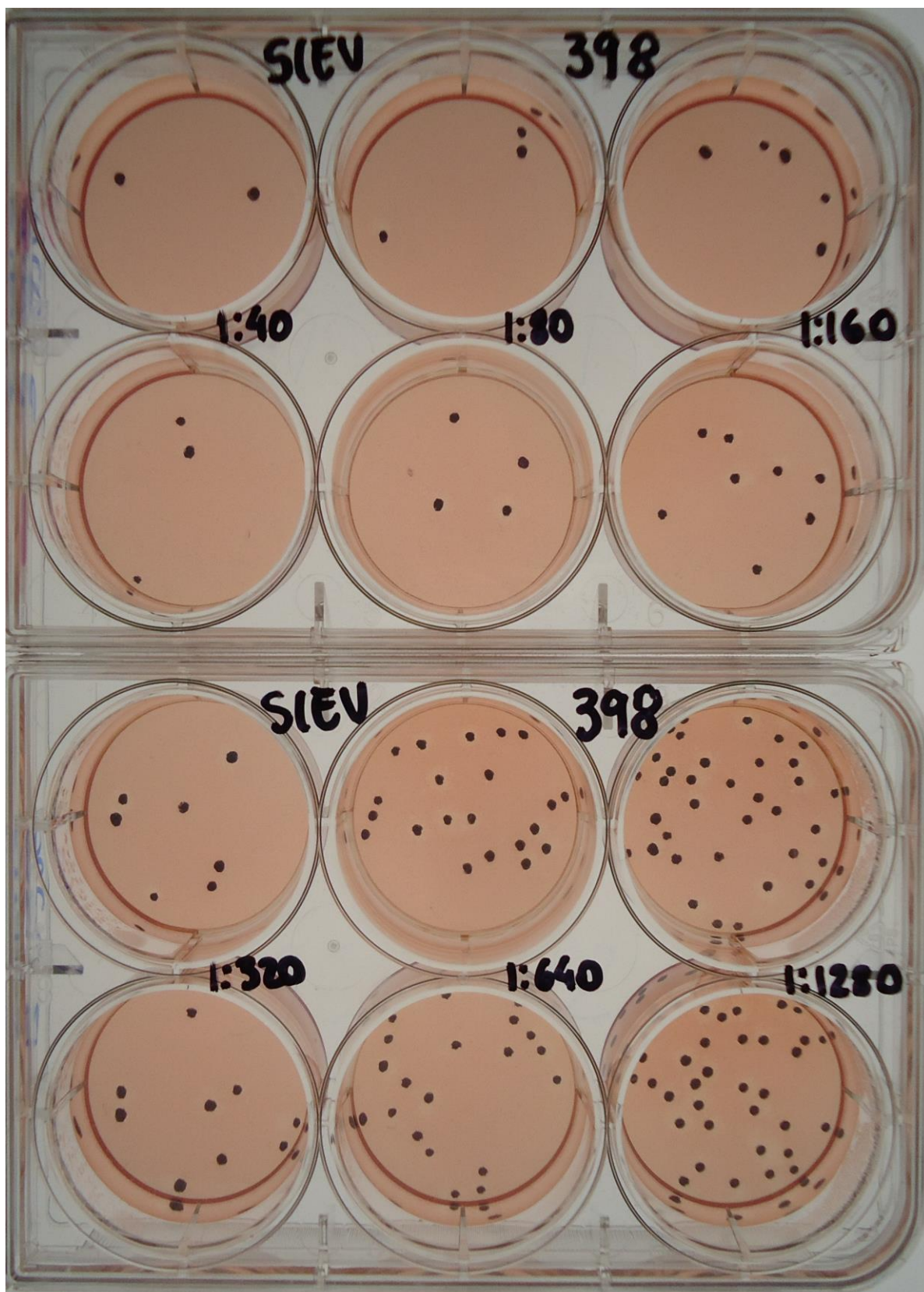


Foto 4.5 – Microplacas de PRNT<sub>90</sub> para SLEV com a amostra de soro do equídeo 398 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por SLEV foram marcadas em preto para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT<sub>90</sub> para SLEV desta amostra foi de 1:320. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



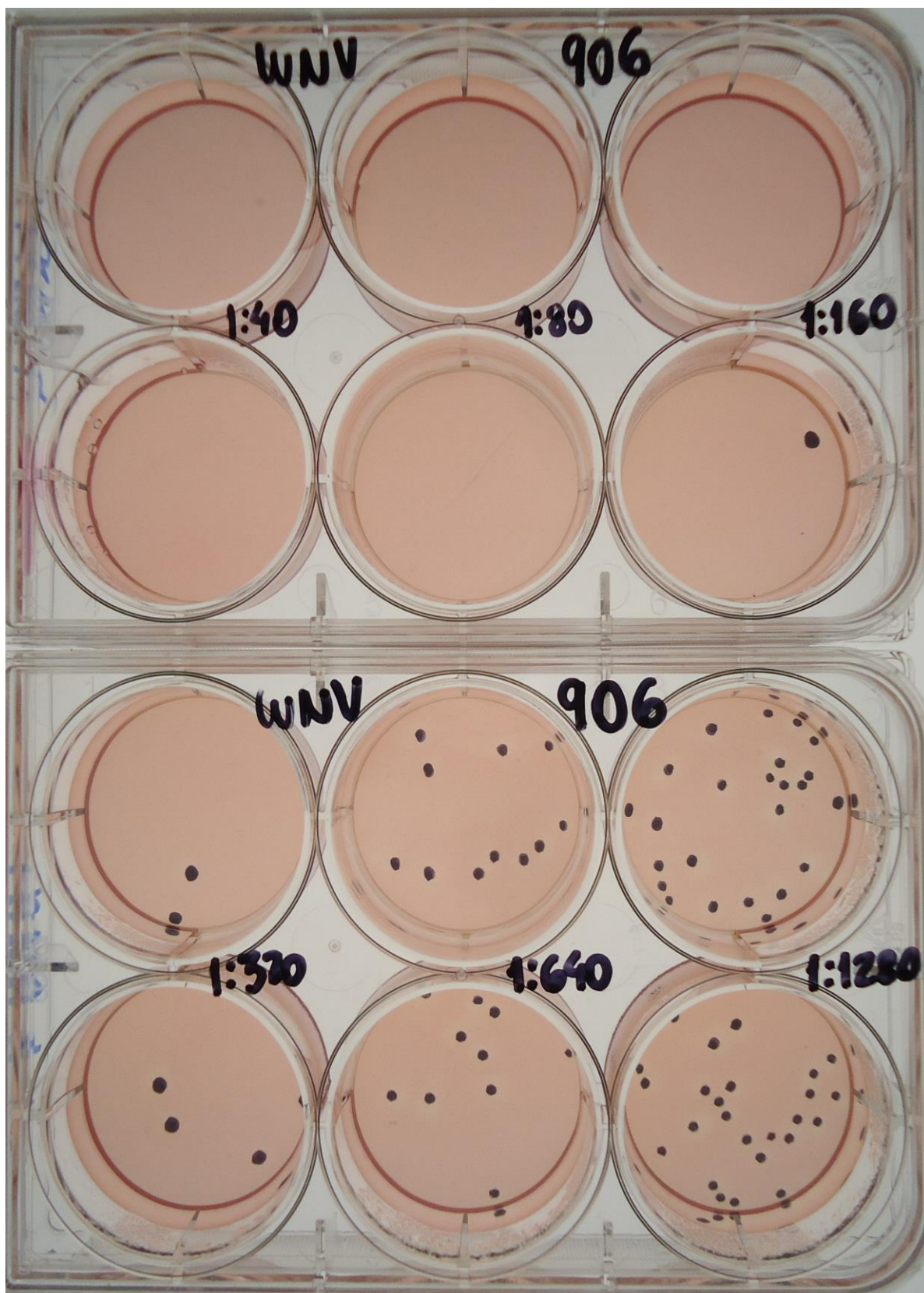


Foto 4.6 – Microplacas de PRNT<sub>90</sub> para WNV com a amostra de soro do equídeo 906 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por WNV foram marcadas em preto para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT<sub>90</sub> para WNV desta amostra foi de 1:320. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



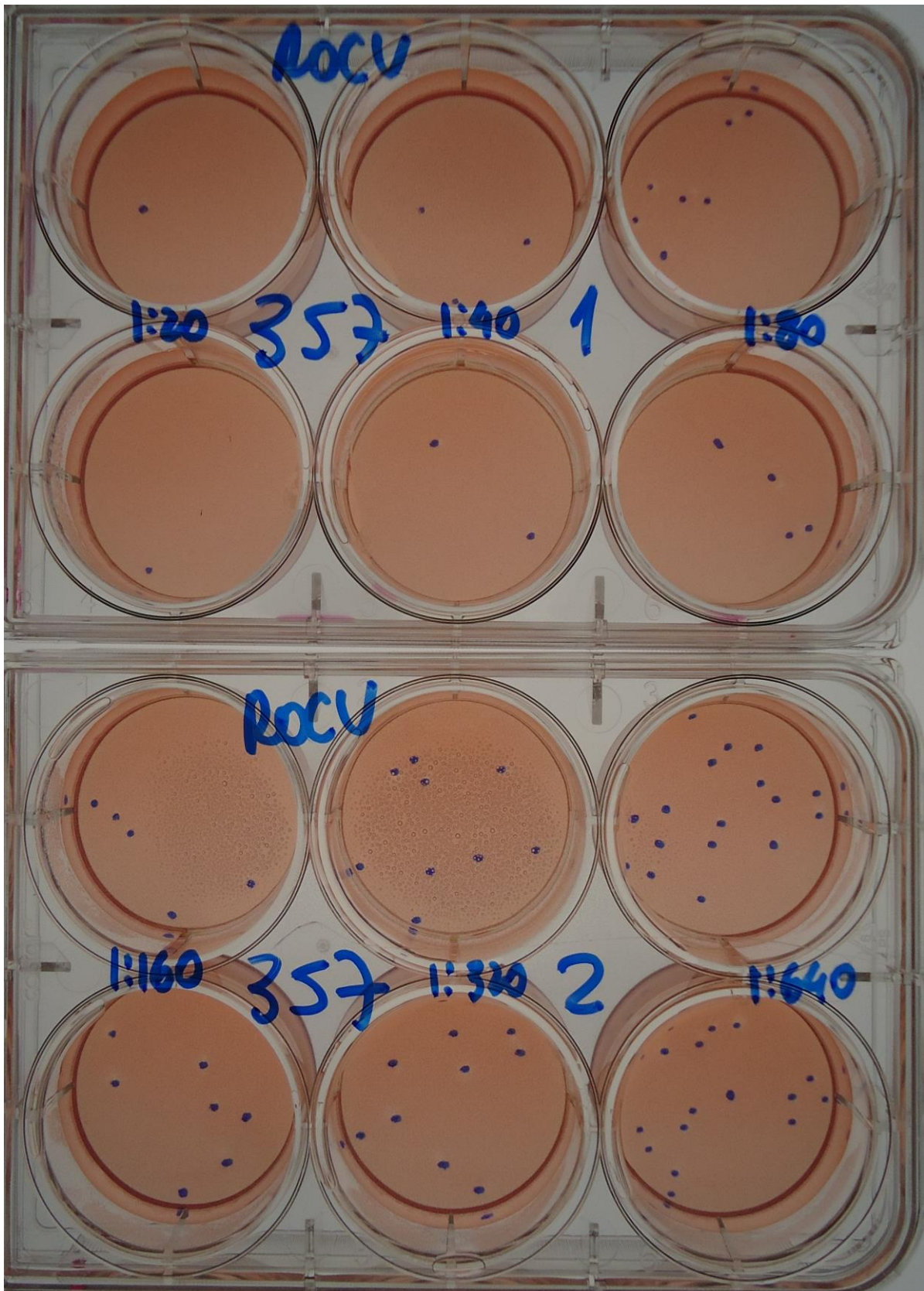


Foto 4.7 – Microplacas de PRNT<sub>90</sub> para ROCV com a amostra de soro do equídeo 357 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por ROCV foram marcadas em azul para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT<sub>90</sub> para ROCV desta amostra foi de 1:160. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



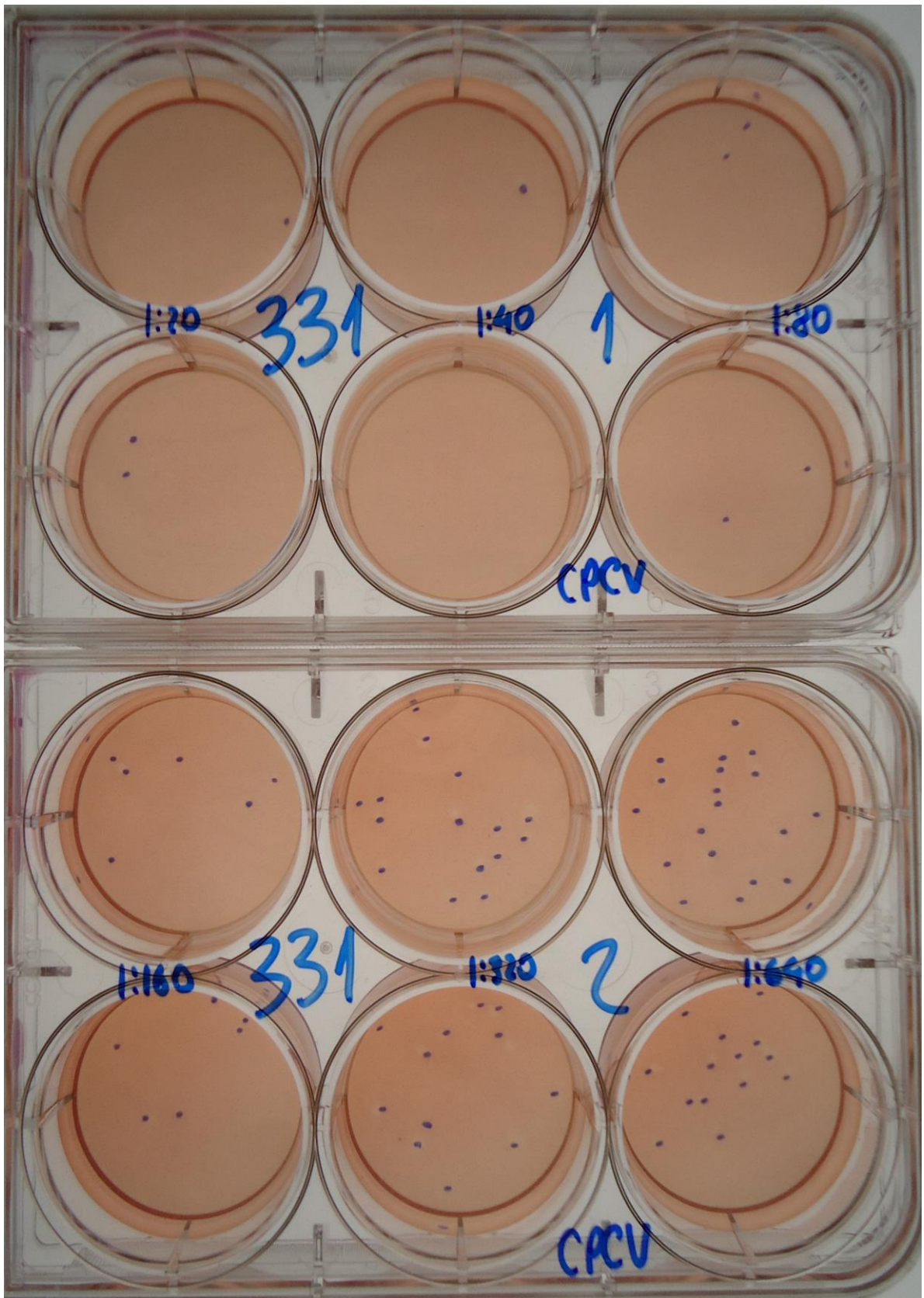


Foto 4.8 – Microplacas de PRNT<sub>90</sub> para CPCV com a amostra de soro do equídeo 331 em seis diluições em duplicatas. As placas formadas por CPCV foram marcadas em azul para facilitar visualização e contagem. O título de PRNT<sub>90</sub> para CPCV desta amostra foi de 1:160. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.



Quadro 4.2 – Resultados de PRNT<sub>90</sub> em amostras soropositivas no ELISA de bloqueio de equídeos do Pantanal de MS.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PA	214	67%	1:320	1:20	<1:10	<1:40	<1:20	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	WNV
PA	250	55%	1:160	<1:10	<1:10	<1:40	<1:20	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	WNV
PF	280	65%	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:20	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	WNV
PE	285	91%	1:160	<1:10	<1:10	<1:40	<1:20	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	WNV
PE	306	74%	1:320	1:10	<1:10	<1:40	1:80	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	WNV
PH	316	35,5%	1:160	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PH	327	65,8%	1:40	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PP	394	56,4%	1:160	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PP	422	37,6%	1:40	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PN	461	73,3%	1:80	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PR	664	53,0%	1:40	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PI	687	48,7%	1:80	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PJ	755	54,5%	1:160	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PJ	786	48,8%	1:40	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PJ	795	63,8%	1:80	1:20	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PJ	807	54,7%	1:160	<1:20	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PG	827	45,5%	1:160	<1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PG	828	38,7%	1:160	1:40	<1:10	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PG	830	78,1%	1:160	1:40	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	WNV
PG	846	45,4%	1:40	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PG	879	74,8%	1:80	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PG	883	62,1%	1:160	1:40	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PG	890	59,0%	1:160	1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PD	906	47,4%	1:320	1:40	<1:10	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PD	917	36,1%	1:40	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PD	921	68,1%	1:160	1:20	<1:10	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	WNV
PC	940	53,2%	1:40	<1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	WNV
PB	158	60%	1:20	1:80	<1:10	1:10	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PB	174	68%	<1:10	1:40	<1:10	<1:20	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PB	182	64%	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PA	208	71%	1:20	1:160	1:10	1:40	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PA	211	83%	1:10	≥1:320	<1:10	<1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PA	220	62%	1:10	1:160	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PF	268	58%	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PF	269	73%	1:20	1:80	<1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PE	305	76%	1:20	≥1:320	1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	SLEV
PH	333	30,5%	<1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PH	342	32,3%	<1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PM	352	36,4%	<1:20	1:40	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PM	363	44,0%	<1:20	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PL	391	40,9%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PP	398	42,4%	<1:20	1:320	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PN	462	42,9%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PQ	524	55,0%	<1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PR	559	36,6%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PR	578	61,2%	<1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PR	669	69,9%	<1:20	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PI	684	74,3%	1:20	1:80	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	694	74,3%	1:20	1:160	1:10	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	SLEV
PJ	705	35,8%	1:20	1:160	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	SLEV
PJ	707	37,8%	<1:20	1:80	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	708	74,2%	<1:20	1:160	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	SLEV
PJ	726	54,0%	<1:20	1:40	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	734	35,9%	<1:20	1:80	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	735	38,8%	<1:20	1:40	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	756	42,7%	1:20	1:80	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PJ	761	68,4%	1:20	1:80	1:10	1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	768	51,6%	<1:20	1:160	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	775	79,2%	1:40	1:640	<1:10	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	778	52,3%	1:20	1:80	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	784	32,4%	1:20	1:80	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PJ	789	50,0%	<1:20	1:80	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PG	832	64,6%	<1:20	1:40	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PG	869	64,5%	1:20	1:160	1:20	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PG	870	37,6%	<1:20	1:40	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PG	882	80,5%	<1:20	1:160	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PD	916	30,4%	<1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PD	929	59,2%	<1:20	1:40	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	936	70,6%	1:20	1:80	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	944	67,8%	<1:20	1:80	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	971	58,5%	1:20	1:80	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	972	35,7%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	976	90,1%	1:20	1:160	<1:10	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	SLEV
PC	981	50,3%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	986	48,8%	<1:20	1:80	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	987	51,5%	<1:20	1:80	<1:10	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	996	79,0%	<1:20	1:160	1:20	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	1011	47,2%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	1014	59,9%	<1:20	1:80	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PC	1021	70,0%	<1:20	1:1280	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	SLEV
PO	1023	40,03%	<1:20	1:80	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PO	1024	68,6%	<1:20	1:80	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PO	1031	51,7%	<1:20	1:80	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV
PO	1038	40,1%	<1:20	1:80	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	SLEV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PA	202	83%	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N
PA	246	35%	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	N
PH	332	40,3%	<1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	N
PP	395	37,6%	<1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	N
PR	601	30,1%	<1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	N
PR	640	40,3%	<1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	N
PD	904	32,4%	<1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	N
PM	357	70,0%	1:40	1:40	1:160	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ROCV
PB	136	75%	<1:10	1:20	1:20	1:80	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PB	140	44%	<1:10	1:20	<1:10	≥1:160	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PB	145	87%	1:10	1:40	1:10	≥1:320	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PB	160	79%	<1:10	<1:10	<1:10	>1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PB	162	61%	<1:10	<1:10	<1:10	>1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PB	183	68%	<1:10	1:10	<1:10	1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PA	190	53%	<1:10	1:40	<1:10	≥1:160	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PA	197	43%	<1:10	<1:10	<1:10	>1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PA	199	84%	<1:10	<1:10	<1:10	>1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PA	207	71%	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PA	216	85%	1:80	1:20	1:20	≥1:320	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PA	241	35%	<1:10	<1:10	<1:10	≥1:80	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PF	253	75%	<1:10	<1:10	<1:10	>1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PF	270	40%	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PF	271	44%	1:20	1:10	<1:10	≥1:160	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PE	283	53%	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PE	290	48%	<1:10	<1:10	<1:10	1:80	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PE	309	73%	<1:10	1:10	<1:10	1:80	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ILHV
PH	317	71,8%	1:20	<1:20	1:20	1:80	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PH	324	45,4%	<1:20	<1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PH	328	31,3%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PH	335	68,7%	1:20	<1:20	1:10	1:1280	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PM	358	33,9%	<1:20	1:20	<1:10	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PL	380	33,9%	<1:20	<1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PL	383	61,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PP	399	71,9%	<1:20	1:80	1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PP	403	52,9%	1:20	<1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PP	417	32,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PP	421	58,7%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PP	424	57,5%	<1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PP	425	34,4%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	431	64,8%	<1:20	<1:20	1:10	1:160	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	432	39,8%	<1:20	<1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	433	31,9%	<1:20	1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	434	48,8%	<1:20	1:20	1:40	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	444	50,1%	<1:20	<1:20	1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	448	36,8%	<1:20	1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	452	53,2%	1:40	<1:20	<1:10	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PN	460	51,6%	1:20	<1:20	<1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	464	32,6%	<1:20	1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PN	467	46,0%	<1:20	<1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PN	469	49,9%	<1:20	<1:20	<1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PQ	527	40,8%	<1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PR	606	70,9%	1:20	<1:20	1:20	1:320	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PR	607	42,6%	<1:20	<1:20	<1:20	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PR	619	72,3%	<1:20	<1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PR	661	32,8%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PR	667	63,8%	1:40	<1:20	1:10	1:160	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PI	675	56,1%	<1:20	1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PI	682	64,9%	<1:20	1:40	1:20	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PI	685	43,5%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PI	690	73,9%	<1:20	1:20	1:20	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	692	73,2%	1:40	1:40	1:10	1:320	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PJ	695	46,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	698	47,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	701	59,3%	<1:20	<1:20	<1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PJ	702	46,0%	1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	710	41,9%	1:20	<1:20	1:40	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	711	71,9%	<1:20	1:40	1:40	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PJ	722	82,4%	1:40	<1:20	<1:10	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	725	66,2%	1:20	1:40	1:40	1:320	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PJ	753	42,5%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PJ	801	60,9%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PJ	802	39,5%	<1:20	1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PJ	808	53,7%	<1:20	1:40	1:40	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	ILHV
PJ	811	57,9%	<1:20	1:40	<1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	817	56,4%	<1:20	<1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	820	69,4%	<1:20	1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	ILHV
PG	831	34,7%	<1:20	<1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	834	67,9%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	840	77,0%	1:20	1:80	1:20	1:320	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV
PG	852	60,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	859	33,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	860	71,1%	<1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	863	30,2%	1:80	1:40	<1:10	1:320	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	868	65,0%	1:20	1:40	1:20	1:160	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	ILHV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PG	873	55,9%	1:20	1:20	<1:10	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	874	47,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	881	66,1%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PG	887	36,7%	1:20	<1:20	1:10	1:80	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PD	899	52,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PD	918	67,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	968	42,9%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	969	34,1%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	974	64,1%	<1:20	1:40	1:10	1:320	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	977	52,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	979	52,0%	1:20	<1:20	<1:10	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	985	71,0%	1:20	<1:20	1:20	1:160	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	988	67,0%	<1:20	1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	999	72,0%	1:20	1:20	1:40	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	1004	66,7%	1:20	<1:20	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	1012	30,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PC	1017	74,0%	1:20	1:20	1:20	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PO	1029	40,3%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	ILHV
PA	194	79%	1:20	1:20	1:20	<1:40	1:160	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	CPCV
PA	203	82%	<1:10	1:20	1:20	<1:40	1:160	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	CPCV
PE	303	53%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	CPCV
PQ	517	76,6%	1:80	1:20	1:40	1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	CPCV
PQ	530	50,7%	1:20	1:20	<1:10	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	CPCV
PB	141	75%	<1:10	<1:10	<1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	142	40%	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	148	57%	<1:10	<1:10	<1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	151	71%	1:80	<1:10	<1:10	1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	153	50%	1:20	<1:10	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-) Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PB	154	80%	<1:10	1:10	1:10	1:40	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	155	69%	<1:10	1:40	<1:10	1:10	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	157	62%	1:40	1:40	<1:10	1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	159	59%	<1:10	1:20	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	161	36%	1:160	1:10	<1:10	<1:40	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	164	78%	<1:10	1:20	1:10	<1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	165	77%	<1:10	1:80	1:10	1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	167	75%	1:20	1:80	<1:10	<1:40	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	168	73%	1:20	<1:10	1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	169	59%	1:10	<1:10	1:20	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	170	92%	1:20	<1:10	1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PB	188	79%	<1:10	1:20	<1:10	1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	189	48%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	192	61%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	193	37%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	195	76%	1:20	<1:10	<1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	196	75%	1:20	1:80	1:20	1:40	1:160	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	198	86%	1:20	1:10	<1:10	<1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	200	81%	<1:10	1:20	<1:10	<1:40	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	201	68%	1:10	<1:10	<1:10	<1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	204	72%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	205	57%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	209	35%	1:20	<1:10	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	210	59%	<1:10	1:20	<1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	212	72%	<1:10	1:10	<1:10	<1:40	1:20*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	213	85%	1:20	1:160	1:10	<1:40	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	215	85%	1:20	1:40	<1:10	<1:40	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	219	69%	<1:10	1:20	1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.



Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PA	222	81%	1:40	<1:10	1:20	1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	223	58%	1:40	1:10	<1:10	1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	227	44%	<1:10	<1:10	<1:10	<1:40	1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	228	55%	1:80	1:20	<1:10	<1:40	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	243	81%	1:80	1:40	<1:10	<1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PA	248	70%	1:10	1:80	1:10	1:80	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	251	90%	1:80	<1:10	1:20	1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	252	89%	1:20	1:80	1:40	1:160	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	254	52%	1:20	1:10	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	255	74%	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	256	54%	<1:10	1:20	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	259	69%	<1:10	<1:10	1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	260	93%	1:160	1:80	1:10	<1:40	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	261	84%	1:320	1:160	1:20	<1:40	1:80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	265	75%	<1:10	1:40	<1:10	1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PF	272	84%	1:40	1:40	1:20	1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	284	67%	<1:10	1:10	<1:10	<1:40	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	294	38%	1:10	<1:10	<1:10	1:80	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	298	83%	1:80	1:160	<1:10	<1:40	1:40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	300	58%	1:40	<1:10	<1:10	<1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	301	65%	<1:10	1:10	<1:10	<1:40	<1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	307	37%	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PE	311	60%	<1:10	1:40	<1:10	1:40	1:20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	FLAV
PH	313	61,1%	<1:20	1:40	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	314	51,1%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	318	47,8%	1:80	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	319	64,3%	1:40	<1:20	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	320	68,2%	<1:20	1:40	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PH	321	68,1%	<1:20	1:40	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	322	69,1%	1:40	1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	326	41,1%	<1:20	<1:20	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	330	75,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	331	49,0%	1:80	<1:20	1:10	1:80	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10	FLAV
PH	334	48,4%	<1:20	1:40	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	336	34,1%	<1:20	1:20	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	337	39,9%	<1:20	1:40	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	338	41,8%	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	339	47,1%	<1:20	1:40	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PH	341	33,8%	<1:20	<1:20	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	344	66,9%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	345	30,4%	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	346	48,4%	1:20	1:40	1:40	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	347	57,9%	<1:20	1:40	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	351	68,8%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	353	38,7%	<1:40	<1:40	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	354	57,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	360	32,5%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	361	41,6%	1:20	1:80	1:80	1:20	1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10	FLAV
PM	366	56,3%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	369	44,6%	<1:20	<1:20	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10	FLAV
PM	370	42,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10	FLAV
PM	372	44,7%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	373	42,3%	<1:20	1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PM	375	40,3%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PL	377	66,8%	1:40	1:40	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PL	378	43,9%	<1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PL	384	49,7%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PL	386	38,9%	<1:20	1:20	1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PL	389	42,9%	<1:20	<1:20	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	396	31,6%	1:20	1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	397	37,4%	<1:20	1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	406	73,9%	1:40	1:20	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PP	408	39,6%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	410	38,1%	1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	411	34,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	413	63,0%	<1:20	<1:20	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PP	418	54,7%	<1:20	1:40	1:10	1:40	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	427	51,7%	1:20	<1:20	1:40	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	428	64,5%	<1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	436	76,1%	1:20	1:80	1:10	1:40	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	1:10	FLAV
PN	438	62,4%	1:80	1:20	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	440	63,2%	<1:20	1:160	1:10	1:320	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	445	47,6%	1:40	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	450	49,2%	1:40	1:20	1:10	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	453	73,2%	1:80	<1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PN	455	37,8%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	463	32,7%	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	466	37,7%	<1:40	<1:40	<1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PN	468	56,1%	<1:20	1:80	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PS	496	57,8%	<1:20	1:40	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PS	499	35,5%	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PS	506	56,3%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PS	512	38,6%	<1:20	1:40	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PQ	515	36,7%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PQ	533	53,3%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	544	60,4%	1:20	<1:20	1:80	1:40	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	546	45,2%	1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	548	31,7%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	568	51,6%	<1:20	1:80	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	570	33,5%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	593	69,8%	<1:20	1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	595	45,4%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	600	68,4%	<1:20	1:80	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	603	36,4%	<1:20	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	612	31,1%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	625	50,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	654	56,9%	1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PR	660	41,8%	1:80	1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	672	72,1%	1:40	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	674	73,4%	1:160	1:20	<1:10	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PI	676	55,6%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	677	50,6%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	680	76,9%	1:160	<1:20	<1:10	1:40	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	681	80,0%	1:40	1:80	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	686	50,6%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PI	688	44,8%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	691	69,9%	1:40	1:80	1:40	1:40	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	693	69,0%	1:40	1:20	1:10	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	696	38,6%	<1:20	<1:20	1:80	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	697	34,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	699	37,5%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	<1:10	FLAV
PJ	700	58,6%	1:20	1:80	1:40	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PJ	703	38,1%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	704	67,3%	<1:20	1:40	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	<1:10	FLAV
PJ	706	78,2%	1:20	1:80	1:80	1:80	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	709	41,9%	1:20	1:40	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	715	53,1%	1:20	<1:20	1:80	1:80	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	716	38,8%	<1:20	1:40	1:20	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	FLAV
PJ	717	45,0%	<1:20	1:80	1:40	1:80	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	719	38,6%	1:20	1:20	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	720	47,9%	1:160	1:80	<1:10	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	723	63,6%	<1:20	1:40	1:40	1:10	1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	724	70,3%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	727	55,0%	1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	728	53,1%	<1:20	1:40	1:20	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	729	63,0%	1:20	1:80	1:40	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	730	41,2%	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	731	32,7%	<1:20	<1:20	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	732	63,3%	1:40	<1:20	<1:10	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	733	32,3%	<1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	738	39,6%	<1:20	<1:20	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	739	39,7%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	740	57,2%	<1:20	1:80	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	750	60,3%	1:80	1:160	<1:10	1:40	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	758	48,2%	<1:20	1:80	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	762	51,8%	<1:20	1:40	1:40	1:80	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	764	78,2%	<1:20	1:80	<1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	766	36,5%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	FLAV
PJ	772	49,7%	1:20	1:40	<1:10	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	773	54,2%	1:20	1:80	<1:10	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PJ	774	75,9%	<1:20	1:40	1:10	1:80	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	779	43,6%	1:20	1:20	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	781	67,5%	1:320	1:160	<1:10	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	782	45,1%	1:20	1:80	<1:10	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	783	30,3%	<1:20	1:40	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	803	81,0%	1:80	1:80	1:40	1:40	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	804	51,7%	1:80	1:20	<1:10	1:80	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	805	58,5%	<1:20	1:40	1:20	1:80	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	806	54,9%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	809	43,8%	1:160	1:80	<1:10	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	810	34,6%	<1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PJ	812	60,2%	1:20	1:80	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	814	73,4%	<1:20	1:20	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	815	49,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	816	57,6%	1:20	<1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	822	58,5%	1:40	1:160	<1:10	1:320	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	823	53,6%	<1:20	1:20	1:20	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	824	67,0%	1:40	1:40	1:10	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	826	41,2%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	829	71,3%	<1:20	1:80	1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	835	34,2%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	836	57,4%	1:20	<1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	838	74,1%	1:20	1:80	1:20	1:160	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	839	32,6%	<1:20	1:40	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	841	30,0%	1:20	<1:20	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	842	44,5%	1:40	1:80	<1:10	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	843	82,2%	1:80	1:40	1:40	1:80	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	844	33,8%	<1:20	1:20	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PG	845	66,7%	1:20	1:160	1:80	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	847	44,4%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	848	38,3%	<1:20	1:40	1:20	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	849	67,8%	1:20	1:160	1:80	1:40	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	850	76,6%	1:20	<1:20	1:10	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	853	35,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	857	64,1%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	862	47,6%	1:20	1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	865	62,9%	1:20	1:40	1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	866	77,9%	1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	871	64,9%	<1:20	1:80	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	872	56,1%	<1:20	1:20	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	875	45,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	876	71,6%	<1:20	1:160	1:10	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	877	51,0%	1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	878	75,3%	1:80	1:160	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	880	44,6%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	884	67,6%	1:20	1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	886	53,9%	1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	888	66,0%	1:20	1:40	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	889	37,5%	1:20	1:20	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	891	51,3%	1:80	<1:20	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PG	892	68,9%	1:40	1:20	<1:10	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	893	44,7%	<1:20	1:40	<1:10	1:80	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	FLAV
PG	895	44,6%	<1:20	1:40	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	897	39,6%	<1:20	1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PG	898	73,4%	<1:20	1:80	1:20	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	900	35,9%	1:40	1:40	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PD	903	37,4%	<1:20	1:40	<1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	908	41,2%	1:20	1:40	<1:10	1:40	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	909	43,3%	1:20	1:20	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	911	58,2%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	912	39,6%	1:20	1:20	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	915	36,1%	<1:20	<1:20	1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PD	928	65,9%	<1:20	1:40	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	937	33,8%	<1:20	1:80	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	938	67,2%	1:20	1:160	1:20	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PC	941	49,7%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	943	69,5%	1:20	1:80	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PC	954	40,8%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	964	63,8%	<1:20	1:80	1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	965	67,9%	1:40	<1:20	<1:10	1:80	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	966	75,1%	1:40	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PC	967	64,9%	<1:20	1:20	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	970	67,6%	1:160	<1:20	1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	975	60,6%	1:20	1:80	1:320	1:320	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	980	78,0%	1:20	<1:20	<1:10	1:80	1:160	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	982	82,4%	1:20	1:40	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PC	983	78,0%	<1:40	<1:20	1:10	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	FLAV
PC	984	61,5%	1:40	<1:20	1:10	1:40	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PC	989	32,0%	<1:20	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	990	33,8%	<1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	992	72,8%	1:20	1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	993	51,0%	1:20	1:40	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	994	41,2%	<1:20	1:40	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	997	52,7%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.



Quadro 4.2 – Continuação.

P	N	E	WNV	SLEV	ROCV	ILHV	CPCV	BSQV	D-1	D-2	D-3	D-4	YFV	IGUV	I
PC	998	71,1%	1:40	1:40	1:20	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1000	73,8%	1:80	1:20	1:10	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1001	73,7%	1:40	<1:20	1:20	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1002	69,6%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1006	54,9%	1:20	<1:20	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1008	43,1%	<1:20	1:40	1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1009	81,1%	1:20	1:40	<1:10	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1010	64,9%	1:80	1:80	1:10	1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1013	55,3%	1:20	1:20	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1015	63,9%	1:80	<1:20	<1:10	1:80	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1016	48,3%	<1:20	1:80	<1:10	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1018	33,0%	<1:20	<1:20	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PC	1019	76,6%	<1:20	1:160	<1:10	1:80	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PC	1020	82,4%	1:80	1:40	<1:10	1:80	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	FLAV
PC	1022	56,7%	<1:20	<1:20	<1:10	1:40	1:40	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	FLAV
PO	1028	44,5%	<1:20	<1:20	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PO	1030	55,9%	1:20	1:40	1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV
PJ	1077	65,6%	<1:20	1:80	1:10	1:40	<1:10	<1:10	1:20	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	FLAV

P- Propriedade; N- Número do animal; E- ELISA de bloqueio; D-1- DENV-1; D-2- DENV-2; D-3- DENV-3; D-4- DENV-4; N- Soronegativo por PRNT<sub>90</sub>; I- Interpretação; (-)- Não testado.

Dos 94 equídeos soropositivos para ILHV, 51 (54,3%) eram equinos machos castrados, 36 (38,3%) eram éguas e sete (7,4%) equinos machos inteiros. Entre os 57 soropositivos para SLEV, 34 (59,6%) eram equinos machos castrados, 18 (31,6%) éguas, dois (3,5%) equinos machos inteiros, dois (3,5%) eram mulas um (1,8%) burro. Dos 27 soropositivos para WNV, 12 (44,4%) eram éguas, 13 (48,1%) eram equinos machos castrados e dois (7,4%) eram equinos machos inteiros. Com relação ao CPCV, dos cinco animais soropositivos, quatro (80%) eram equinos machos castrados e uma (11,1%) era égua. O único animal soropositivo para ROCV era um equino macho castrado e entre os sete animais soronegativos, cinco eram equinos machos castrados, uma mula e uma égua (Figura 4.7, 4.8).

Com relação à distribuição entre os animais soropositivos por sua faixa etária e condição de doma, dos cinco animais soropositivos para CPCV, quatro (80%) eram domados e um era não domado (20%). Com relação à faixa etária, três (60%) animais tinham acima de seis anos de idade, um (20%) não tinha registro de idade e o outro (20%) tinha cinco anos de idade.

Entre os 275 soropositivos para flavivírus indeterminado, 225 (81,8%) eram domados, 42 (15,3%) eram não domados, três (1,1%) eram redomões, isto é, estavam em processo de doma e para cinco (1,8%) animais não havia registro sobre a condição de doma. Com relação à faixa etária, cinco (1,8%) animais tinham entre um e dois anos, 22 (8%) tinham entre três e cinco anos e 118 (42,9%) tinham seis ou mais anos e 130 (47,3%) não tinham registro de idade (Figura 4.9).

Dos 94 animais soropositivos para ILHV, 75 (79,8%) eram domados, 16 (17%) eram não domados e três (3,2%) eram redomões. Com relação à faixa etária, cinco (5,3%) animais tinham de um até dois anos completos, oito (8,5%) tinham entre três e cinco anos, 42 (44,7%) tinham seis ou mais anos de idade e 39 (41,5%) dos animais não tinham registro de idade.

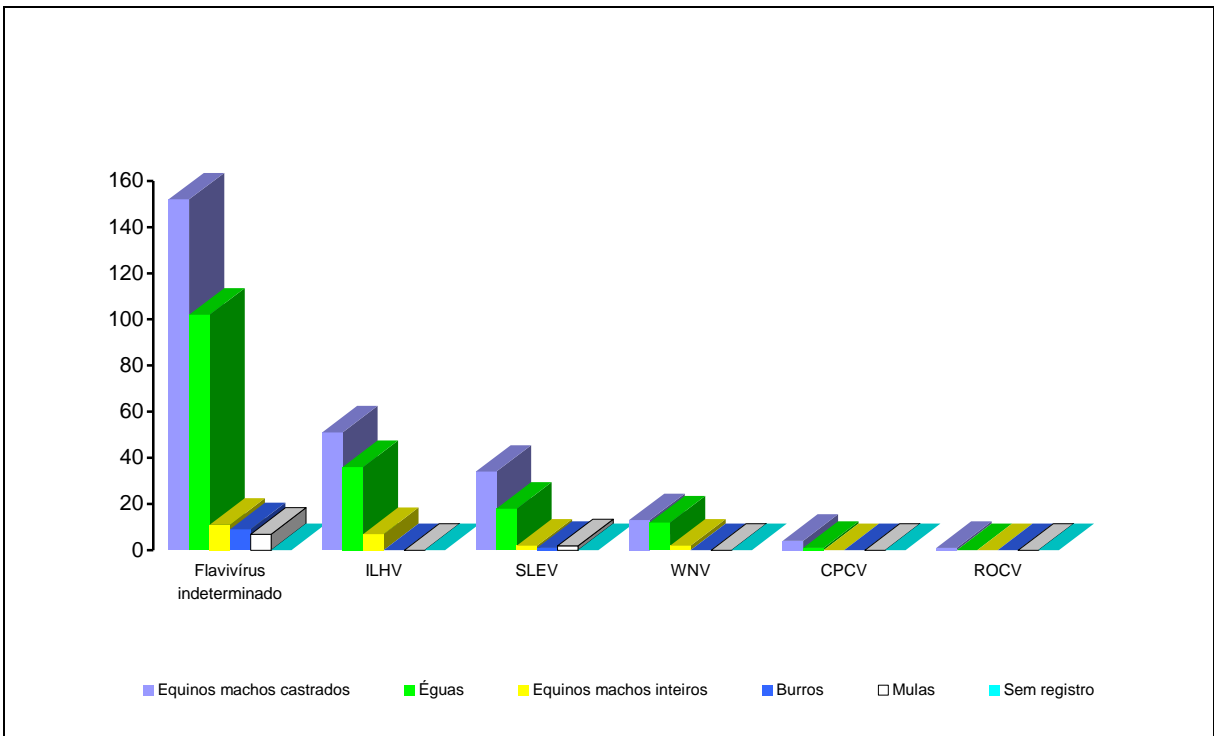


Figura 4.7 – Número absoluto de equídeos soropositivos por PRNT<sub>90</sub> de acordo com o sexo.

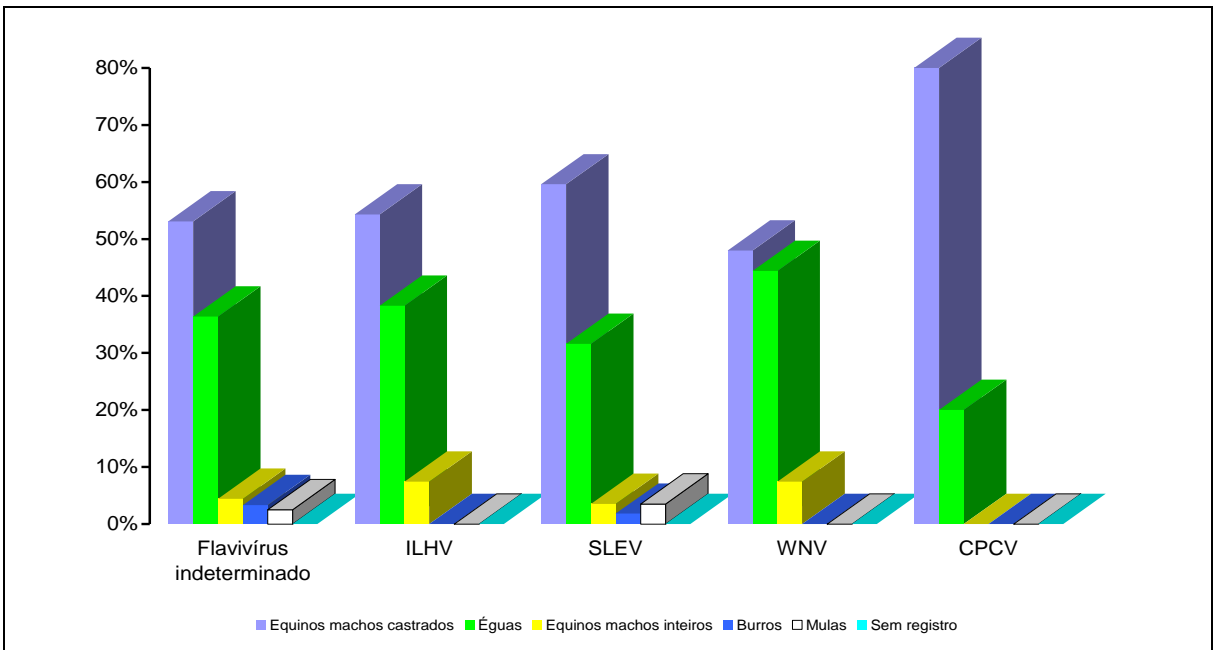


Figura 4.8 – Distribuição de soropositividade por PRNT<sub>90</sub> por sexo e espécie de equídeos.

Entre os 57 animais soropositivos para SLEV, 41 (71,9%) eram domados, dez (17,5%) eram não domados e seis (10,5%) eram redomões. Com relação à faixa etária, três (5,3%) animais tinham de um até dois anos completos, 12 (21,1%) tinham entre três e cinco anos, 20 (35,1%) tinham seis ou mais anos de idade e 22 (38,6%) dos animais não tinham registro de idade.

Dos 27 animais soropositivos para WNV, 23 (85,2%) eram domados e quatro (14,8%) eram não domados. Com relação à faixa etária, um (3,7%) animal tinha dois anos completos, cinco (18,5%) tinham entre três e cinco anos, sete (26%) tinham seis ou mais anos de idade e 14 (51,9%) animais não tinham registro de idade. Dos sete animais soronegativos, um era não domado e seis domados. Três tinham a idade desconhecida e os outros três tinham quatro, nove, dez e dezessete anos. O único animal soropositivo para ROCV era um macho castrado domado sem registro de idade no momento da venopunção (Figura 4.9 e 4.10).

Assim como observado para o ELISA de bloqueio, em que em todas as 18 propriedades amostradas apresentaram animais soropositivos, anticorpos neutralizantes por PRNT<sub>90</sub> para pelo menos um dos flavivírus estudados também foram detectados em todas as 18 propriedades amostradas. À exceção de uma propriedade, em todas as outras de detectou soropositividade para pelo menos um dos flavivírus estudados. Nenhuma propriedade apresentou soropositividade para mais de quatro flavivírus.

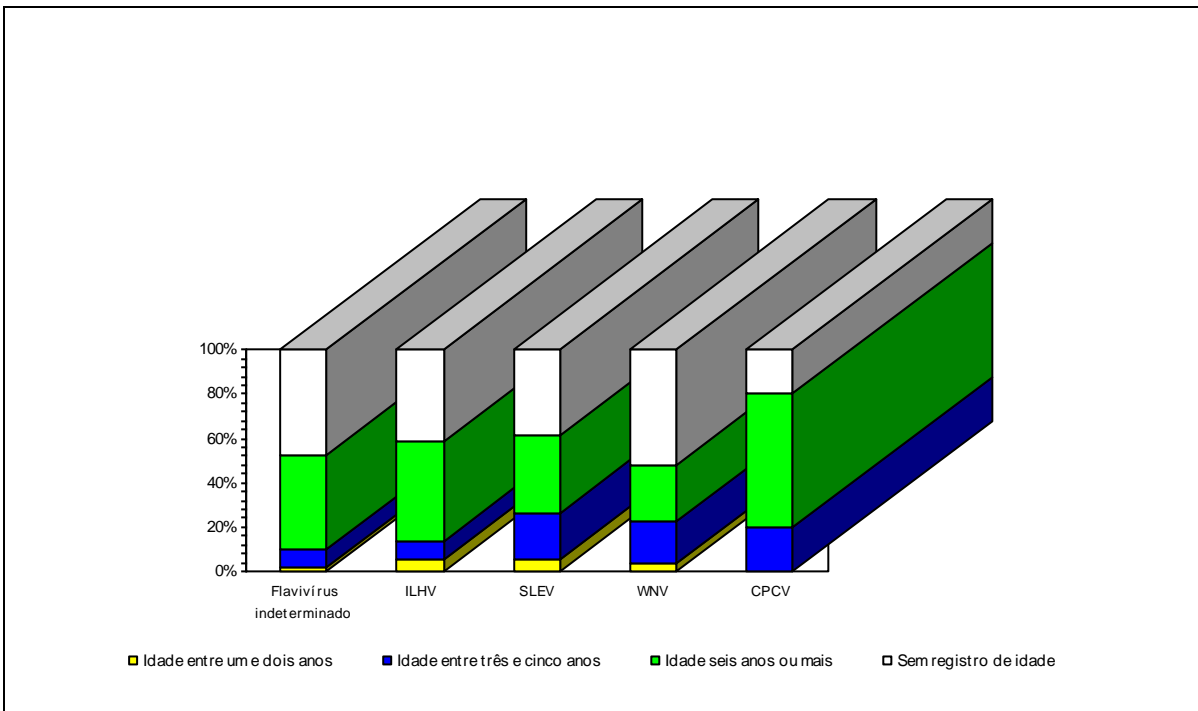


Figura 4.9 – Distribuição por idade dos equídeos soropositivos por PRNT<sub>90</sub>.

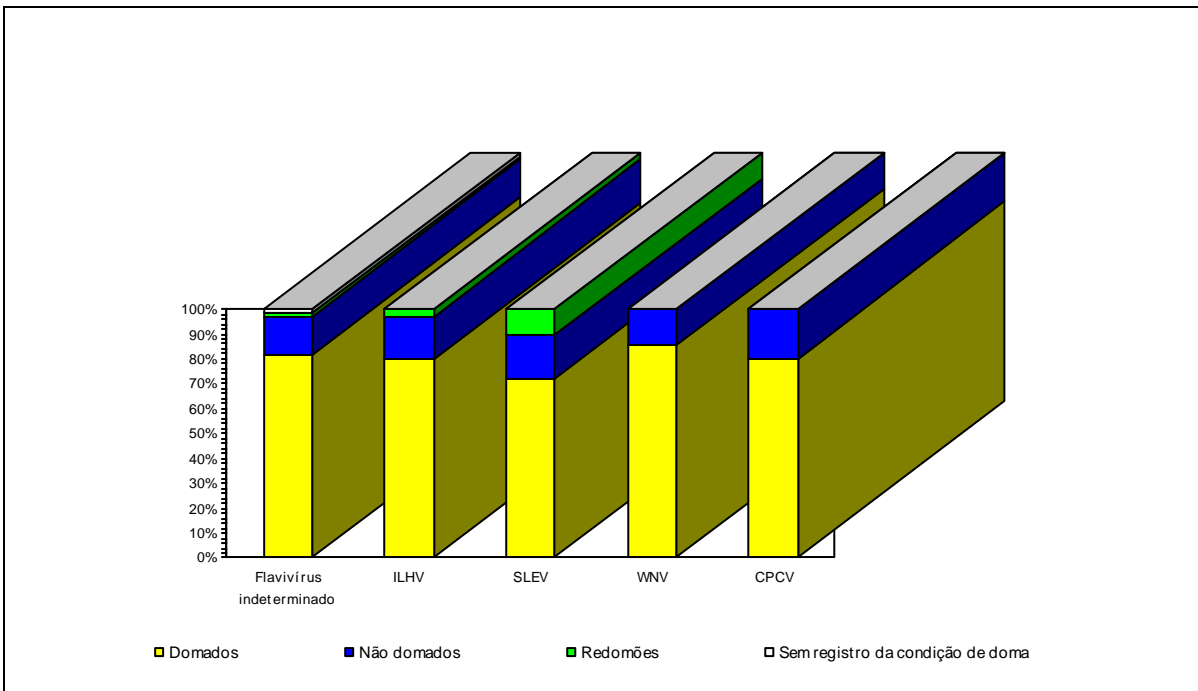


Figura 4.10 – Distribuição de soropositivos por PRNT<sub>90</sub> por condição de doma.

Um grupo de 351 amostras de equídeos soronegativas no ELISA de bloqueio foi submetido ao PRNT<sub>90</sub> para WNV. Trinta (8,5%) amostras apresentaram título de PRNT<sub>90</sub> ≥1:10 e destas, 14 (46,7%) apresentaram título de 1:10, sete (23,3%) 1:20, oito (26,7%) 1:40 e uma (3,3%) 1:80.

#### **4.3.2 Amostras de soro de ovinos**

Embora todas as 238 amostras de soro de ovino tenham sido soronegativas no ELISA de bloqueio, paralelamente todas as amostras também foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV. Das 238 amostras avaliadas, duas (0,8%) amostras de duas fêmeas coletadas em outubro de 2009 apresentaram anticorpos neutralizantes anti-WNV. Um animal amostrado na propriedade PM apresentou título de 1:10 e o outro amostrado na propriedade PQ apresentou título de 1:20. As amostras não foram testadas para outros flavivírus.

#### **4.3.3 Amostras de soro de crocodilianos**

Embora todas as 90 amostras de soro de crocodiliano tenham sido soronegativas no ELISA de bloqueio, paralelamente todas as amostras também foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV. Das 90 amostras avaliadas, quatro (4,5%) apresentaram título de PRNT<sub>90</sub> ≥1:10 para WNV. As quatro amostras foram coletadas no mesmo local em fevereiro de 2009 na propriedade PD de três animais machos e uma fêmea. Com relação aos títulos, entre os machos duas amostras apresentaram título de 1:10 e 1:40 e a fêmea de 1:20.

#### 4.4 CAPTURAS DE CULICÍDEOS E COLETAS DE IXODÍDEOS

No presente estudo, um total de 19 espécies de culicídeos e três de ixodídeos foram identificados entre os 4.514 espécimes de artrópodes amostrados.

##### 4.4.1 Culicídeos

Entre os 4.445 espécimes de culicídeos amostrados, muitos apresentavam estruturas anatômicas danificadas durante a identificação morfológica e por isso 1.459 (32,8%) espécimes foram identificados apenas em gênero e subgênero, com cinco gêneros e quatro subgêneros identificados.

Dos 4.445 espécimes de culicídeos, 1.648 (37,1%) foram capturados em 2009 e 2.797 (62,9%) capturados em 2010. Entre os espécimes capturados em 2009, 1.211 (27,2%) foram capturados em fevereiro e 437 (9,8%) em outubro. Dos 2.797 espécimes capturados em 2010, 2.083 (46,9%) foram capturados em abril e 714 (16,1%) em setembro e outubro (Figura 4.11).

Com relação aos períodos de coleta, foram amostrados 3.294 (74,1%) espécimes durante as estações das chuvas de 2009 e 2010 e 1.151 (25,9%) durante as estações da seca dos mesmos anos (Figura 4.12).

Acerca dos diferentes métodos de captura, 123 (2,8%) espécimes foram capturados com capturador de Castro em jacarés-do-Pantanal, 215 (4,8%) com capturador de Castro em ambiente intradomiciliar, 1.139 (25,6%) através de armadilha luminosa tipo CDC, 1.225 (27,6%) com capturador de Castro em membros da equipe e 1.743 (39,2%) com capturador de Castro em equinos (Figura 4.13).

A espécie *Ochlerotatus scapularis* foi a mais prevalente em fevereiro e outubro de 2009. Em abril de 2010, *Culex Culex* spp., foram as mais prevalentes e em setembro e outubro de 2010, *Culex quinquefasciatus* foi a espécie dominante. Com relação aos métodos de captura, *Culex quinquefasciatus* foi a única espécie identificada em capturas com capturador de Castro em ambiente intradomiciliar (Figura 4.14).

Entre as quatro espécies identificadas pousando sobre espécimes de jacarés-do-Pantanal para hematofagia, *Ochlerotatus scapularis* foi a mais prevalente tendo sido identificada em 43,9% dos espécimes capturados, seguida por *Mansonia titillans* identificado em 40,7% da amostra. Acerca da prevalência em capturas realizadas com armadilha luminosa tipo CDC, pelo menos 13 espécies além de cinco gêneros e três subgêneros foram identificadas. Espécimes identificados como *Culex Culex* spp. foram as mais prevalentes, tendo sido identificados em 43,3% da amostra. *Culex quinquefasciatus* apresentou a segunda maior prevalência e foi identificada em 14,1% da amostra.



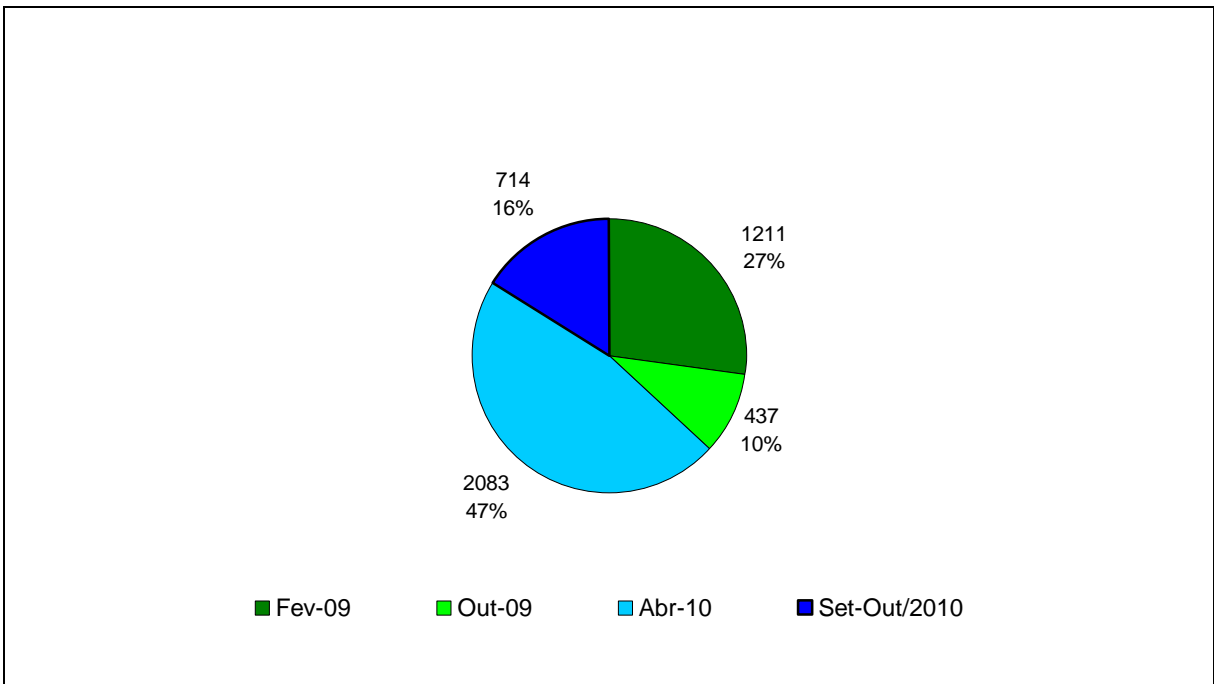


Figura 4.11 – Número de culicídeos capturados por mês e ano.

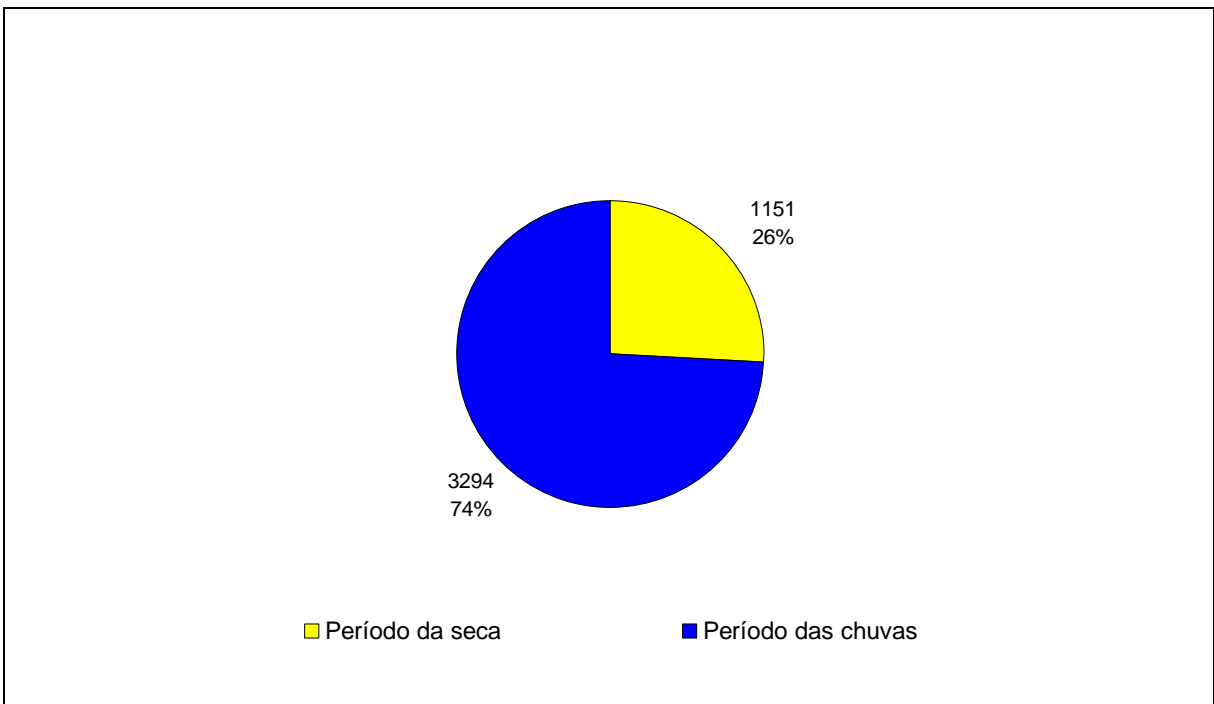


Figura 4.12 – Número de culicídeos capturados por períodos ecologicamente distintos.

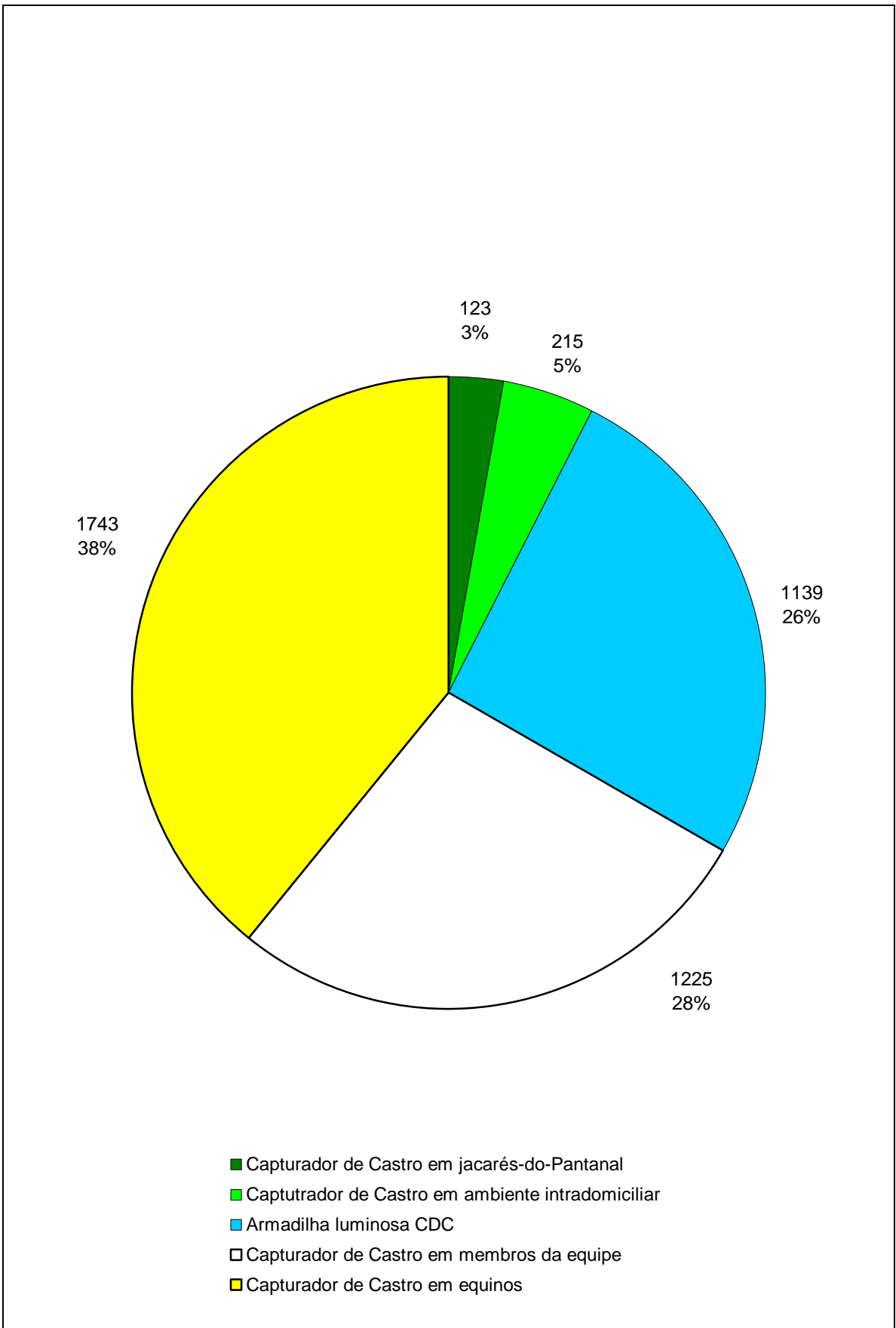


Figura 4.13 – Distribuição dos culicídeos capturados de acordo com o método de captura.

Entre as 13 espécies, três subgêneros e dois gêneros identificados utilizando-se capturador de Castro em membros da equipe, *Ochlerotatus scapularis* foi a mais detectada entre os espécimes capturados durante aproximação para hematofagia em humanos. Dos 1.225 espécimes capturados, 758 (61,9%) foram identificados como *Ochlerotatus scapularis*. Entre as outras espécies *Mansonia titillans* apresentou a segunda maior prevalência, tendo sido identificada em 13,6% dos espécimes capturados (Figura 4.14 e 4.15).

Entre os 1.743 espécimes capturados em cavalos foram identificadas 12 espécies, dois subgêneros e um gênero. Espécimes identificados à *Mansonia* spp. foram os mais prevalentes, 649 (37,2%) do total de culicídeos amostrados em equinos. *Mansonia titillans* e *Ochlerotatus scapularis* apresentaram a segunda e terceira maior prevalência respectivamente, com 235 (13,5%) espécimes identificados à *Mansonia titillans* e 226 (13%) à *Ochlerotatus scapularis*.

Com relação às espécies capturadas durante aproximação para hematofagia nos três diferentes hospedeiros utilizados no presente estudo, *Psorophora albigena*, *Ochlerotatus scapularis*, *Mansonia titillans* e *Mansonia pseudotitillans* foram capturadas nos três hospedeiros utilizados (Quadro 4.3).

#### **4.4.2 Ixodídeos**

Com relação aos 69 ixodídeos capturados, 68 espécimes foram capturados em 28 equinos e apenas um espécime foi coletado em um jacaré-do-Pantanal. Dos 41 grupos submetidos ao isolamento viral, 27 apresentavam espécimes ingurgitados e 14 não ingurgitados. Um total de 21 espécimes de *Amblyomma cajennense*, um espécime identificado como *Amblyomma* sp, coletado em jacaré-do-Pantanal, 44 espécimes de *Anocentor nitens* e três espécimes de *Boophilus microplus* foram identificados. Dezenove espécimes foram coletados em fevereiro de 2009 e 50 espécimes foram coletados em outubro de 2009 em um total de dez propriedades.

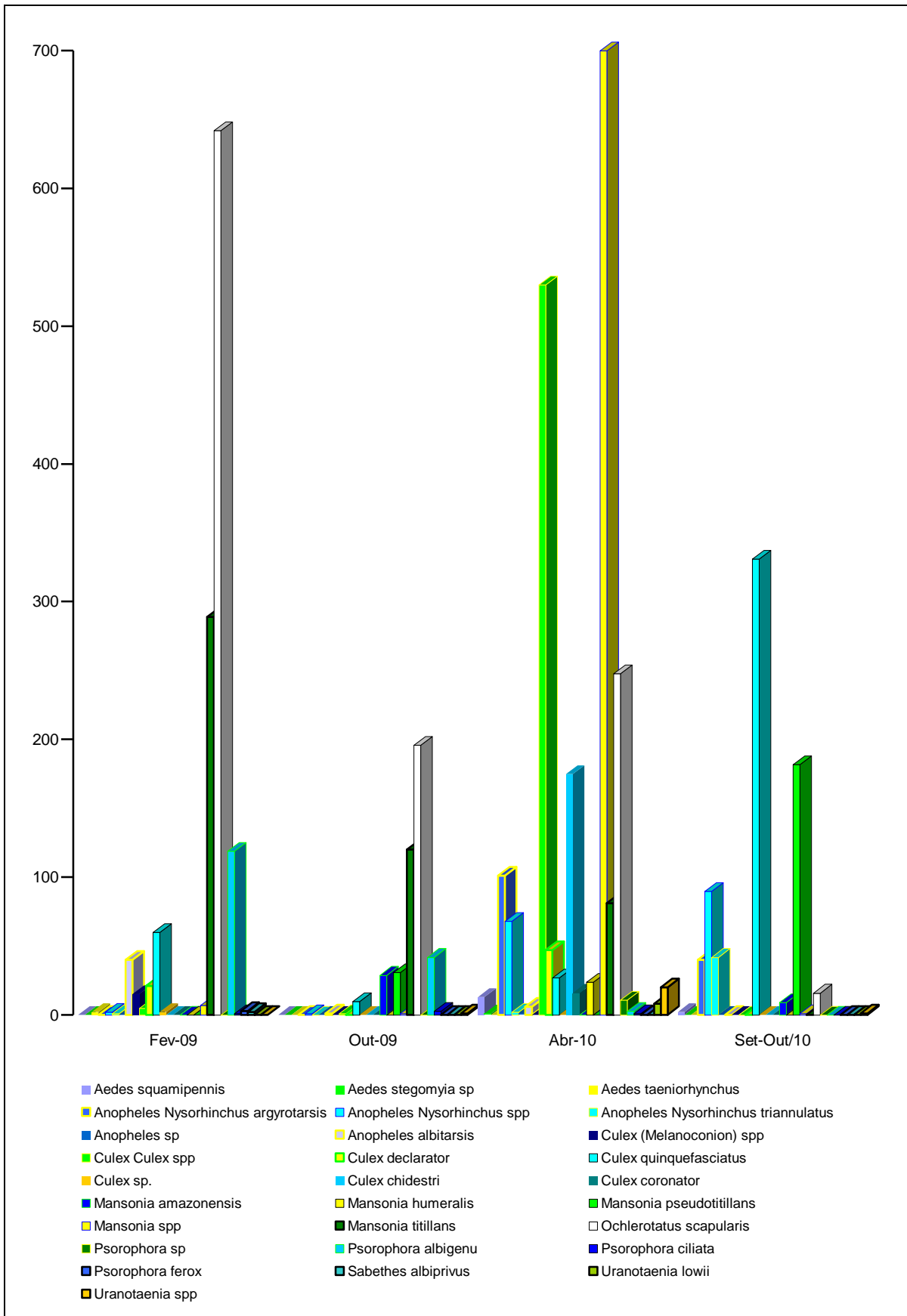


Figura 4.14 – Número absoluto de culicídeos capturados de acordo com o mês e ano de captura.

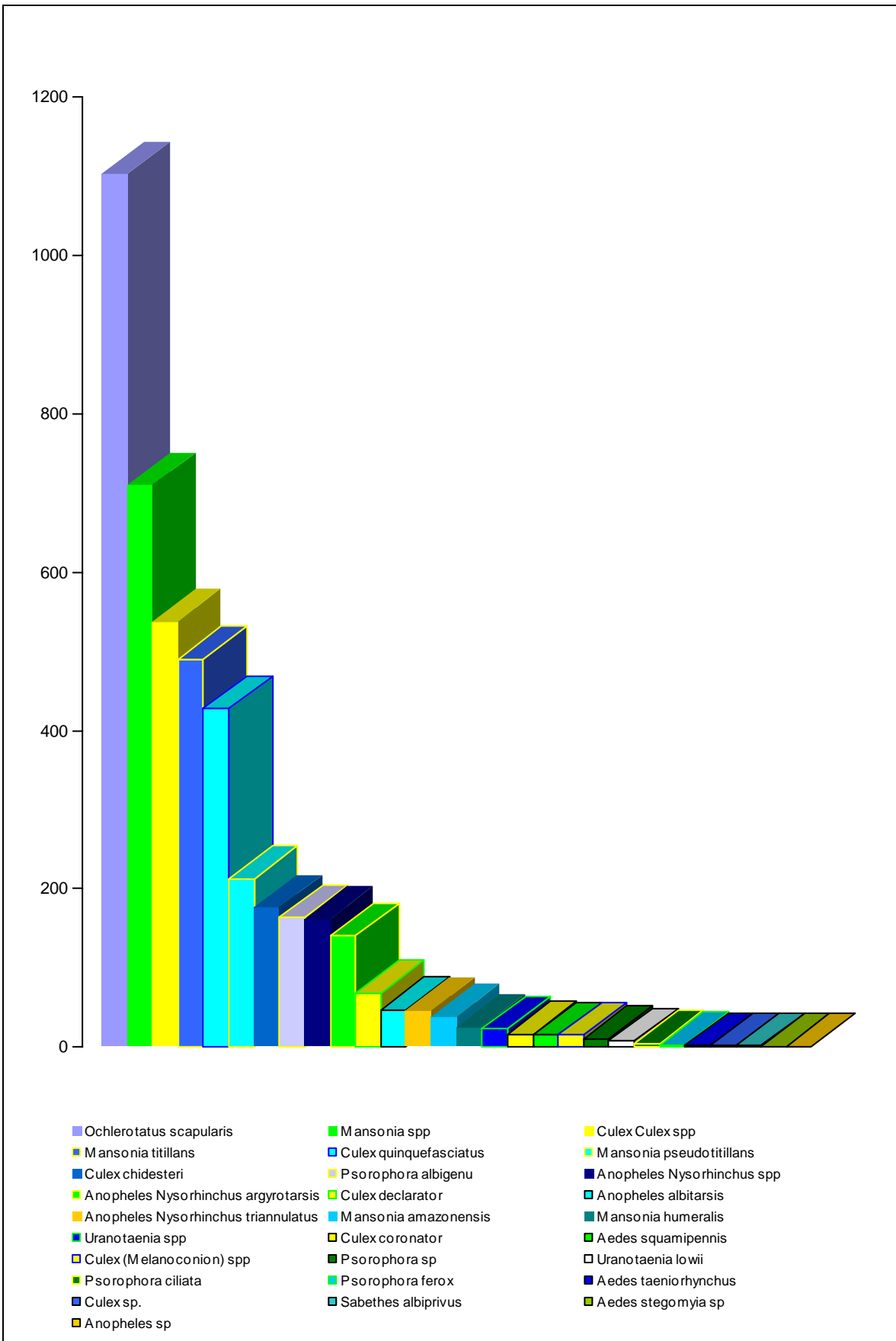


Figura 4.15 – Número total de culicídeos capturados por espécie.

Quadro 4.3– Distribuição por tipo de armadilha e período de coleta de culicídeos capturados no Pantanal de MS em 2009 e 2010.

ESPÉCIE	fev/09				out/09				abr/10				out/10										TOTAL													
	CDC	EQ	H	S-T	CDC	EQ	H	S-T	CDC	EQ	H	S-T	CDC	EQ	H	J	Intradomiciliar	S-T																		
	NI e I	NI e I	NI e I		NI	I	NI	I	NI	I	M	NI	I	M	NI	I	NI	I	M																	
<i>Ochlerotatus scapularis</i>	38	140	464	642	5	2	3	126	6	142	20	1	61	20	139	7	248																		70	1102 (24,8%)
<i>Mansonia</i> spp.	2	5		7	1								1	44	1		384	259																1	709 (16%)	
<i>Culex (Culex)</i> spp.	1	4		5					1	1	384	6	101	26	4	1	8	530																0	536 (12,1%)	
<i>Mansonia titillans</i>	7	209	73	289	19		5	1	45					70	13																			50	490 (11%)	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	12	38	10	60	8			2		10	25		1			1	27	50	8	57	1										87	10	118	331	428 (9,6%)	
<i>Mansonia pseudotitillans</i>				0	2			15		17							0		1		131	45			5	14								196	213 (4,8%)	
<i>Culex chidesteri</i>				0						0	146					27	2	175																0	175 (3,9%)	
<i>Psorophora albigena</i>	30	9	80	119	1			32	4	37			1			2	3																	5	164 (3,7%)	
<i>Anopheles (Nyssorhynchus)</i> spp.		2		2	1					1	9	1		25	21		12	68			90														90	161 (3,6%)
<i>Anopheles argyrotarsis</i>				0						0	1			69	23		8	101			38	2													40	141 (3,2%)
<i>Culex declarator</i>	21			21						0	38			7	2			47																	0	68 (1,5%)
<i>Anopheles albitarsis s.l.</i>	1	36	3	40				1		1				6				6																	0	47 (1,1%)
<i>Anopheles triannulatus s.l.</i>		1		1						0				2				2			36	6													42	45 (1%)
<i>Mansonia amazonensis</i>				0				29		29							0	2							7										9	38 (0,9%)
<i>Mansonia humeralis</i>				0						0				2		22		24																	0	24 (0,5%)
<i>Uranotaenia</i> spp.				0	2					2	17		3					20	1																1	23 (0,5%)
<i>Culex coronator</i>				0						0	16							16																	0	16 (0,4%)
<i>Culex (Melanoconion)</i> spp.	15			15						0								0																	0	15 (0,3%)
<i>Aedeomyia squamipennis</i>				0						0	12		1					13	2																2	15 (0,3%)
<i>Psorophora</i> spp.				0						0	1					8	2	11																	0	11 (0,2%)
<i>Uranotaenia lowii</i>				0						0	7	1						8																	0	8 (0,2%)
<i>Psorophora ciliata</i>			1	1		2	1			3						1		1																	0	5 (0,1%)
<i>Psorophora ferox</i>			3	3						0								0																	0	3 (0,1%)
<i>Sabethes albiprivus</i>			2	2						0								0																	0	2 (0,04%)
<i>Aedes taeniorhynchus</i>		2		2						0								0																	0	2 (0,04%)
<i>Culex</i> spp.	2			2						0								0																	0	2 (0,04%)
<i>Anopheles</i> spp.				0						0	1							1																	0	1 (0,02%)
<i>Aedes (Stegomyia)</i> spp.				0						0						1		1																	0	1 (0,02%)
Total	129	446	636	1211	39	0	9	5	250	10	314	734	10	106	601	331	1	286	14	2083	55	9	57	296	53	1	26	2	97	26	87	10	118	837	4445	

CDC- Armadilha luminosa; EQ- Equídeos; H- Membros da equipe; J- Jacarés-do Pantanal; NI- Culicídeos não ingurgitados; I- Culicídeos ingurgitados; M- Culicídeos machos; S-T- Subtotal.

## 4.5 ISOLAMENTO VIRAL E TESTE DE PLACAS

### 4.5.1 Amostras de crocodilianos

Não foram detectados ECP ou formação de placas em culturas de células VERO e C6/36 inoculadas com 90 amostras diluídas de soro e 50 de coágulo de jacarés-do-Pantanal.

### 4.5.2 Amostras de culicídeos e ixodídeos

Um total de oito (1,9%) dos 419 grupos de culicídeos e ixodídeos submetidos ao isolamento viral apresentou alterações em monocamadas de células C6/36 ou VERO sugestivos de ECP ou placas. Todos os oito grupos que causaram alterações em culturas de células eram de culicídeos. As alterações variaram de alterações de pH do sobrenadante à formação de placas e destruição celular com desprendimento da monocamada celular. Não foram observadas formações de sincícios. Sete grupos apresentaram alterações sugestivas de ECP em células C6/36 e um grupo em C6/36 e células VERO (Quadro 4.4).

O grupo MQ41 composto por 56 espécimes de *Mansonia titillans* e o grupo MQ44 composto por 26 espécimes de *Ochlerotatus scapularis*, ambos capturados em fevereiro de 2009, nas propriedades PB e PC e em equino e membros da equipe, respectivamente, apresentaram ECP em C6/36 no quinto dia pós-infecção (5 dpi).

Os grupos MQ364, MQ365 e MQ407 compostos respectivamente por nove, 17 e 50 espécimes de *Culex Culex* spp. capturados por armadilha luminosa tipo CDC em abril de 2010 na propriedade PC apresentaram ECP em C6/36 em 5 dpi.

O grupo MQ294 composto por 50 espécimes de *Ochlerotatus scapularis* capturados em membros da equipe em abril de 2010 na propriedade PC, no mesmo local de captura de MQ407, apresentou placas em VERO em 3 dpi e ECP em C6/36 em 6 dpi.

O grupo MQ180 composto por também 50 espécimes de *Oc. scapularis* e o grupo MQ332 composto por 42 espécimes de *Culex Culex* spp. capturados respectivamente em membros da equipe e por armadilha luminosa tipo CDC em abril de 2010 apresentaram alterações sugestivas de ECP C6/36 em 7 dpi. O grupo MQ332 foi capturado na propriedade PC, no mesmo local de captura de MQ294 e MQ407, e o grupo MQ180 também na propriedade PC no mesmo local de captura dos grupos MQ364 e MQ365.

Quadro 4.4 – Amostras positivas ou sugestivas no isolamento viral e teste de placas.

Grupos de culicídeos	Espécie	Local de captura	Isolamento viral em C6/36	Isolamento viral em VERO	Teste de placas
MQ 41	<i>Mansonia titillans</i>	PB	Positivo	-	-
MQ44	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	PC sítio A	Positivo	-	-
MQ180	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	PC sítio B	Sugestivo	-	Negativo
MQ294	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	PC sítio C	Positivo	-	Positivo
MQ332	<i>Culex Culex</i> spp.	PC sítio C	Sugestivo	-	Negativo
MQ364	<i>Culex Culex</i> spp.	PC sítio B	Positivo	-	Negativo
MQ365	<i>Culex Culex</i> spp.	PC sítio B	Positivo	-	Negativo
MQ407	<i>Culex Culex</i> spp.	PC sítio C	Positivo	-	Negativo

( - ) Amostras não submetidas ao ensaio relacionado.





Foto 4.9 – Microplaca de isolamento viral em C6/36 com as amostras de grupos de mosquitos 294, 296 e 297 em duplicatas. ECP nos dois poços inoculados com a amostra MQ294. ECP observado em 6 dpi. Foto: Alex Pauvalid-Corrêa.



Foto 4.10 – Microplaca de teste de placas em VERO mostrando formação de placas nos dois poços inoculados com a amostra MQ294. A presença de placas foi observada em 3 dpi. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.

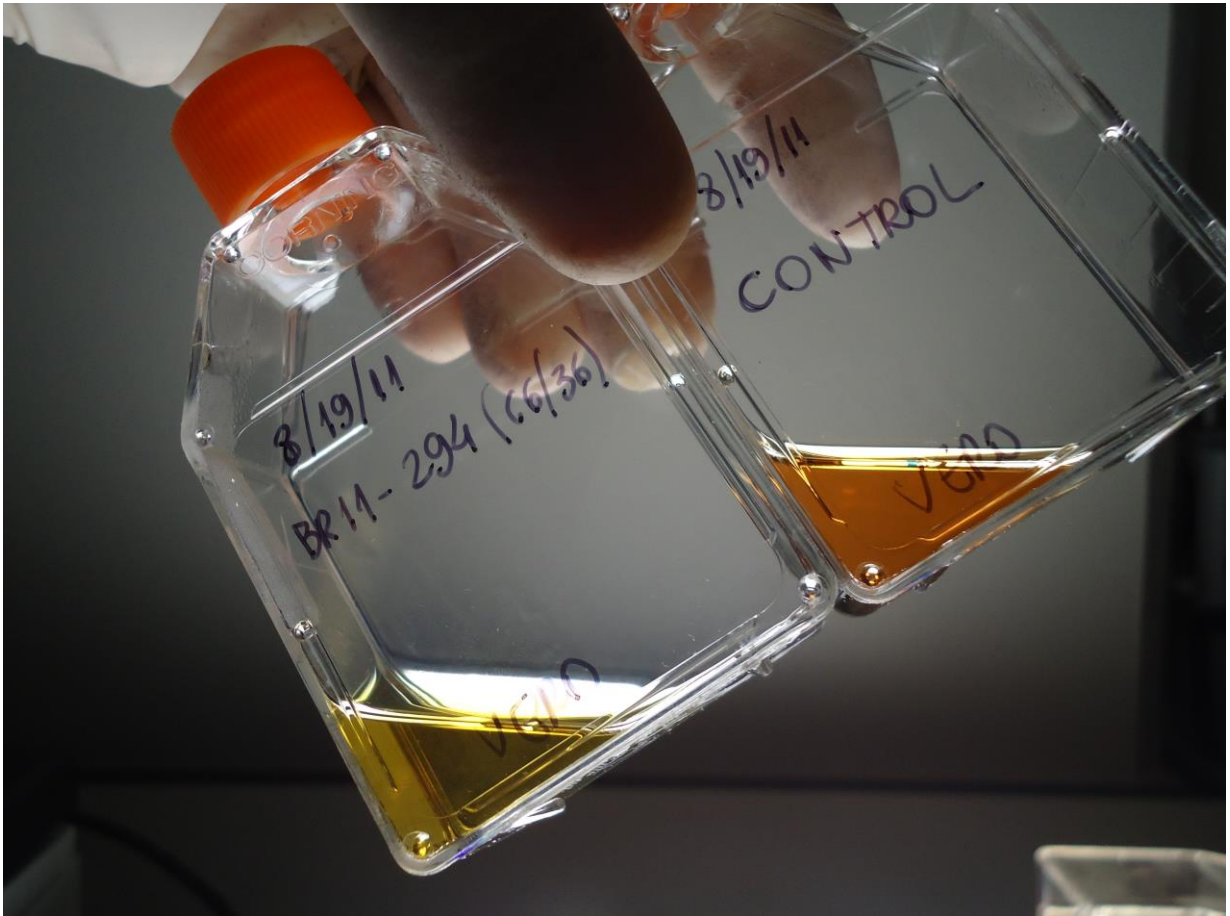


Foto 4.11 – Inoculação da amostra MQ294 em VERO para confirmação do isolamento viral, mostrando mudança de coloração do meio de manutenção em virtude da alteração de pH no início do ECP em 2 dpi. Foto: Alex Pauvolid-Corrêa.

#### 4.6 RT-PCR CONVENCIONAL PARA FLAVIVÍRUS E ALFAVÍRUS

Todas as trinta amostras de soro de crocodiliano coletadas em fevereiro de 2009 e submetidas à RT-PCR convencional para flavivírus e alfavírus foram negativas. Os dois grupos de culicídeos coletados em fevereiro de 2009, MQ41 e MQ44, que apresentaram alterações em monocamada de células C6/36 foram submetidos à RT-PCR convencional e também foram negativos.

#### 4.7 PCR EM TEMPO REAL PARA FLAVIVÍRUS

Todas as 60 amostras de soro e 50 de coágulo de crocodilianos foram negativas na PCR em tempo real para detecção de flavivírus. Das 476 amostras de artrópodes, incluindo 305 grupos de culicídeos e ixodídeos e suas respectivas passagens em culturas de células, que foram submetidas à PCR em tempo real, 34 apresentaram curva de dissociação após 75°C e acima de 90 RFU e foram consideradas positivas e submetidas à reação de sequenciamento nucleotídico (Figuras 4.16, 4.17).

Dentre os oito grupos de culicídeos que apresentaram alguma alteração em culturas de células C6/36 e VERO, seis grupos foram submetidos ao RT-PCR em tempo real, e destes apenas o grupo MQ332, com 44 espécimes de *Culex Culex* spp., e MQ294, com 50 espécimes de *Ochlerotatus scapularis*, foram positivos e posteriormente submetidos ao sequenciamento nucleotídico. As 12 suspensões virais utilizadas na PRNT<sub>90</sub> também apresentaram curva de dissociação esperada e foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico (Quadro 4.5).

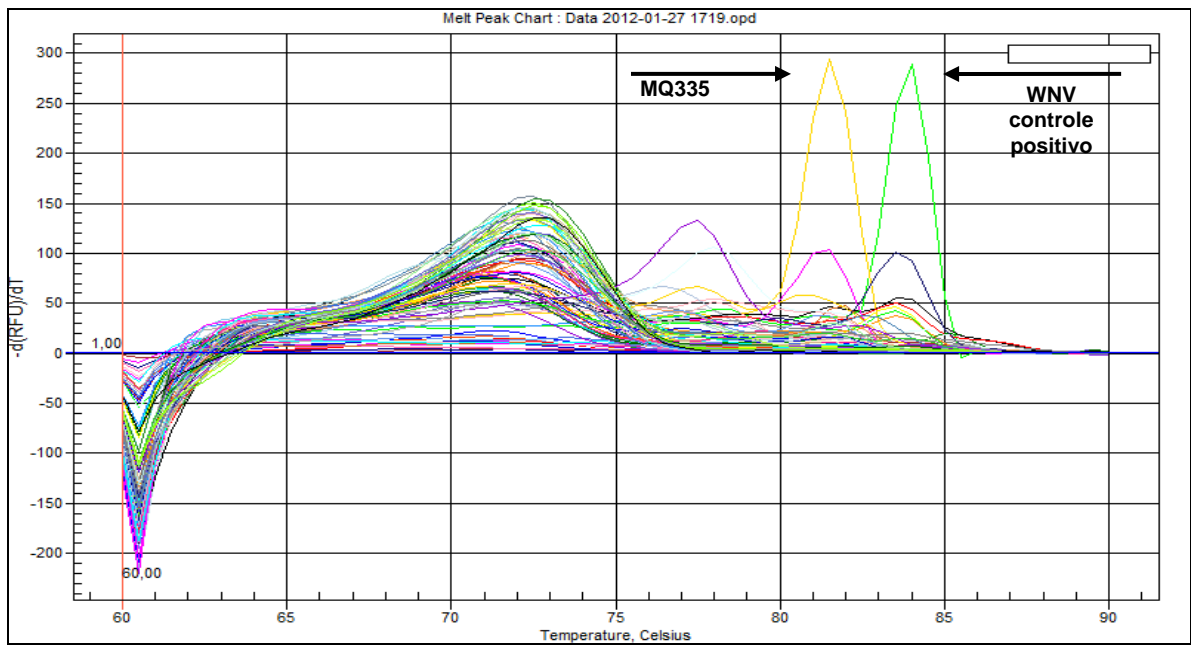


Figura 4.16 – Curva de dissociação da amostra MQ335 em PCR em tempo real.

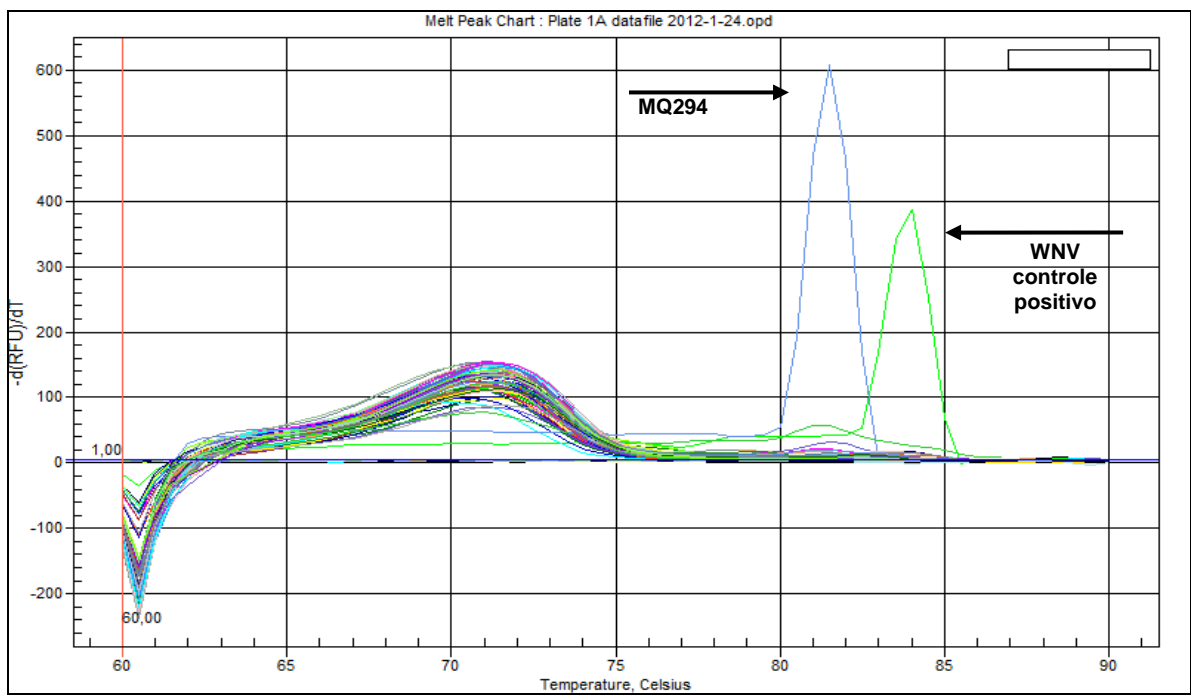


Figura 4.17 – Curva de dissociação da amostra MQ294 em PCR em tempo real.

Quadro 4.5 – Resultados da RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real das amostras positivas no isolamento viral.

	Isolamento viral em VERO	Isolamento viral em C6/36	Teste de placas	RT-PCR convencional	RT-PCR em tempo real
MQ 41	-	Positivo	-	Negativo	-
MQ44	-	Positivo	-	Negativo	-
MQ180	-	Sugestivo	Negativo	-	Negativo
MQ294	-	Positivo	Positivo	-	Positivo
MQ332	-	Sugestivo	Negativo	-	Positivo
MQ364	-	Positivo	Negativo	-	Negativo
MQ365	-	Positivo	Negativo	-	Negativo
MQ407	-	Positivo	Negativo	-	Negativo

( - ) Amostras não submetidas ao ensaio relacionado.

#### 4.8 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Um total de 46 produtos de PCR em tempo real incluindo 34 amostras de artrópodes e 12 de suspensões virais utilizadas na PRNT<sub>90</sub> viral foi submetido, em duplicata, à reação de sequenciamento. Cada produto de PCR em tempo real foi submetido a uma reação de sequenciamento com iniciador senso e uma reação com iniciador anti-senso. Assim, um total de 92 produtos da reação de sequenciamento foi submetido à purificação e sequenciamento.

Dos 92 produtos da reação de sequenciamento, 87 sequências nucleotídicas foram geradas e analisadas no *Genbank*. Todas as 12 suspensões virais utilizadas na PRNT<sub>90</sub> assim como sete amostras de artrópodes apresentaram similaridades significativas quando comparadas às sequências depositadas no *Genbank* (Quadro 4.6).

Quadro 4.6 – Amostras positivas na RT-PCR em tempo real que apresentaram similaridade significativa à sequências depositadas no *Genbank*.

Grupos de culicídeos	Isolamento viral em VERO	Isolamento viral em C6/36	Teste de placas	RT-PCR convencional	RT-PCR em tempo real	Sequenciamento nucleotídico
MQ136	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	Similaridade significativa
MQ147	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	Similaridade significativa
MQ148	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	Similaridade significativa
MQ151	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	Similaridade significativa
MQ156	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	Similaridade significativa
MQ294	-	Positivo	Positivo	-	Positivo	Similaridade significativa
MQ335	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	Similaridade significativa

( - ) Amostras não submetidas ao ensaio relacionado.

Uma sequência de 244 nucleotídeos obtida a partir do triturado de um grupo (MQ335) de 43 espécimes fêmeas não ingurgitadas de *Culex chidesteri* que não apresentou ECP ou placas em culturas de células C6/36 e VERO apresentou 81% de identidade com o vírus Barkedji (*Barkedji virus* ou BAKV) (EU078325.1 Barkedji virus isolate ArD86177 polyprotein gene, partial cds). Até o momento, o sequenciamento de 1061 nucleotídeos apresentou 74% de identidade com o mesmo isolado de BAKV e 71% de identidade com SLEV (EF158066.1 St. Louis encephalitis virus strain GHA-3 polyprotein gene, partial cds).

Outra sequência de 242 nucleotídeos obtida a partir do triturado de um grupo (MQ294) de 50 espécimes fêmeas não ingurgitadas de *Ochlerotatus scapularis* que

apresentou ECP em células C6/36 e placas em culturas de VERO apresentou 94% de identidade com ILHV (EF396947.1 Ilheus virus isolate FSE800 polyprotein gene, partial cds).

Uma sequência de 242 nucleotídeos obtida a partir de um triturado de um grupo (MQ148) de 19 espécimes fêmeas não ingurgitadas de *Mansonia pseudotitillans* apresentou 65% de identidade com *Culex flavivirus* (JQ023758.1 *Culex flavivirus* strain Donggang NS5 protein gene, partial cds).

Uma sequência de 240 nucleotídeos obtida a partir de um triturado de um grupo (MQ136) de cinco espécimes fêmeas ingurgitadas de *Mansonia pseudotitillans* apresentou 70% de identidade com *Kamiti River virus* (AY149904.1 *Kamiti River virus* isolate SR-75 polyprotein precursor, gene, complete cds).

Uma sequência de 236 nucleotídeos obtida a partir de um triturado de um grupo (MQ147) de oito espécimes fêmeas ingurgitadas de *Mansonia pseudotitillans* apresentou 68% de identidade a *Tick-borne encephalitis virus* (GU183381.1 *Tick-borne encephalitis virus* strain Joutseno polyprotein gene, complete cds) e 67% de identidade com uma parte da sequência de *Aedes aegypti* que contém uma região similar ao NS5 de *Kamiti River virus* (AY347953.1 *Aedes aegypti* A20 sequence containing region similar to NS5 gene of *Kamiti River virus*).

Uma sequência de 245 nucleotídeos obtida a partir de um triturado de um grupo (MQ156) de sete espécimes fêmeas ingurgitadas de *Mansonia pseudotitillans* apresentou 71% de identidade com *Calbertado virus* (GU952253.1 *Calbertado virus* isolate 44-13 NS5 protein gene, partial cds).

Uma sequência de 238 nucleotídeos obtida a partir de um triturado de um grupo (MQ151) de sete espécimes fêmeas ingurgitadas de *Mansonia pseudotitillans* apresentou 66% de identidade com *Kamiti River virus* (AY149904.1 *Kamiti River virus* isolate SR-75 polyprotein precursor, gene, complete cds) (Quadro 4.7).



Quadro 4.7 – Amostras de artrópodes com resultados sugestivos ou positivos no isolamento viral ou com resultados positivos na RT-PCR em tempo real e que apresentaram similaridade significativa às sequências depositadas no *Genbank*.

		Isolamento viral em VERO	Isolamento viral em C6/36	Teste de placas	RT-PCR convencional	RT-PCR em tempo real	Sequenciamento nucleotídico
MQ 41	<i>Mansonia titillans</i>	-	Positivo	-	Negativo	-	-
MQ44	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	-	Positivo	-	Negativo	-	-
MQ180	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	-	Sugestivo	Negativo	-	Negativo	-
MQ294	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	-	Positivo	Positivo	-	Positivo	ILHV
MQ332	<i>Culex Culex</i> spp.	-	Sugestivo	Negativo	-	Positivo	Similaridade não significativa
MQ364	<i>Culex Culex</i> spp.	-	Positivo	Negativo	-	Negativo	-
MQ365	<i>Culex Culex</i> spp.	-	Positivo	Negativo	-	Negativo	-
MQ407	<i>Culex Culex</i> spp.	-	Positivo	Negativo	-	Negativo	-
MQ136	<i>Mansonia pseudotitillans</i>	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	70% de identidade a <i>Kamiti River virus</i>
MQ147	<i>Mansonia pseudotitillans</i>	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	68% de identidade a <i>Tick-borne encephalitis virus</i>
MQ148	<i>Mansonia pseudotitillans</i>	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	65% de identidade a <i>Culex flavivirus</i>
MQ151	<i>Mansonia pseudotitillans</i>	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	66% de identidade a <i>Kamiti River virus</i>
MQ156	<i>Mansonia pseudotitillans</i>	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	71% de identidade a <i>Calbertado virus</i>
MQ335	<i>Culex chidesteri</i>	-	Negativo	Negativo	-	Positivo	81% de identidade a <i>Barkedji virus</i>

( - ) Amostras não submetidas ao ensaio relacionado.

A Sub-região da Nhecolândia, assim como a Sub-região do Paiaguás, representa a área de maior expressão geográfica na planície pantaneira (Adamoli 1987). A Nhecolândia apresenta uma fisiografia dominada por um mosaico de lagoas cercadas por faixas de mata densa, rios intermitentes e áreas de vazantes características desta área do Pantanal (Hamilton et al. 1996).

Espécies da fauna encontradas em propriedades na sub-região da Nhecolândia são representativas do Pantanal da Nhecolândia, deixando de ocorrer espécies típicas de outros pantanais. Entretanto, estudos em sanidade equina realizados na propriedade da Embrapa Pantanal localizada na Sub-região da Nhecolândia vêm demonstrando que a maioria das doenças identificadas na propriedade, também vem sendo reportada em outras propriedades da sub-região, assim como até mesmo em outras sub-regiões pantaneiras (Brasil 2008b).

Entretanto, considerando as diferenças ecológicas encontradas entre as sub-regiões do Pantanal (Silva & Abdon 1998), que podem influenciar diretamente os ciclos enzoóticos de transmissão de arbovírus, novos estudos principalmente sobre populações de vetores e potenciais hospedeiros amplificadores em outras sub-regiões do Pantanal são necessários para uma melhor compreensão da ecologia de arbovírus em toda a região do Pantanal.

#### ***Deteção de anticorpos para flavivírus***

A interpretação dos resultados de testes sorológicos para flavivírus é muitas vezes complexa e exige uma análise criteriosa (Komar 2001). A interpretação dos resultados pode ser ainda mais difícil em áreas em que intensa circulação de flavivírus é esperada, como em países da América do Sul. Considerando a complexa reatividade cruzada dos flavivírus, muitos estudos têm adotado ELISA como um método de triagem seguido por testes sorológicos mais específicos, como a PRNT (Blitvich et al. 2003b, Morales-Betoulle et al. 2006, Diaz et al. 2008). No presente estudo, o uso do ELISA de bloqueio como um método de triagem seguido pela PRNT<sub>90</sub> para WNV e 11 flavivírus de vertebrados conhecidos que circulam no Brasil permitiu a deteção de soropositividade por PRNT<sub>90</sub> para WNV em equinos da região do Pantanal pela primeira vez no Brasil.

Baseado nos resultados que foram obtidos com o ELISA de bloqueio, das 892 amostras de soro de equídeos testadas, 466 (52,2%) amostras apresentaram anticorpos para flavivírus. Quando as mesmas amostras foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV e outros 11 flavivírus, apenas sete amostras apresentaram títulos de anticorpo <1:10 para todos os flavivírus que foram testados. Estes resultados indicam que 98% das amostras com anticorpos neutralizantes para ao menos um dos 12 flavivírus testados por PRNT<sub>90</sub> foram soropositivas no ELISA de bloqueio utilizando-se MAb 6B6C-1, o que demonstra uma alta especificidade do teste como triagem para detecção de anticorpos neutralizantes para flavivírus.

Com relação à sensibilidade do ELISA de bloqueio utilizando-se o MAb 6B6C-1 para detecção de amostras soropositivas para flavivírus, infelizmente como não foram realizados nas amostras soronegativas no ELISA de bloqueio ensaios de PRNT<sub>90</sub> para todos os flavivírus estudados, não foi possível avaliar a sensibilidade do método como triagem para a detecção de anticorpos neutralizantes para flavivírus.

Entretanto, em um ensaio para se avaliar a capacidade do ELISA de bloqueio com MAb 6B6C-1 em detectar amostras soropositivas para WNV por PRNT<sub>90</sub>, um grupo de amostras de soro de equídeos que foram soronegativas no ELISA de bloqueio foram testadas para WNV por PRNT<sub>90</sub>. De 351 amostras avaliadas, 30 (8,5%) apresentaram título de PRNT<sub>90</sub> ≥1:10 para WNV, sendo que destas nove (30%) apresentaram títulos ≥1:40.

Desta forma, é preciso se considerar que no presente estudo, apesar de o ELISA de bloqueio utilizando-se o MAb 6B6C-1 ter apresentado boa especificidade para detecção de anticorpos para flavivírus, aproximadamente 9% das amostras soronegativas no ELISA de bloqueio e que foram testadas por PRNT<sub>90</sub> para WNV apresentavam anticorpos neutralizantes. Este resultado, demonstra que muitas amostras de soro com anticorpos neutralizantes para WNV e talvez também para outros flavivírus testados, não puderam ser detectadas pelo ELISA de bloqueio com MAb 6B6C-1.

Apesar disso, considerando que o ELISA de bloqueio não exige a utilização de múltiplos anticorpos de captura, o que permite a utilização deste método para a

análise de amostras de virtualmente qualquer espécie de vertebrado, e que é um método menos laborioso que a PRNT<sub>90</sub>, o ELISA de bloqueio utilizando-se MAb 6B6C-1 pode ser considerado um método eficiente de triagem para a circulação de flavivírus em inquéritos sorológicos envolvendo grande quantidade de amostras e de diferentes espécies.

A alta prevalência de equídeos soropositivos no ELISA de bloqueio nas 18 propriedades que juntas somam uma área total de aproximadamente 2.690 km<sup>2</sup> sugere ampla circulação de flavivírus em equídeos da Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de MS.

A diferença no critério de soropositividade utilizado para o ELISA de bloqueio, com  $\geq 35\%$  de inibição de MAb ao antígeno WNV para um grupo de amostras coletadas em quatro propriedades e  $\geq 30\%$  para as 14 propriedades restantes, não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à média de soropositividade entre as propriedades amostradas dos dois grupos. A média de soropositividade entre as 14 propriedades em que se utilizou o critério de percentual de inibição  $\geq 30\%$  foi de 54% e de 51% ( $p > 0.05$ ). De acordo com os resultados encontrados, a utilização de um critério de soropositividade no ELISA de bloqueio mais conservativo não apresentou diferença significativa no número de soropositivos detectados, provavelmente em virtude da baixa diferença entre os dois percentuais utilizados.

Acerca da idade dos animais soropositivos no ELISA de bloqueio, a diferença de soropositividade entre as diferentes faixas etárias utilizadas no presente estudo foi significativa ( $p < 0.05$ ). A soropositividade foi diretamente proporcional à idade dos animais amostrados, e este resultado era esperado uma vez que quanto mais jovens, menor o período de exposição à infecção por flavivírus. Com relação a mais baixa soropositividade observada entre os animais de até dois anos de idade, a eventual ausência de circulação viral nos dois anos anteriores à amostragem, o que poderia justificar este resultado, foi descartada através da detecção de 14 animais soropositivos.

Sobre a soroprevalência por ELISA de bloqueio dos equídeos quanto ao sexo, a diferença observada não foi estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

A maior soropositividade detectada entre machos castrados quando comparado com o grupo dos machos inteiros foi significativa ( $p < 0.05$ ). Entre as hipóteses para este achado está o manejo a que estes dois grupos de animais são submetidos na região estudada. Animais machos inteiros não são utilizados para trabalhos de campo nas propriedades e normalmente não são frequentemente manejados pelos funcionários das propriedades e por isso muitas vezes, em criações extensivas, não são mantidos próximos às moradias. Os animais castrados, por serem mais utilizados para os serviços gerais e trabalho de campo das propriedades são mantidos mais próximos das moradias e por isso podem estar mais susceptíveis às populações antropofílicas de *Culex*, que constitui um gênero importante para a transmissão de flavivírus. Estes culicídeos que são comumente observados em áreas ao redor aos domicílios próximos a galinheiros, coleções artificiais de água etc.

Entretanto, a hipótese mais provável se mantém relacionada também à idade dos animais. Normalmente, animais com até dois anos de idade ainda não foram castrados. Entre os 65 equinos machos inteiros com registro de idade amostrados, 32 (49,2%) eram animais com até dois anos de idade, enquanto entre os 189 equinos machos castrados com registro de idade, apenas 11 (5,8%) eram animais com dois anos ou menos de idade. Como discutido anteriormente, menor soropositividade foi observada em mais animais jovens.

A idade também parece ter influenciado a diferença de soropositividade entre animais domados e não domados. Maior soropositividade no ELISA de bloqueio foi observada em animais domados. Dos 275 equídeos soropositivos no ELISA de bloqueio, 225 (81,8%) eram domados e 42 (15,3%) não domados. Além da expressiva diferença do número de animais domados e não domados que foram estudados, entre os 849 equinos, 578 (68,1%) eram domados e 235 (27,7%) eram não domados, os equídeos na região também costumam ser castrados quando mais velhos e por isso um maior número de animais não castrados entre os animais jovens.

Dos 296 equinos domados com registro de idade, dez (3,4%) tinham de 10 meses até dois anos de idade e 286 (96,6%) tinham três ou mais anos de idade no momento da venopunção. Entre os 211 não domados com registro de idade, 120

(56,9%) tinham de 10 meses até dois anos de idade e 91 (43,1%) apresentavam três anos ou mais durante a punção.

O conhecimento atual da ecologia de arbovírus no Brasil revela que 11 flavivírus de vertebrados circulam no país. Considerando esta diversidade e a complexidade que envolve o diagnóstico sorológico para este grupo, técnicas de alta especificidade e critérios conservativos foram utilizadas para a pesquisa da circulação de WNV, ainda não detectado no país, na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul.

### ***Anticorpos neutralizantes para WNV***

Um total de 27 (3%) equídeos de 892 amostrados na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal brasileiro foi soropositivo para WNV por PRNT<sub>90</sub>. Animais soropositivos para WNV foram detectados em 12 (66,6%) das 18 propriedades amostradas. A detecção de uma égua de dois anos de idade soropositiva para WNV indica que o vírus pode ter circulado na região entre 2007 e 2009.

As evidências sorológicas encontradas para a circulação de WNV em equídeos no Brasil corroboram as expectativas acerca da dispersão de WNV na América Latina (Komar & Clark 2006). As evidências aqui reportadas também foram encontradas em uma grande região de área úmida, assim como vem sendo descrito principalmente na Europa, como descrito na França (Joubert et al. 1970), Romênia (Tsai et al. 1998), Itália (Autorino et al. 2002) e Grécia (Danis et al. 2011).

Até o momento e à exceção da Argentina, a circulação de WNV tem sido evidenciada na América do Sul primariamente através de estudos sorológicos, como reportado na Colômbia e Venezuela (Mattar et al. 2005; Bosch et al. 2007) e agora no Brasil. A confirmação da circulação de WNV no continente americano foi confirmada em 2006 quando, WNV foi isolado a partir de tecido cerebral de equinos com encefalite na Argentina (Morales et al. 2006).

Ressalta-se que apesar da utilização de 11 flavivírus de vertebrados de reconhecida circulação no Brasil, e também do critério de soropositividade utilizado, com o objetivo de se minimizar a detecção de anticorpos neutralizantes não específicos para WNV, a definitiva confirmação da atividade de WNV no Brasil,

ainda depende de isolamento viral ou detecção molecular, tentativas conduzidas sem sucesso no presente estudo.

A circulação no Pantanal de MS de outros flavivírus antígenicamente relacionados ou não à WNV e ainda não conhecidos na região deve ser considerada. Em 2004, um flavivírus relacionado a NJLV, ainda não detectado no Brasil, foi isolado de um marsupial na Amazônia brasileira (Rodrigues et al. 2004). Embora NJLV esteja relacionado ao grupo do vírus Aroa (*Aroa virus* ou AROAV) e não ao grupo do vírus da encefalite japonesa como WNV, é possível que a não inclusão de NJLV na PRNT<sub>90</sub> possa ter influenciado os resultados.

Embora no presente estudo não tenham sido detectadas amostras soropositivas por PRNT<sub>90</sub> para IGUV e BSQV, que são os outros dois flavivírus que circulam no Brasil, que estão relacionados ao NJLV e classificados ao grupo do AROAV, no mesmo estudo entre os flavivírus relacionados do grupo do NTAV, 94 amostras foram soropositivas por PRNT<sub>90</sub> para ILHV e apenas uma para ROCV. Com estas diferenças de resultados observadas entre os flavivírus relacionados de diferentes grupos torna-se difícil avaliar a influência que teria a inclusão de NJLV nestas análises (King et al. 2012).

Considerar a circulação no Pantanal de MS de flavivírus ainda desconhecidos pela ciência também é particularmente importante, uma vez que apesar de evidências de circulação de arbovírus na região desde a década de 1990 (Iversson et al. 1993), muito poucos estudos acerca da circulação de arbovírus no Pantanal de MS vêm sendo realizados. No presente estudo, entre 388 grupos de culicídeos avaliados, sete foram positivos para flavivírus por métodos moleculares, sendo uma amostra positiva para ILHV, cinco amostras positivas para um potencial novo flavivírus e mais uma amostra positiva para outro potencial novo flavivírus.

Apesar disso, as fortes evidências da circulação de WNV aqui reportadas servem de alerta às autoridades de saúde pública e sanidade animal no Brasil, para eventual alteração do perfil epidemiológico e epizootológico de agravos comumente reportados na região do Pantanal de MS, assim como em outras partes do país. A circulação de WNV em equídeos do Pantanal de MS evidenciada no presente estudo deve ser considerada principalmente para as futuras investigações de casos

de doença neurológica em equídeos da região. Apesar de até o momento, à exceção da Argentina, evidências sorológicas vêm sendo descritas em animais com ausência de quadro clínico em grande parte da América Central e do Sul, WNV tem sido envolvido em casos graves humanos e animais com acometimento neurológico na América do Norte e Europa (CDC 2012; Danis et al. 2011) e deve ser motivo de constante vigilância no Brasil.

Apesar do critério conservativo utilizado no presente estudo, além da soropositividade para WNV em 27 (3%) equídeos, das 892 amostras de equídeos estudadas 94 (10,5%) foram soropositivas para ILHV, 52 (6,4%) para SLEV, cinco (0,6%) para CPCV, uma (0,1%) para ROCV e 275 (30,8%) para flavivírus indeterminado o que sugere a circulação no Pantanal de MS de pelo menos cinco flavivírus de importância médica.

### ***Anticorpos neutralizantes para flavivírus indeterminado***

O elevado número de amostras soropositivas para um flavivírus indeterminado pode ser atribuído à reação cruzada comumente observada entre os flavivírus, principalmente do grupo da encefalite japonesa (Tarr & Hammon 1974) e também ao fenômeno do pecado original, quando indivíduos sequencialmente infectados por flavivírus heterólogos podem amplificar os níveis de anticorpos para o vírus que foi originalmente infectado levando a produção de anticorpos heterólogos de origem cruzada (Inouye et al. 1984).

Considerando que os flavivírus estudados apresentam ciclos de transmissão similares e que estes podem estar circulando concomitantemente no Pantanal de MS, o fenômeno do pecado original pode ter influenciado significativamente na diferença de títulos de anticorpos observados entre os flavivírus pesquisados e algumas infecções sequenciais por flavivírus heterólogos podem não ter sido detectadas.

### ***Critério de soropositividade utilizado***

Em razão dos diferentes métodos sorológicos e critérios de soropositividade que vêm sendo utilizados para o estudo da circulação de flavivírus, a comparação entre percentuais de soropositividade em diferentes trabalhos se torna difícil e



complexa. No presente estudo, considerando o conservativo critério de soropositividade utilizado, os resultados encontrados não refletem a real soroprevalência da infecção pelos flavivírus estudados no Pantanal de MS.

Com relação aos resultados encontrados para WNV, por exemplo, mesmo se desconsiderarmos as 30 amostras soronegativas no ELISA de bloqueio que apresentaram anticorpos neutralizantes para WNV, das 892 amostras de soro de equídeos testadas, 206 (23,1%) apresentaram anticorpos neutralizantes para WNV, isto é, títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:10 para WNV. Destas 206, 91 (44,2%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40.

Para SLEV, apesar do resultado final de 57 (6,4%) amostras soropositivas, das 892 amostras de soro de equídeos testadas, 288 (32,3%) apresentaram anticorpos neutralizantes e destas 185 (64,2%) apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40.

O mesmo foi observado com os resultados de PRNT<sub>90</sub> para ILHV, CPCV e ROCV. Um total de 356 equídeos, aproximadamente 40% dos equídeos testados apresentaram anticorpos neutralizantes para ILHV e destes, 221 (62,1%) com títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40. Para CPCV, 173 (19,4%) dos equídeos testados apresentaram anticorpos neutralizantes, e destes 50 (28,9%) com títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40. Com relação ao ROCV, 148 (16,6%) equídeos apresentaram anticorpos neutralizantes e entre estes, 29 (19,6%) com títulos de PRNT<sub>90</sub> ≥1:40.

Deve-se considerar também que os resultados encontrados nas 892 amostras de soro de equídeos do Pantanal foram interpretados levando-se em consideração os títulos de PRNT<sub>90</sub> para 12 diferentes flavivírus, uma metodologia altamente conservativa ainda não reportada em outros inquéritos sorológicos.

Desta forma, é importante ressaltar que caso tivesse sido utilizado um critério de soropositividade menos conservativo, o número de amostras consideradas soropositivas para cada um dos vírus testados poderia ser bem mais elevado do que o descrito no presente estudo.

Estes resultados são uma forte evidência da circulação de cinco flavivírus no Pantanal de MS, WNV, SLEV, ILHV, ROCV e CPCV. A detecção de soropositividade

por PRNT<sub>90</sub> em equídeos para WNV está sendo descrita pela primeira vez no Brasil e para CPCV e ROCV pela primeira vez no Pantanal. Os resultados também confirmam as evidências de circulação de ILHV e SLEV na região, como previamente descrito (Iversson et al. 1993; Pauvolid-Corrêa et al. 2010b).

As evidências sorológicas da circulação de flavivírus de importância médica e/ou veterinária no Pantanal de MS em animais aparentemente hígidos sugere a circulação enzoótica silenciosa de arbovírus na região e deve servir de alerta para o sistema de vigilância de arbovírus no Brasil.

### ***Anticorpos neutralizantes para ILHV***

Muito pouco ainda se sabe sobre a infecção por ILHV em animais domésticos, entretanto em virtude da proximidade antigênica de ILHV a outros flavivírus, ILHV vem sendo comumente utilizado como diagnóstico diferencial principalmente para a infecção por WNV em inquéritos sorológicos realizados em populações animais na América Central e do Sul (Dupuis II et al. 2003; Mattar et al 2005; Bosch et al. 2007).

A circulação de ILHV no Pantanal brasileiro é sugerida desde 1992, quando anticorpos neutralizantes foram detectados em equinos também na Sub-região da Nhecolândia. Na ocasião anticorpos neutralizantes para ILHV em amostras inicialmente testadas por IH foram detectados em equinos de todas as cinco propriedades visitadas (Iversson et al. 1993).

O presente estudo, realizado na mesma sub-região da Nhecolândia 17 anos depois, detectou anticorpos neutralizantes em equinos em 17 (94,4%) das 18 propriedades estudadas sugerindo que ILHV permanece amplamente distribuído na região. Evidências sorológicas da circulação de ILHV foram obtidas em animais sem histórico de viagens para fora da região do Pantanal. Entretanto, a detecção de um animal soropositivo com histórico de viagem para Poconé, localizada em MT sugere investigação para a circulação do vírus também naquele estado.

Além da evidência sorológica, o presente estudo reporta também a confirmação da circulação de ILHV no Pantanal de MS, através da detecção do vírus em amostras de culicídeos capturadas em abril de 2010. A circulação de ILHV foi confirmada através de isolamento viral a partir de 50 espécimes fêmeas não

ingurgitadas de *Ochlerotatus scapularis*, capturados durante a hematofagia em humanos na região. O isolamento viral em espécimes não ingurgitados sugere a espécie *Ochlerotatus scapularis* como potencial vetor de ILHV na região do Pantanal de MS. Além disso, o isolamento de ILHV nesta espécie na região apresenta particular importância por ter sido *Ochlerotatus scapularis* não só a mais prevalente espécie de culicídeo capturada, mas também por esta espécie ter apresentado um marcado comportamento antropofílico. Dos 1102 espécimes de *Ochlerotatus scapularis* capturados, 758 (68,8%) foram capturados em membros da equipe e dos 1225 espécimes de culicídeos capturados em membros da equipe, 758 (61,9%) foram identificados como *Ochlerotatus scapularis*.

### ***Anticorpos neutralizantes para SLEV***

As evidências da circulação de SLEV em amostras de equídeos reportada no presente estudo vêm sendo recentemente descritas não só na mesma região estudada como também em outras regiões da América do Sul e Brasil. Em inquérito sorológico para circulação de SLEV em equinos realizado na região Amazônica, anticorpos neutralizantes para SLEV foram detectados em diferentes áreas da região (Rodrigues et al. 2010; Tauro et al. 2012).

Em 1992, em inquérito sorológico realizado com equinos do Pantanal na mesma sub-região do presente estudo, anticorpos neutralizantes para SLEV não foram detectados em mais de 430 equinos avaliados (Iversson et al. 1993). Entretanto, em outro estudo para a pesquisa de arbovírus conduzido na mesma região em 2007, anticorpos neutralizantes para SLEV foram detectados em mais de 40% dos equídeos com idade acima de sete meses, descartando eventual imunidade passiva, e sugerindo a circulação de SLEV em equídeos da região. A detecção de animais soropositivos para SLEV com três anos de idade no momento da venopunção sugere atividade pregressa de SLEV em equinos na região entre 2004 e 2007 (Pauvolid-Corrêa et al. 2010b).

Nos achados aqui reportados, SLEV assim como ILHV apresentou evidências sorológicas de ampla distribuição na região estudada. Das 18 propriedades amostradas, soropositividade para SLEV em equinos foi detectada em 17 (94,4%). De acordo com a idade dos animais soropositivos, a detecção de dois equinos com

apenas um ano de idade sugere circulação de SLEV na região entre 2008 e 2009. As evidências sorológicas foram encontradas em animais sem histórico de viagens para fora do Pantanal de MS. Entretanto, a detecção de um animal soropositivo com histórico de viagem para a cidade de Sidrolândia no MS, sugere investigação para circulação de SLEV também fora do Pantanal. As evidências sorológicas de ampla circulação de SLEV no Pantanal de MS associada a recentes relatos de casos de infecção humana e até mesmo epidemias por SLEV, principalmente na Argentina (Spinsanti et al. 2003, 2008; Mondini et al. 2007; Seijo et al. 2011), sugerem ampla atividade de SLEV por todo continente sul americano, não só em áreas urbanas, mas também através de ciclos enzoóticos silenciosos em áreas silvestres pouco povoadas, como o Pantanal brasileiro.

### ***Anticorpos neutralizantes para CPCV***

Até o momento, evidências de infecção por CPCV em populações humanas e animais são eventos raros. Desde que foi isolado pela primeira vez de ave silvestre (*Formicarius analis*) no Norte do Brasil no final da década de 1970 (Karabatsos 1985), o isolamento viral e até mesmo evidências sorológicas da atividade de CPCV não vêm sendo reportados com frequência.

Informações sobre ciclo de transmissão e hospedeiros envolvidos também são escassas. Entretanto, recentemente um caso de infecção clínica humana por CPCV foi reportado no Norte do Brasil. CPCV foi isolado de um paciente com suspeita de febre amarela em RO (Batista et al. 2011). Outros relatos recentes reportam a detecção molecular de CPCV em grupos de *Culex* e *Anopheles* capturados também em RO e em espécimes de *Aedes aegypti* capturados no estado do Amazonas (Henriques 2008; Figueiredo 2010).

No presente estudo, evidências sorológicas da circulação de CPCV em equídeos do Pantanal foram detectadas em três diferentes propriedades da Sub-região da Nhecolândia. Considerando que um dos animais soropositivos tinha cinco anos de idade no momento da venopunção, a evidência sorológica encontrada no presente estudo sugere circulação de CPCV entre 2004 e 2009.

Evidências da circulação de CPCV no Pantanal brasileiro são importantes não só pelo aspecto epidemiológico por se tratar de um vírus suspeito de envolvimento

recente em quadro de infecção clínica humana no Brasil, como também do ponto de vista técnico para futuros inquéritos sorológicos para a circulação de flavivírus a serem realizados na região. As evidências sorológicas da atividade de CPCV na região sugerem a inclusão deste flavivírus como diagnóstico diferencial para a pesquisa de flavivírus no Pantanal brasileiro.

### ***Anticorpos neutralizantes para ROCV***

Apesar das graves epidemias de encefalite causadas por ROCV na década de 1970 no litoral de SP, o ciclo natural de transmissão do ROCV ainda não está totalmente esclarecido (Tiriba et al. 1976). Entretanto, estudos ecológicos e experimentais sugerem que o ciclo de transmissão envolve aves silvestres e culicídeos vetores. Desde as epidemias na década de 1970, evidências sorológicas da circulação de ROCV não vêm sendo comumente reportadas no Brasil.

Um equino domado, castrado e sem idade conhecida apresentou um título de PRNT<sub>90</sub> para ROCV de 1:160, de 1:40 para WNV, SLEV e ILHV, de 1:10 para IGUV e <1:10 para todos os outros flavivírus pesquisados, caracterizando a única amostra do ensaio soropositiva para ROCV. Apesar de todos os ensaios de PRNT<sub>90</sub> terem sido conduzidos em duplicata, a amostra soropositiva para ROCV também foi repetida e os títulos anteriormente encontrados confirmados.

A evidência da circulação de ROCV no Pantanal é um achado inesperado, mas a detecção, ainda que de apenas uma amostra soropositiva com título de PRNT<sub>90</sub> de 1:160, considerando o critério conservativo utilizado nos ensaios é importante.

Os resultados encontrados para ROCV não são tão limitados quanto parecem. Das 466 amostras soropositivas no ELISA de bloqueio, 148 (31,8%) apresentaram anticorpos neutralizantes para ROCV. Destas 148 amostras, uma (0,7%) apresentou título de PRNT<sub>90</sub> de 1:320, uma (0,7%) de 1:160, sete (4,7%) apresentaram títulos de 1:80 e 20 (13,5%) de 1:40, 36 (24,3%) de 1:20 e 83 (56,1%) de 1:10.

A evidência sorológica da circulação de ROCV em hospedeiro terminal na região do Pantanal alerta para a potencial circulação silenciosa de arbovírus

potencialmente encefalitogênico na região e deve ser levado em consideração pelo sistema de vigilância para arbovírus no Brasil.

### ***Ausência de soropositividade para DENVs, YFV, IGUV e BSQV***

Não foi detectada soropositividade por PRNT<sub>90</sub> para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV, IGUV e BSQV nos equídeos estudados. A ausência de amostras soropositivas pode indicar a ausência da circulação destes flavivírus na região estudada e reforça os resultados específicos dos anticorpos neutralizantes para os flavivírus estudados.

Entretanto, à exceção de DENV-3, anticorpos neutralizantes  $\geq 1:10$  foram detectados para todos os flavivírus estudados. Em sua maioria em baixos títulos e em apenas alguns animais, estes anticorpos são sugestivos de reação heteróloga.

Todavia, um grande número de amostras apresentaram títulos de PRNT<sub>90</sub> de 1:10 para estes flavivírus, e três amostras apresentaram título de 1:40, com duas para YFV e uma para BSQV. Vale ressaltar ainda, que 61 amostras apresentaram títulos de 1:10 e quatro de 1:20 para IGUV.

Entretanto, para um melhor entendimento acerca da circulação destes flavivírus na região, novos estudos envolvendo outros hospedeiros precisariam ser realizados. À exceção de IGUV, que foi unicamente isolado a partir de roedores sentinelas no litoral de SP por Coimbra et al. (1993), todos os outros flavivírus que não apresentaram soropositividade nos equinos avaliados vêm sendo descritos, quando em ciclos zoonóticos, em ciclos de transmissão que envolvem culicídeos como vetores e primatas não humanos como hospedeiros amplificadores (Karabatsos 1985). Desta forma, estudos para a circulação de arbovírus envolvendo a única espécie de primatas não humanos reportada na Sub-região da Nhecolândia, *Allouata caraya*, localmente conhecido como bugio, devem ser incentivados para um melhor entendimento da ecologia destes flavivírus na Sub-região da Nhecolândia, Pantanal de MS.

### ***Amostras de ovinos***

A totalidade das amostras de ovinos soronegativas no ELISA de bloqueio é um resultado inesperado. Os ovinos pantaneiros são manejados extensivamente ou

semiextensivamente e por isso compartilham as mesmas áreas e condições ecológicas com equídeos e animais selvagens.

Entre as principais hipóteses acerca da expressiva diferença observada entre o número de animais soropositivos no ELISA de bloqueio entre equinos (52,2%) e ovinos (0%) estão: (I) a não utilização dos ovinos como fonte de alimentação pelas espécies de culicídeos vetores que circulam na região, (II) a idade dos animais estudados e por fim (III) alguma característica específica deste tipo de soro que impediu, durante o processamento das amostras, a detecção de anticorpos para flavivírus pelo ELISA de bloqueio.

A preferência por outros hospedeiros não ovinos por parte das espécies de culicídeos vetores de flavivírus na região do Pantanal pode ser considerada para a ausência de soropositividade para flavivírus nos ovinos estudados. A característica e intensa pelagem da maioria dos ovinos avaliados no presente estudo poderiam limitar a hematofagia por culicídeos diminuindo as chances de infecção por flavivírus.

Em contrapartida, para muitas espécies de culicídeos capturadas no presente estudo, a hematofagia em diferentes espécies de hospedeiros vertebrados parece ser comum, como pode ser observado em estudos realizados com teste de precipitina conduzidos em culicídeos capturados no Pantanal de MT (Alencar et al. 2005). No presente estudo, entre as espécies mais prevalentes, *Ochlerotatus scapularis*, *Mansonia pseudotitillans*, *Mansonia titillans* e *Psorophora albigena* foram capturadas durante hematofagia em seres humanos, equinos e também em crocodilianos demonstrando a utilização de diferentes hospedeiros vertebrados para hematofagia. Além disso, a hematofagia por insetos em ovinos do Pantanal não parece ser um evento raro. Em um inquérito sorológico realizado com ovinos da região, a soropositividade de ovinos para BTV, transmitido por ceratopogonídeos, foi detectada em 10,9% dos animais amostrados (Tomich et al. 2009).

Com relação à ausência de soropositividade estar relacionada à faixa etária, apesar de 52,2% de todos os equídeos amostrados terem sido soropositivos no ELISA de bloqueio, dentre os 103 equídeos com idade entre 10 meses e dois anos, apenas 14 (13,6%) foram soropositivos. Uma vez que a idade dos ovinos

amostrados é desconhecida, caso os ovinos tivessem até dois anos de idade no momento da venopunção um baixo número de animais soropositivos também seria esperada. Entretanto, vale ressaltar que apesar de possível, é improvável que todos os 238 ovinos avaliados de nove diferentes propriedades, tivessem entre 10 meses e dois anos de idade no momento da venopunção.

A eventual característica específica do soro ovino que possa ter impedido a detecção de anticorpos para flavivírus pelo ELISA de bloqueio é difícil de ser avaliada uma vez que para uma melhor análise deste evento, todas as amostras de soro ovino e que foram soronegativas no ELISA de bloqueio teriam que ter sido submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para todos os 12 flavivírus estudados, a fim de se comparar os resultados e se chegar a sensibilidade.

Esta hipótese embora possível é improvável, uma vez que o ELISA de bloqueio, por não exigir a utilização de múltiplos anticorpos de captura, é indicado para a análise de amostras de virtualmente qualquer espécie de vertebrado. Desta forma, o tipo de soro não deveria influenciar o resultado. O ELISA de bloqueio é indicado como um método de triagem para a circulação de flavivírus em inquéritos sorológicos envolvendo grande quantidade de amostras e de diferentes espécies (Blitvich et al. 2003, 2003c).

Além disso, para confirmar os resultados negativos encontrados no ELISA de bloqueio com MAb 6B6C-1, todas as amostras de soro de ovino foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV e das 238 amostras testadas, apenas duas (0,8%) apresentaram anticorpos neutralizantes para WNV com títulos de 1:10 e 1:20, resultado não muito diferente do encontrado no ELISA de bloqueio, considerando a sensibilidade do teste.

Os resultados de PRNT<sub>90</sub> para WNV encontrado em ovelhas no presente estudo está de acordo com os resultados encontrados durante uma investigação para a circulação de WNV em mamíferos na Turquia. Das 100 ovelhas avaliadas por PRNT<sub>50</sub> para WNV, apenas uma (1%) apresentou anticorpos neutralizantes e com título de 1:20 (Ozkul et al. 2006).

Embora a presença de anticorpos neutralizantes para WNV em apenas duas amostras e em tão baixos títulos possam indicar reações heterólogas, estes



resultados indicam a presença de anticorpos neutralizantes para flavivírus nestas amostras. Desta forma novos inquéritos sorológicos com um maior número maior de animais devem ser incentivados para uma melhor compreensão da susceptibilidade de ovinos no Pantanal à infecção por flavivírus.

### ***Amostras de jacaré-do-Pantanal***

A ausência de jacarés-do-Pantanal soropositivos no ELISA de bloqueio, em que se utilizou o MAb 6B6C-1 específico para o grupo de flavivírus, sugere que os animais amostrados não tiveram contato com flavivírus na região. Este dado associado à ausência de isolamento viral ou mesmo detecção molecular de flavivírus nos espécimes estudados sugere a não participação deste grupo de animais em ciclos de flavivírus no Pantanal.

Entretanto, também devem ser consideradas para a ausência de jacarés-do-Pantanal soropositivos no ELISA de bloqueio com MAb 6B6C-1, as mesmas restrições discutidas para as amostras de ovinos. Com relação à susceptibilidade destes animais à hematofagia por culicídeos na região, apesar da captura de 123 espécimes de culicídeos das espécies *Mansonia pseudotitillans*, *Mansonia titillans*, *Psorophora albigena* e *Ochlerotatus scapularis* durante hematofagia em espécimes de jacarés-do-Pantanal observada no presente estudo, a frequência e diversidade de culicídeos que utilizam estes animais como fonte de alimentação ainda não são comumente reportados e claramente conhecidos.

Entre os aspectos técnicos acerca das capturas de culicídeos em jacarés-do-Pantanal que poderia influenciar os resultados das capturas estava a retirada da água e manutenção forçada por algumas horas destes animais em ambiente terrestre durante o período de maior frequência de culicídeos.

Caso esta não fosse uma situação natural os resultados poderiam não refletir a frequência natural de hematofagia por culicídeos nestes animais. Entretanto, durante as capturas muitos indivíduos da mesma espécie se mantinham à distância e naturalmente do lado de fora da água, sugerindo que a hematofagia por culicídeos em jacarés-do-Pantanal em ambiente terrestre durante o período do crepúsculo é um evento natural e comum na região pesquisada.

Assim como observado para as amostras de ovinos, algumas amostras de jacarés-do-Pantanal soronegativas no ELISA de bloqueio também foram submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV. Das 89 amostras soronegativas no ELISA de bloqueio e submetidas ao PRNT<sub>90</sub> para WNV, quatro (4,5%) apresentaram anticorpos neutralizantes com títulos de 1:10 (2), 1:10 (1) e 1:40 (1). Embora, assim como para os ovinos, o reduzido número de amostras em baixos títulos sugiram reação heteróloga, a detecção de uma amostra com título de 1:40 poderia ser interpretada como um amostra soropositiva para WNV por PRNT<sub>90</sub> caso houvessem sido detectados títulos  $\leq 1:10$  para todos os 11 flavivírus que circulam no Brasil. Entretanto, infelizmente nenhuma das amostras de crocodilianos com anticorpos neutralizantes para WNV foi submetida ao PRNT<sub>90</sub> para outros flavivírus.

O principal grupo de hospedeiros amplificadores de arbovírus é o grupo das aves. Entre os flavivírus pesquisados no presente estudo, à exceção de BSQV, DENV e YFV isolados em primatas e IGUV isolado apenas a partir de roedores sentinelas, os flavivírus CPCV, ILHV, SLEV, WNV e ROCV vêm sendo isolados primariamente a partir de aves (Rudnick et al. 1967; Karabatsos 1985; Rudnick 1986; Coimbra et al. 1993). Entretanto, considerando o insucesso de recentes estudos realizados no Brasil para a detecção de WNV e outros arbovírus realizados em aves silvestres (Brasil 2003; 2004c, 2004d), além da pesquisa em vetores, um potencial hospedeiro amplificador secundário, o jacaré-do-Pantanal, foi utilizado para a tentativa de isolamento de WNV e outros arbovírus no Pantanal.

Espécimes selvagens de jacaré-do-Pantanal foram incluídos no estudo para a detecção de WNV e outros arbovírus no Pantanal em virtude dos relatos da circulação de diferentes arbovírus em diferentes populações de crocodilianos em outras regiões, do escasso conhecimento acerca da circulação de arbovírus em espécies de crocodilianos no Brasil, e por fim em virtude de um estudo demonstrando que indivíduos jovens de aligátors americanos quando experimentalmente infectados por WNV apresentam uma viremia suficiente para infecção de artrópodes vetores (Klenk et al. 2004).

Além disso, o jacaré-do-Pantanal apresenta algumas características ecológicas que suscitam sua eventual participação em ciclos de arbovírus na região. Mesmo durante os anos mais secos, espécimes de jacaré-do-Pantanal podem ser

vistos durante todo o ano em coleções remanescentes de água da Sub-região da Nhecolândia (Campos et al. 2003), onde estão submetidos a um intenso contato com populações de artrópodes hematófagos, eventuais vetores de arbovírus. Além disso, os jacarés-do-Pantanal demonstram movimentos terrestres extensos, onde 80% são realizados em grupos, principalmente na época de seca no Pantanal e abre possibilidades de capturas em massa para estudos científicos (Campos et al. 2003).

Todas as amostras de crocodilianos testadas foram negativas no isolamento viral em VERO e C6/36, no teste de placas em VERO e também na RT-PCR convencional e em tempo real para detecção de flavivírus. Os resultados negativos encontrados no presente estudo apontam limitações inerentes às tentativas de isolamento viral e até mesmo detecção molecular em hospedeiros de capacidade amplificadora ainda desconhecida. Mesmo para hospedeiros amplificadores primários conhecidos, o isolamento viral a partir de amostras coletadas em períodos não epidêmicos ou não epizooticos não é um evento comum. O isolamento viral a partir de espécimes silvestres de aligátor americano, de capacidade amplificadora secundária experimentalmente comprovada, também não é comumente reportado.

Além disso, o reduzido número de animais e de áreas de coleta pode ter influenciado os resultados encontrados, uma vez que os jacarés-do-Pantanal se apresentam amplamente distribuídos pelo Pantanal em elevada densidade populacional (Campos et al. 2003).

Com relação aos aspectos técnicos, a utilização de outras linhagens celulares além de VERO e C6/36, eventualmente mais susceptíveis à infecção de determinados arbovírus como, por exemplo, a linhagem celular BHK-21 poderia ter contribuído para a detecção de vírus citopatogênicos em espécimes da região. Em contrapartida, a utilização de técnica molecular de alta sensibilidade sugere a ausência de flavivírus circulantes em amostras de soro e coágulo dos animais dos animais avaliados.

Finalmente, o resultado negativo tanto por isolamento viral como por diagnóstico molecular em todas as amostras testadas sugere a não participação de jacarés-do-Pantanal em ciclos de transmissão de WNV ou outros arbovírus na Sub-região da Nhecolândia.

## ***Espécies de culicídeos e ixodídeos***

De um total de 4.514 artrópodes entre culicídeos e ixodídeos distribuídos em 429 grupos submetidos ao isolamento viral e teste de placas, oito (1,9%) grupos apresentaram alguma alteração em monocamada celular, com quatro grupos de *Culex Culex* spp., três de *Ochlerotatus scapularis* e um de *Mansonia titillans*.

As espécies *Mansonia titillans* e *Ochlerotatus scapularis* que apresentaram ECP em culturas de células C6/36 e placas em VERO vêm sendo comumente reportadas como vetores de arbovírus. A espécie *Ochlerotatus scapularis* já foi descrita em infecção natural por diversos arbovírus como pelo alfavírus Mucambo, pelo flavivírus ILHV e os bunivirídeos MAGV, Melão, Kairi e Caraparu (Segura & Castro 2007). Experimentalmente, *Ochlerotatus scapularis* também demonstrou habilidade para transmitir ROCV e foi por isso considerado uma das principais espécies envolvidas na transmissão natural de ROCV no sudeste de SP (Mitchell & Forattini 1984).

Na década de 1950, *Mansonia titillans* foi considerada vetor de VEEV no Equador e no Peru (Levi-Castillo 1952). A detecção de *Mansonia titillans* causando ECP em cultura de células na região do Pantanal é particularmente importante uma vez que esta espécie vem sendo capturada em altas prevalências durante hematofagia tanto em população humana, como também em equinos na mesma sub-região do Pantanal de MS amostrada no presente estudo (Pauvolid-Corrêa et al 2010). A espécie também apresentou alta prevalência em capturas realizadas no Pantanal de MT (Alencar et al. 2005).

Entre os grupos que apresentaram alguma alteração em cultura celular, apenas os grupos MQ294 e MQ332 foram positivos na RT-PCR em tempo real para flavivírus e posteriormente sequenciados. Entretanto, apenas o grupo MQ294 que havia causado ECP em C6/36 em 6 dpi e placas em VERO em 3 dpi gerou uma sequência nucleotídica que apresentou similaridade com sequências de ILHV depositadas no *Genbank* (EU073990.1 Ilheus virus strain PE 20545 NS5 gene, partial cds).

A detecção de ILHV em espécimes de *Ochlerotatus scapularis* capturados no Pantanal de MS corrobora as evidências sorológicas para a circulação de ILHV em

equinos da mesma sub-região do presente estudo, reportadas no começo da década de 1990 (Iversson et al. 1993). Também na década de 1990, ILHV foi isolado de aves silvestres capturadas na cidade de São Paulo (Pereira et al. 2001).

Embora a infecção humana por ILHV se apresentar primariamente assintomática, alguns casos raros de encefalite foram reportados principalmente na porção norte da América do Sul (Causey et al. 1961) . Recentemente, casos de infecção clínica por ILHV foram reportados na Bolívia e também no Equador (Johnson et al. 2007, Venegas et al. 2012).

Apesar da baixa densidade demográfica da região do Pantanal, a circulação de um vírus potencialmente patogênico em espécimes de *Ochlerotatus scapularis*, espécie de maior prevalência no presente estudo, capturados durante hematofagia em humanos, deve ser de conhecimento do sistema de vigilância para arbovírus no Brasil e deve ser motivo de alerta para o sistema de atenção à saúde na região.

Apesar de apenas um dos oito grupos de culicídeos que causaram ECP em culturas de células C6/36 ter sido identificado por métodos moleculares como um flavivírus, seis grupos de culicídeos que foram negativos no isolamento viral e teste de placas, mas positivos no PCR em tempo real para flavivírus foram sequenciados e apresentaram alguma similaridade com as sequências de flavivírus depositadas no *Genbank*.

Um grupo com 43 fêmeas não ingurgitadas de *Culex chidesteri*, capturado em abril de 2010 apresentou uma baixa similaridade com um vírus Barkedji, um flavivírus recentemente isolado no Senegal. O sequenciamento de 1061 nucleotídeos da amostra detectada no Pantanal apresenta uma similaridade de 74% com o vírus Barkedji e 71% com SLEV, sugerindo se tratar de um flavivírus potencialmente desconhecido.

Os outros cinco grupos de culicídeos positivos na PCR em tempo real, todos da espécie *Mansonia pseudotitillans*, apresentaram uma baixa similaridade com flavivírus de culicídeos como *Culex flavivirus*, *Kamiti river virus* e *Calbertado virus* sugerindo se tratar provavelmente de um flavivírus de mosquitos potencialmente desconhecidos e relacionados à espécie *Mansonia pseudotitillans*.

A maioria dos grupos de culicídeos, em que foi detectada presença de flavivírus por isolamento viral ou métodos moleculares, foi capturada na propriedade PC. Nesta propriedade, as amostras positivas foram detectadas em três diferentes sítios. A maior detecção nesta propriedade pode estar relacionada ao maior número de capturas realizadas. Das 74 capturas, 49 (66,2%) foram realizadas na propriedade PC. Diferentes pontos na propriedade PC foram utilizados, sendo que dos oito grupos de culicídeos capturados com isolamento positivo ou sugestivo, seis foram capturados em dois sítios. Três no sítio A, localizado em uma área de reserva próxima a um lago natural, e três no sítio C, localizado relativamente próximo a moradias em uma área degradada ao redor de coleção artificial de água.

A detecção molecular de flavivírus potencialmente novos na região do Pantanal deve ser levada em consideração não só pelo aspecto epidemiológico e epizootiológico que envolve a circulação de arbovírus ainda não descritos na região, como também no que diz respeito ao complexo diagnóstico sorológico para flavivírus a ser realizado na região.

No presente estudo um total de 19 espécies de culicídeos e três de ixodídeos foi detectado na Sub-região da Nhecolândia. As três espécies de ixodídeos reportadas neste estudo vêm sendo comumente reportadas em estudos ecológicos sobre fauna de ixodídeos, desenvolvidos na região do Pantanal (Bechara et al. 2000; Cançado et al. 2009).

Entre os culicídeos, um total de cinco espécies não previamente reportadas na sub-região foi detectado durante as coletas de 2009 e 2010. De acordo com estudo publicado acerca das espécies de culicídeos encontradas na região da Nhecolândia realizado em 2007, as espécies *Aedes taeniorhynchus*, *Anopheles argyritarsis*, *Culex coronator*, *Mansonia pseudotitillans* e *Uranotaenia lowii* detectadas no presente estudo estão sendo reportadas pela primeira vez nesta sub-região (Pauvolid-Corrêa et al. 2010).

Até o momento, considerando as espécies detectadas em 2007 e as espécies relatadas no presente estudo, um total de 27 espécies de culicídeos foi detectado na Sub-região da Nhecolândia. Apesar de uma diversidade até o momento conhecida

relativamente pequena, pelo menos 13 destas espécies vêm sendo reportadas como vetores de arbovírus (Segura & Castro 2007; Pauvolid-Corrêa et al. 2010).

Além disso, muitas espécies detectadas no Pantanal de MS têm apresentado características antropofílicas. No presente estudo, das 19 espécies encontradas, 13 (68,4%) foram capturadas durante hematofagia em humanos. Em estudo realizado na região em 2007, das 22 espécies capturadas, 18 (81,8%) haviam sido capturadas em membros da equipe (Pauvolid-Corrêa et al. 2010). Até o momento, considerando os achados do presente estudo, um total de 20 espécies de culicídeos apresentou característica antropofílica na Sub-região da Nhecolândia.

Com relação aos equinos, das 19 espécies de culicídeos capturadas no presente estudo, 12 (63,2%) foram capturadas durante hematofagia nestes animais, o dobro do número de espécies reportado no estudo realizado na região em 2007 (Pauvolid-Corrêa et al. 2010). O grande número de espécies observadas em hematofagia em equinos na região é um importante fator a ser considerado para a utilização destes animais como marcadores de circulação de arbovírus na região do Pantanal.

Muito pouco se sabe acerca de espécies de culicídeos que utilizam jacarés-do-Pantanal como hospedeiro no Brasil. Em um estudo realizado sobre a circulação de *Hepatozoon caimani* conduzido em jacarés-do-Pantanal entre 2006 e 2009 no Pantanal, dez espécies de culicídeos foram identificadas em mais de 5.700 espécimes avaliados (Viana et al. 2010). No presente estudo, um total de quatro espécies foi identificado entre os 123 espécimes capturados. Apesar dos resultados negativos no ELISA de bloqueio e isolamento viral, a detecção de quatro espécies de culicídeos previamente reportados como vetores de arbovírus durante hematofagia em jacarés-do-Pantanal, sugere o potencial da espécie como hospedeiro susceptível à circulação de arbovírus em ciclos enzoótico no Pantanal.

Além de ter sido a espécie mais prevalente no presente estudo, *Ochlerotatus scapularis* foi detectada em infecção natural por ILHV no Pantanal de MS. A captura de espécimes infectados e não ingurgitados durante hematofagia em humanos sugere a espécie como potencial vetor de ILHV no Pantanal de MS. A participação de *Ochlerotatus scapularis* como vetor de ILHV é conhecida no Brasil e sua

capacidade de transmissão de ILHV foi experimentalmente comprovada (Aitken & Anderson 1959; Karabatsos 1985).

A detecção de flavivírus desconhecidos circulando em culicídeos capturados no Pantanal é um achado muito importante não só para o estudo da ecologia de arbovírus no Brasil como também para o planejamento de futuras investigações para a circulação de arbovírus na região do Pantanal. Considerando a complexidade do diagnóstico sorológico para flavivírus, a circulação de um flavivírus desconhecido e por isso não investigado na região poderia levar à resultados falso positivos para os flavivírus conhecidos e investigados, por reação cruzada.

Novos estudos para a circulação de arbovírus na região do Pantanal, envolvendo potenciais hospedeiros vertebrados amplificadores como primatas não humanos e também aves devem ser fortemente incentivados para uma melhor compreensão da ecologia e evolução dos arbovírus evidenciados no Pantanal.

### ***Importância do Pantanal para a vigilância das arboviroses no Brasil***

Até o momento, considerando os resultados do presente estudo, já foram reportadas no Pantanal evidências sorológicas da circulação de nove diferentes arbovírus, entre eles EEEV, WEEV, WNV, CPCV, ROCV e SLEV de importância médica, com EEEV, WEEV e WNV de importância também veterinária (Iversson et al. 1993; Pauvolid-Corrêa et al. 2010b; Pauvolid-Corrêa et al. 2011). Além disso, além do isolamento de ILHV e da detecção de potencialmente novos flavivírus em culicídeos da região, de um total de 27 espécies de culicídeos já reportadas até o momento, 12 foram capturadas durante hematofagia em equinos e 20 apresentaram comportamento antropofílico (Alencar et al. 2005; Pauvolid-Corrêa et al. 2010). Estes aspectos são particularmente importantes considerando que apesar da baixa densidade demográfica da região, anualmente o Pantanal recebe milhares de visitantes principalmente em virtude do turismo da pesca na região (Oliveira et al. 2009; IBGE 2012).

Considerando os resultados encontrados no presente estudo e os prévios relatos acerca da circulação de arbovírus e culicídeos vetores na região, o Pantanal apresenta grande importância para o estudo de arbovírus no Brasil e deve ser



motivo de atenção do sistema de vigilância das arboviroses de importância médica e veterinária do país.

## 6 CONCLUSÕES

- A detecção de soropositividade em equídeos sem histórico de viagens para fora do Pantanal de MS constitui a primeira evidência por PRNT<sub>90</sub> da circulação de WNV no Brasil.
- A presença de equídeos soropositivos para CPCV e ROCV na região do Pantanal de MS constitui a primeira evidência por PRNT<sub>90</sub> da circulação destes vírus na região.
- O isolamento viral seguido de detecção molecular confirma a circulação de ILHV em populações de *Ochlerotatus scapularis* no Pantanal de MS.
- A detecção de equídeos soropositivos por PRNT<sub>90</sub> para SLEV e ILHV no Pantanal, confirma evidências previamente reportadas da circulação destes vírus em equídeos da região.
- A detecção molecular de flavivírus com baixa identidade com sequências depositadas no *Genbank* sugere a circulação de novos flavivírus no Pantanal de MS.
- A alta prevalência de anticorpos anti-flavivírus detectados por ELISA de bloqueio em equídeos de todas as propriedades amostradas indica alta e ampla circulação de flavivírus em equídeos da região do Pantanal de MS.
- Não foi detectada soropositividade por ELISA de bloqueio em populações de ovinos e crocodilianos sugerindo baixa ou ausente circulação de flavivírus nestas populações no Pantanal de MS.
- Não foram encontradas evidências da participação de crocodilianos como hospedeiros amplificadores secundários em ciclos de transmissão de flavivírus no Pantanal de MS.
- Evidências moleculares e sorológicas apresentadas neste trabalho confirmam a região do Pantanal de MS como uma importante área para o estudo da circulação de flavivírus em ciclos enzoóticos no Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH 2005. *Imunologia celular e molecular*. Tradução Claudia Reali, 5 ed., Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro, 580 pp.
- Ackermann H, Bertheaume L 1995. *Atlas of virus diagrams*. CRC Press, Florida, p. 151.
- Adámoli I 1982. *O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito "Complexo Pantanal"*, In Anais do 32º Congresso Nacional de Botânica, Teresina, p. 109-119.
- Adámoli J 1987. Fisiografia do Pantanal. In AC Allem, JFM Valls, *Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense*, Documentos 8, Embrapa Cenargen, Brasília.
- Aitken TH 1960. A survey of trinidadian arthropods for naturel virus infections (august, 1953 to december, 1958) *Mosq News* 20: 1-10.
- Aitken THG, Anderson CR 1959. Virus transmission studies with trinidadian mosquitos. *Am J Trop Med Hyg* 8: 41-45.
- Aitken THG, Downs WG, Spence L, Jonkers AH 1964. *St. Louis encephalitis virus* isolations in Trinidad, West Indies, 1953-1962. *Am J Trop Med Hyg* 13: 450-451.
- Alencar J, Lorosa ES, Silva JS, Lopes CM, Guimarães AE 2005. Observações sobre padrões alimentares de mosquitos (Diptera: Culicidae) no Pantanal Mato-Grossense. *Neotrop Entomol* 34(4): 681-687.
- Alho CJR, Lacher TE, Conçales HC 1988. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. *Bioscience*. 1988; 38: 164-171.
- Almeida TI, Calijuri Mdo C, Falco PB, Casali SP, Kupriyanova E, Paranhos Filho AC, Sigolo JB, Bertolo RA. Biogeochemical processes and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. *Ann Acad Bras Cienc* 83(2): 391-407.

- Altman R, Goldfield M 1968. The 1964 outbreak of St. Louis encephalitis in the Delaware valley: Description of outbreak. *Am J Epidemiol* 87(2): 457-469.
- Anderson CR, Aitken THG, Downs WG, Spence L 1957. The isolation of St. Louis virus from Trinidad mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1957; 6: 688-692.
- Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck CR 2001. Mosquito surveillance for *West Nile virus* in Connecticut, 2000: Isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarius*, and *Culiseta melanura*. *Emerg Infect Dis* 7(4): 670-674.
- Angelini P, Macini P, Finarelli AC, Pol C, Venturelli C, Bellini R, Dottori M 2008. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parassitologia* 50(1-2): 97-98.
- Antas PTZ 1994. Migration and other movements among the lower Paraná River valley wetlands, Argentina, and the south Brazil/Pantanal wetlands. *Bird Conserv Int* 4(2): 181-190.
- Aquino-Shuster AL, Duszynski DW 1989. Coccidian parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from two species of caimans, *Caiman yacare* Daudin and *Caiman latirostris* Daudin (Alligatoridae), from Paraguay. *J Parasitol* 75(3): 348-352.
- Aragão HB 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 31(4): 759-845.
- Aragão HB, Fonseca F 1961. Notas de ixodologia. VIII: Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 59(2): 115-151.
- Arroyo J, Miller CA, Catalan J, Monath TP 2001. Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends Mol Med* 7: 350-354.
- Artsob H, Gubler DJ, Enria DA, Morales MA, Pupo M, Bunning ML, Dudley JP 2009. West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health* 56(6-7): 357-369.
- ATCC 1979 - The american type culture collection. *Catalogue of strains II*, 2 ed., Library of Congress, Rockville, pp.

- Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang GJ 2004. Experimental infection of cats and dogs with *West Nile virus*. *Emerg Infect Dis* 10(1): 82-86.
- Austin RJ, Whiting TL, Anderson RA, Drebot MA 2004. An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can Vet J* 45(2): 117-123.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT 2002. West Nile virus Epidemic in Horses, Tuscany Region, Italy. *Emerg Infect Dis* 8(12): 1372-1378.
- Azevedo SM, Dias MM, Larrazábal ME, Telino WR, Lyra-neves RM, Fernandes CJG 2001. Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. *Ararajuba* 9(1): 33-42.
- Azevedo RS, Silva EV, Carvalho VL, Rodrigues SG, Nunes-Neto JP, Monteiro H, Peixoto VS, Chiang JO, Nunes MR, Vasconcelos PF 2009. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 15(11): 1830-1832.
- Bailey CL, Eldridge BF, Hayes DE, Watts DM, Tammariello RF, Dalrymple JM 1978. Isolation of St. Louis encephalitis virus from overwintering *Culex pipiens* mosquitoes. *Science* 199(4335): 1346-1349.
- Banet-Noach C, Simanov L, Malkinson M 2003. Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol* 32: 489-494.
- Barcellos C, Pustai AK, Weber MA, Brito MRV 2005. Identification of places with potential transmission of dengue fever in Porto Alegre using geographical information systems. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(3): 246-250.
- Barnett ED 2007. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 44(6): 850-856.
- Barratt-Boyes SM, MacLachlan NJ 1994. Dynamics of viral spread in Bluetongue virus infected calves. *Vet Microbiol* 40: 361-371.

Batista WC, Tavares GSB, Vieira DS, Honda ER, Pereira SS, Tada MS 2011. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(4): 528-530.

Bechara GH, Szabó MP, Duarte JM, Matushima ER, Pereira MC, Rechav Y, Keirans JE, Fielden LJ 2000. Ticks associated with wild animals in the Nhecolândia Pantanal, Brazil. *Ann N Y Acad Sci* 916: 289-297.

Belle EA, Grant LS, Page WA 1964. The isolation of St. Louis encephalitis virus from *Culex nigripalpus* mosquitoes in Jamaica. *Am J Trop Med Hyg* 13: 452-454.

Bensabath G, Andrade AHP 1962. Anticorpos para arbovírus no sêro de residentes na cidade de Belém, Pará. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 12(1): 61-69. In *Memórias do Instituto Evandro Chagas* 2002, *Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 7, Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 81-87.

Bernkopf H, Levine S, Nerson R 1953. Isolation of *West Nile virus* in Israel. *J Infect Dis* 93(3): 207-218.

Blitvich BJ, Bowen RA, Marlenee NL, Hall RA, Bunning ML, Beaty BJ 2003. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals. *J Clin Microbiol* 41: 2676-2679.

Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, Gonzalez-Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ 2003b. Serologic evidence of *West Nile virus* infection in horses, Coahuila state, Mexico. *Emerg Infect Dis* 9(7): 853-856.

Blitvich BJ, Marlenee NL, Hall RA, Calisher CH, Bowen RA, Roehrig JT, Komar N, Langevin SA, Beaty BJ 2003c. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west Nile virus in multiple avian species. *J Clin Microbiol* 41: 1041-1047.

Bocato-Chamelet EL, Coimbra TLM, Nassar ES, Pereira LE, Ferreira IB, Souza LTM, Suzuki A 2001. Isolamento do flavivírus Iguape a partir de mosquitos *Anopheles (Kerteszia) cruzii* em Juquitiba. Estado de São Paulo. Brasil. *Ver Inst Adolfo Lutz* 60(1): 65-69.

Bosch I, Herrera F, Navarro J, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, Jones M, Fernández E, Pérez N, Pérez-Emán J, Guimarães AE, Barrera R, Valero N, Ruiz J, Velásquez G, Martinez J, Comach G, Komar N, Spielman A, Kramer L 2007. *West Nile virus*, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 13(4): 651-653.

Brasil 2003. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Primeiro inquérito sorológico em aves migratórias e nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus do Nilo ocidental. *Boletim eletrônico epidemiológico* 3(1): 3-12.

Brasil 2004c. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da febre do Nilo ocidental e outros vírus. *Boletim eletrônico epidemiológico* 4(2): 1-12.

Brasil 2004d. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus da febre do Nilo ocidental e outros vírus. *Boletim eletrônico epidemiológico* 4(5): 1-8.

Brasil 2005. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Ministério da Saúde, Brasília, p. 56. <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/profissionais.php>.

Brasil 2008a. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. APA Canaéia – Iguape – Peruíbe/SP. <http://www.ibama.gov.br/apacip/>

Brasil 2008b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa do Pantanal. Embrapa Pantanal. Introdução. [http://www.cpap.embrapa.br/agencia/012\\_nhu\\_intro.htm](http://www.cpap.embrapa.br/agencia/012_nhu_intro.htm)

Brasil 2008c. Ministério da Saúde. Assessoria de Comunicação Social, Divisão de Imprensa. Nota para a imprensa 13/01/2008. <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/imprensa.php>

Brasil 2008d. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2007 e 2008.

<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/febreamarela/noticias.php>

Brasil 2012. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Dengue: situação epidemiológica.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_de\\_dengue\\_classica\\_brasil\\_1991\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_de_dengue_classica_brasil_1991_2011.pdf)

Brasil 2012b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Animal, Equídeos.

<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>

Brés P 1988. Impact of arboviruses on human and animal health. In TP Monath, *The Arboviruses: epidemiology and ecology*, v 1., CRC Press Inc., Florida, p. 1-18.

Breyer FRS 1987. Técnicas para a coleta, transporte e incubação artificial de ovos de *Caiman crocodylus yacare* (Daudin, 1802), (Crocodylia: Alligatoridae), Comunicado Técnico 08, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Britto C, Primez C, Fernandes O 2005. Técnicas Básicas de Diagnóstico Molecular em Doenças infecciosas e parasitárias. In JC Coura, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, v 1, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 195-214.

Bruno-Lobo G, Bruno-Lobo M, Travassos J, Pinheiro FF, Pazin IP 1961. Estudos sobre Arbovírus III: Isolamento de um vírus sorologicamente relacionado ao subgrupo Western-Sindbis, de um caso de encefalomielite eqüina ocorrido no Rio de Janeiro. *Anais de Microbiologia* 9 (parte A): 183-195. In Instituto Evandro Chagas 2002, *Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 7., Instituto Evandro Chagas, Belém, p 61-73.

Buck C, Paulino GP, Medina DJ, Hsiung GD, Campbell TW, Walsh MT 1993. Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from a killer whale. *Clin Diagn Virol* 1(2): 109-112.

Buenviaje GN, Ladds PW, Martin Y 1998. Pathology of skin diseases in crocodiles. *Aust Vet J* 76: 357-363.



Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ 2002. Experimental infection of horses with *West Nile virus*. *Emerg Infect Dis* 8(4): 380-386.

Cadavid Garcia EA 1986. Estudo técnico-econômico da pecuária bovina de corte do Pantanal Mato-Grossense, Documentos 4, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Calisher CH, Karabatsos N 1988. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In TP Monath, *The Arboviruses: Epidemiology and ecology*, v 1., CRC Press Inc, Florida, p 19-58.

Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70(1): 37-43.

Campos ZMS 2003. Biologia reprodutiva de jacaré-do-papo-amarelo no rio Paraná, Brasil, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Campos ZMS, Coutinho ME, Abercombrie C 2004. Ecologia e status de conservação do jacaré-paguá nas montanhas do Amolar, Pantanal Sul, Comunicado Técnico 31, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Campos ZMS, Coutinho ME, Magnusson W 2003. Atividades terrestres dos jacarés no Pantanal, Brasil, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 41, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Campos ZMS, Coutinho ME, Mourão G 2004. Uso da radiotelemetria no estudo do movimento e termorregulação do jacaré-do-pantanal, Circular Técnica 49, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Campos ZMS, Coutinho ME, Mourão G 2005. Metodologia para contagem e avaliação de ninhos de jacaré-do-pantanal usando o ultraleve, Circular Técnica 58, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Campos ZMS, Mourão G 2004. Biologia reprodutiva de jacaré-do-papo-amarelo no rio Paraná, Brasil, Comunicado Técnico 33, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Campos ZMS, Zucco CA, Batista G 2007. Registro de ocorrência de jacaré-paguá (*Paleosuchus palpebrosus*), na RPPN Engenheiro Eliezer Batista, Pantanal, Brasil, Comunicado Técnico 60, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Cançado PH, Zucco CA, Piranda EM, Faccini JL, Mourão GM 2009. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and cattle in Brazil's Central Pantanal. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 42-46.

Casali CG, Pereira MRR, Santos LMJG, Passos MNP, Fortes BPMD, Valencia LIO, Alexandre AJ, Medronho RA 2004. The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(4): 296-299.

Casals J 1957. The arthropod-borne group of animal viruses . *Trans New York Acad Sci* 19: 219-235.

Casals J 1963. New developments in the classification of arthropod-borne viruses. *Ann Microbiol* 11: 1-34.

Casals J, Reeves WC 1959. Arthropod-borne animal virus. In TM Rivers, FL Horsfall. *Viral and rickettsial infections on man*, 3 ed., JB Lippincott Company, Philadelphia, p 269-285.

Causey OR 1958. Reservatórios e transmissores. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 10(1): 133-136. In Instituto Evandro Chagas 2002, *Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 6., Instituto Evandro Chagas, Belém, p 41-44.

Causey OR, Causey CE, Maroja OM, Macedo DG 1961. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 10: 227-249.

Causey OR, Shope RE, Suttmoller P, Laemmert H 1962. Epizootic eastern equine encephalitis in the Bragança region of Pará, Brazil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 12(1): 39-45. In *Memórias do Instituto Evandro Chagas 2002, Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 7., Instituto Evandro Chagas, Belém p 107-113.

Causey OR, Shope RE, Theiler M 1964. Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from arthropods in Pará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 13(3): 449. In Instituto Evandro Chagas 2002, *Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 7., Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 179-180.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2002b. Intrauterine *West Nile virus* infection, New York, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 51(50): 1135-1136.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2002c. Investigations of *West Nile virus* infections in recipients of blood transfusions. *Morb Mortal Wkly Rep* 51(43): 973-974.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 1999. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis-New York, 1999. *Morb Mortal Wkly Rep* 48: 845-849.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2002d. Possible *West Nile virus* transmission to an infant through breast-feeding in Michigan. *Morb Mortal Wkly Rep* 51(39): 877-878.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2011. St. Louis Encephalitis: Epidemiology & Geographic Distribution. Division of Vector-Borne Diseases (DVBD) Division of vector-borne infectious diseases.

<http://www.cdc.gov/sle/technical/epi.html#casesbystate>.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2007. Yellow fever global distribution. Division of vector-borne infectious diseases.

[http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/YF\\_GlobalMap.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/YF_GlobalMap.html)

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2012. West Nile virus: Statistics, Surveillance, and Control. Division of vector-borne infectious diseases.

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2007b. *West Nile virus* transmission through blood transfusion, South Dakota, 2006. *Morb Mortal Wkly Rep* 56(04): 76-79.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention 2005. *West Nile virus* infections in organ transplant recipients, New York and Pennsylvania, august/september, 2005. *Morb Mortal Wkly Rep* 54(40): 1021-1023.

Chamberlain RW, Kissling RE Stamm DD, Sudia WD 1957. Virus of ST. Louis encephalitis in three species of wild birds. *Am J Hyg* 65(1): 110-118.

Chen LH, Wilson ME 2004. Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. *Clin Infect Dis* 39(6): 56-60.

Chesser RT 1994. Migration in South America, an overview of the austral system. *Bird Conserv Int* 4: 91-107.

Clavijo A, Sepulveda L, Riva J, Pessoa-Silva M, Tailor-Ruthes A, Lopez JW 2002. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet Rec* 151(10): 301-302.

Clements AN 2012. *The biology of mosquitoes, volume 3, transmission of viruses and interactions with bacteria*. CABI, Cambridge, 584 pp.

Coimbra TL, Nassar ES, Nagamori AH, Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Ueda-Ito M, Romano NS 1993. Iguape, a newly recognized flavivirus from Sao Paulo State, Brazil. *Intervirology* 36: 144-152.

Connell SA 2003. WNV vaccine safety. *Fort Dodge Professional and Technical Services* 23(10): 425.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 228 pp.

Cortés AG, Aquino MLZ, Bahena JG, Abella JM, Avila GC, Arrayo MA 1975. St. Louis encephalomyelitis in Hermosillo, Sonora, Mexico. *Bull Pan Am Health Organ* 9(4): 306-316.

Couissinier-Paris P 2006. West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bull Soc Pathol Exot* 99: 348-354.

Coutinho ME, Campos Z, Cardoso F, Martinelli P, Castro A 2005. Ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de jacaré-do-pantanal, *Caiman crocodilus yacare*, Comunicado Técnico 51, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Cruz ACR 1994. Caracterização molecular do vírus Ilhéus. Rio de Janeiro; Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Cruz L, Cardenas VM, Abarca M, Rodriguez T, Reyna RF, Serpas MV, Fontaine RE, Beasley DWC, Travassos Da Rosa APA, Weaver SC, Tesh RB, Powers AM, Suarez-Rangel G 2005. Short report: Serological evidence of *West Nile virus* activity in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg* 72(5): 612-615.

Cunha RV, Nogueira RMR 2005. Dengue e dengue hemorrágico. In JC Coura, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, v 2, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1767-1781.

Daniels P 2001. *Arboviruses of veterinary significance in the Asia-Western Pacific Region, such as Japanese encephalitis virus*, In Conference paper Compendium of technical items presented to the international committee or to regional commissions 2001-2002 2003 do 22º Conference of the OIE regional commission for Asia, the Far East and Oceania, Kathmandu, Nepal, p. 167-180.

Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M, Baka A, Lytras T, Mellou K, Bonovas S, Panagiotopoulos T 2011. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* 17(10): 1868-1872.

Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B 2004. West Nile: Worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 343-355.

Davis LM, Spackman E 2008. Do crocodilians get the flu? Looking for influenza A in captive crocodilians. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 309: 1-10.

Davis NC, Burke AW 1929. Studies on South American yellow fever: I. The strains of virus in use at the yellow fever laboratory in Bahia, Brazil. *J Exp Med* 49(6): 975-984.

de Almeida MA, Dos Santos E, da Cruz Cardoso J, da Fonseca DF, Noll CA, Silveira VR, Maeda AY, de Souza RP, Kanamura C, Brasil RA 2012. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *Am J Primatol* 74(1): 68-76.

Dégallier N, Travassos Da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa ES, Sá Filho GC, Travassos da Rosa JFS 1992. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. *Ciência e Cultura* 44: 136-142.

Diaz LA, Komar N, Visintin A, Júri MJD, Stein M, Allende RL, Spinsanti L, Konigheim B, Aguilar J, Laurito M, Almirón W, Contigiani M 2008. West Nile Virus in birds, Argentina. *Emerg Infect Dis* 14(4): 689-691.

Diallo M, Ba Y, Sall AA, Diop OM, Ndione JA, Mondo M, Girault L, Mathiot C 2003. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg Infect Dis* 9(3): 362-367.

Downs WG, Anderson CR, Casals J 1957. The Isolation of St. Louis Virus from a Nestling Bird in Trinidad, British West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 6: 693-696.

Dupuis II AP, Marra PP, Kramer LD 2003. Serologic evidence of *West Nile virus* transmission, Jamaica, West Indies. *Emerg Infect Dis* 7(9): 860-863.

El Mamy AB, Baba MO, Barry Y, Isselmou K, Dia ML, El Kory MO, Diop M, Lo MM, Thiongane Y, Bengoumi M, Puech L, Plee L, Claes F, de La Rocque S, Doumbia B 2011. Unexpected Rift Valley fever outbreak, northern Mauritania. *Emerg Infect Dis* 17(10): 1894-1896.

Elton NW 1952. Progress of sylvan yellow fever wave in Central America; Nicaragua and Honduras. *Am J Public Health Nations Health* 42(12): 1527-1534.

Emmons RW, Lennette EH 1967. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a naturally-infected gray fox *Urocyon cinereoargenteus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 125(2): 443-447.

Ernk E, Kozuch O, Sekeyová, Hudec K, Folk C 1971. Antibodies to arboviruses in birds in Czechoslovakia. *Acta Virol* 15: 335.

Farajollahi A, Crans WJ, Bryant P, Wolf B, Burkhalter KL, Godsey MS, Aspen SE, Nasci RS 2005. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol* 42: 4890-4494.

Feres VC, Martelli CM, Turchi MD, Junior JB, Nogueira RM, Rocha BA, Silva LF, Silva MM, Cardoso DD. Laboratory surveillance of Dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol* 2006; 37(3): 179-83.

Fernández Z, Richartz R, Travassos da Rosa A, Soccol VT 2000. Identificação do vírus causador da encefalomielite equina, Paraná, Brasil. *Rev Saude Publica* 34(3): 232-235.

Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, Souza LTM, Iversson LB 1994. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil: Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36(3): 265-274.

Figueiredo LT 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* 2(13): 1643-1649.

Figueiredo LTM 2007. Arboviroses emergentes no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40(2): 224-229.

Figueiredo MLG 2010. Identificação de flavivírus infectando culicídeos de 1999 a 2007 no Brasil. [Tese em Ciências] – Universidade de São Paulo.

Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MP, Costa CA, Farias IP 2008. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14(4): 667-669.

Filipe AR, Pinto MR 1969. Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal. *Am J Trop Med Hyg* 18(3): 423-426.

Filippis AM, Schatzmayr HG, Nicolai C, Baran M, Miagostovich MP, Sequeira PC, Nogueira RM 2001. Jungle yellow fever, Rio de Janeiro. *Emerg Infect Dis* 7: 484-485.

Flores FS, Diaz LA, Batallán GP, Almirón WR, Contigiani MS 2010. Vertical transmission of St. Louis encephalitis virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Córdoba, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(10): 999-1002.

Forattini OP 1965. *Entomologia médica*, v 3, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Forattini OP, Gomes AC, Galati EAB, Rabello EX, Iversson LB 1978. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no sistema da serra do mar, Brasil: Observações no ambiente extradomiciliar. *Rev Saude Publica* 12(3): 297-325.

Fossier AE 1942. Yellow fever and its influence on the development of New Orleans. *Bull Med Libr Assoc* 30(4): 316-326.

Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB 2011. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 17(5): 880-882.

Franco L, Palacios G, Martinez JA, Vázquez A, Savji N, De Ory F, Sanchez-Seco MP, Martín D, Lipkin WI, Tenorio A 2011. First report of sylvatic DENV-2-associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 5(8):e1251.

Gaidamovich S YA, Sokhey J 1973. Studies on antigenic peculiarities of *West Nile virus* strains isolated in the U.S.S.R. by three serological tests. *Acta Virol* 17: 343-350.

Gainer JH, Winkler WG, Lewis AL, Jennings WL, Coleman PH 1964. Isolations of St. Louis encephalitis virus from domestic pigeons *Columba livia*. *Am J Trop Med Hyg* 13: 472-474.

García-Bocanegra I, Jaén-Téllez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernández-Morente M, Fernández-Molera V, Arenas A 2011. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis* 17(12): 2397-2399.

Galindo P, Rodaniche E, Johnson CM 1959. St. Louis encephalitis in Panamá: Isolation of the virus from forest mosquitoes and human blood. *Am J Trop Med Hyg* 8: 557-560.



- Galindo P 1963. *Culex* mosquitoes of the subgenus *Melanoconion* and allied subgenera as hosts of arboviroses. *An Microbiol* 11(parte A): 83-87.
- Galindo P, Peralta PH, Mackenzie RB, Beye HK 1964. St. Louis encephalitis in Panamá: A review and a progress report. *Am J Trop Med Hyg* 13: 455.
- Germain M, Saluzzo JF, Cornet JP, Hervé JP, Sureau P, Camicas JL, Robin Y, Salaün JJ, Hème G 1979. Isolation of the yellow fever virus from an egg-cluster and the larvae of the tick *Amblyomma variegatum*. *C R Seances Acad Sci D* 289(8): 635-637.
- Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW 2003. Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J Med Entomol* 40: 743-746.
- Góes P, Bruno-Lobo M 1961. Estudos sobre arbovírus: Síntese do problema e plano inicial de trabalho: Diagnóstico das arboviroses. *An Microbiol* 1961; 9 (parte A): 67-79.
- Gomes AC, Natal D, Paula MB, Urbinatti PR, Mucci LF, Bitencourt MD 2007. Riqueza e abundância de Culicidae (Diptera) em área impactada, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saude Publica* 41(4): 661-664.
- Gomes G, Causey OR 1959. Bussuquara, a new arthropod-borne virus. *Proc Soc Exper Biol Med* 101(2): 275-279.
- Govett PD, Harms CA, Johnson AJ, Latimer KS, Wellehan JF, Fatzinger MH, Christian LS, Kelly TR, Lewbart GA 2005. Lymphoid follicular cloacal inflammation associated with a novel herpesvirus in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*). *J Vet Diagn Invest* 17(5): 474-479.
- Gulati BR, Singha H, Singh BK, Virmani N, Kumar S, Singh RK 2012. Isolation and genetic characterization of Japanese encephalitis virus from equines in India. *J Vet Sci* 13(2): 111-108.
- Hadfield TL, Turell M, Dempsey MP, David J, Park EJ 2001. Detection of *West Nile virus* in mosquitoes by RT-PCR. *Mol Cell Probes* 15; 147-150.

Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* 42: 311-328.

Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* 32(1): 154-156.

Hamilton SK, Sippel SJ, Melack JM 1996. Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. *Arch Hydrobiol* 137: 1-23.

Hammon WM, Reeves WC, Cunha R, Espana C, Sather G 1948. Isolation from wild bird mites (*Liponyssus sylviarum*) of a virus or mixture of viruses from which St. Louis and western equine encephalitis viruses have been obtained. *Science* 107(2769): 92-93.

Hassan OA, Ahlm C, Sang R, Evander M 2011. The 2007 Rift Valley fever outbreak in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 5(9):e1229.

Heaton CE 1946. Yellow fever in New York City. *Bull Med Libr Assoc* 34(2): 67-78.

Henriques DA 2008. Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna Diptera Nematocera do estado de Rondônia (Amazônia Ocidental Brasileira). São Paulo. Doutorado [Tese em Ciências] – Universidade de São Paulo.

Hoch AL, Gargan TP, Bailey CL 1985. Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by hematophagous diptera. *Am J Trop Med Hyg* 34: 188-193.

Holgado APR, Raya JM, Sabattini MS, Nader ORM, Castagnaro NL 1967. Encuesta serologica sobre arbovirus realizada en animales de la provincia de Tucuman, Argentina. *Bol of Sanit Panam outubro*: 323-329.

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359: 405-414.

Hubálek Z, Halouzka J 1999. West Nile fever: A reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5(5): 643-650.

Huchzermeyer FW, Huchzermeyer KD, Putterill JF 1991. Observations on a field outbreak of pox virus infection in young Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *J S Afr Vet Assoc* 62: 27-29.

Huyvaert KP, Moore AT, Panella NA, Edwards EA, Brown MB, Komar N, Brown CR 2008. Experimental inoculation of house sparrows (*Passer domesticus*) with buggy creek virus. *J Wildl Dis* 44(2):331-40.

Inouye S, Matsuno S, Tsurukubo Y 1984. "Original antigenic sin" phenomenon in experimental flavivirus infections of guinea pigs: studies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol Immunol* 28: 569-574.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012. Censo 2010. <http://www.ibge.gov.br/home/>.

Iversson LB 1977. Epidemia de encefalite por arbovírus na região sul do estado de São Paulo, Brasil, em 1975 e 1976: Aspectos da distribuição cronológica e geográfica dos casos. *Rev Saude Publica* 11(3): 375-388.

Iversson LB 1980. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil no período de 1975 a 1978. *Rev Saúde Públ* 14: 9.

Iversson LB 1994. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região da Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36(4): 343-353.

Iversson LB, Coimbra LT, Travassos APA, Monath TP 1992. Use of immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay in the surveillance of Rocio encephalitis. *Cienc Cult* 44(2/3): 164-166.

Iversson LB, Coimbra TLM 1984. Encefalite na região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, no período pós-epidêmico de 1978 a 1983: Situação do diagnóstico etiológico e características epidemiológicas. *Rev Saude Publica* 18(4): 323-332.

Iversson LB, Silva RAMS, Travassos da Rosa APA, Barros VLRS 1993. Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, ilheus, maguari and tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35(4): 355-359.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Rosa MDB 1989. Ocorrência recente de infecção humana por arbovírus Rocio na região do Vale do Ribeira. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 31(1): 28-31.

Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winkquist AG, Perlino CA, Wiersma S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME, Petersen LR 2003. Transmission of *West Nile virus* from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 348(22): 2196-2203.

Jacobson ER, Ginn PE, Troutman JM, Farina L, Stark L, Klenk K, Burkhalter KL, Komar N 2005. West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *Wildl Dis* 41(1): 96-106.

Jacobson ER, Popp JA, Shields RP, Gaskin JM 1979. Poxlike skin lesions in captive caimans. *J Am Vet Med Assoc* 175: 937-940.

Johnson BW, Cruz C, Felices V, Espinoza WR, Manock SR, Guevara C, Olson JG, Kochel TJ 2007. Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. *Emerg Infect Dis* 13(6): 956-958.

Jones SC, Morris J, Hill G, Alderman M, Ratard RC 2002. St. Louis encephalitis outbreak in Louisiana in 2001. *J La State Med Soc* 154(6): 303-306.

Jonkers AH, Downs WG, Aitken TH, Spence L 1964. Arthropod-borne encephalitis viruses in Northeastern South America. I. A serological survey of Northeastern Surinam. *Trop Geogr Med* 16: 135-145.

Joubert L, Oudar J, Hannoun C, Beytout D, Corniou B, Guillon JC, Panthier R 1970. Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 118: 239-247.

Julian KG, Mullins JA, Olin A, Peters H, Nix WA, Oberste MS, Lovchik JC, Bergmann A, Brechner RJ, Myers RA, Marfin AA, Campbell GL 2003. Aseptic meningitis epidemic during a *West Nile virus* avian epizootic. *Emerg Infect Dis* 9(9): 1082-1088.

Júnior O 2006. Turismo em MS cresce acima da média nacional. Correio do Estado. Campo Grande: 21/01/2006.

<http://www.correiodoestado.com.br/exibir.asp?chave=120982,1,3,21-01-2006>.

Junk WJ, Cunha CN 2005. Pantanal: A large South American wetland at a crossroads. *Ecol Eng* 24: 391-401.

Kaplan AM, Longhurst WL, Randall DL 1978. St. Louis encephalitis in children. *West J Med* 128(4): 279-281.

Karabatsos N 1985. *International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*, 3 ed., American Society of Tropical Medicine & Hygiene, San Antonio, p 1147.

Kauffman EB, Jones SA, Dupuis II AP, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD 2003. Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J Clin Microbiol* 41(8): 3661-3667.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ 2012. *Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, 1327 pp.

Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, Gordy P, Beckett S, Komar N, Gubler D, Bunning M 2004. Alligators as West Nile Virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* 10(12): 2150-2155.

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE 2001. *Fields virology*. v 1-2, 4 ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1395 pp.

Komar N 2000. West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech* 19: 166-176.

- Komar N 2001. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann NY Acad Sci* 951: 58-73.
- Komar N, Clark GG 2006. *West Nile virus* activity in Latin America and Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 19(2): 112-117.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M 2003. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of *West Nile virus*. *Emerg Infect Dis* 9: 311-322.
- Komar N, Langevin S, Monath TP 2009. Use of a surrogate chimeric virus to detect West Nile virus-neutralizing antibodies in avian and equine sera. *Clin Vaccine Immunol* 16: 134-135.
- Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO 2001. Serologic evidence for *West Nile virus* infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg Infect Dis* 7(4): 621-625.
- Kostyukov MA, Alekseev AN, Bul'chev VP, Gordeeva ZE 1986. Experimentally proven infection of *Culex pipiens* L. mosquitoes with West Nile fever virus via the Lake Pallas *Rana ridibunda* frog and its transmission via bites. *Med Parazitol* 6: 76-78.
- Kostyukov MA, Gordeeva EE, Bulychev VP, Hemova NV, Daniyarov OA, Tuktaev TM 1985. The lake frog (*Rana ridibunda*)—one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan—a reservoir of the West Nile fever virus. *Med Parazitol* 3: 49-50.
- Kuno G 2001. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. *Acta Virol* 45: 139–150.
- Kuno G, Chang GJ 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 608-637.
- Kyle JL, Harris E 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu Ver Microbiol* 62:71-92.

Laemmert HW, Causey OR 1962. A febre amarela na região amazônica. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 1962; 12(1): 51-54. In Instituto Evandro Chagas 2002, *Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 7., Instituto Evandro Chagas, Belém, p 121-124.

Laemmert HW, Hughes TP 1947. The virus of Ilhéus encephalitis. *J Immunol* 55: 61-67.

Lager IA 2004. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital* 40(3): 89-93.

Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT 2000. Rapid Detection of West Nile virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 38(11): 4066-4071.

Lawrie CH, Uzcátegui NY, Gould EA, Nuttall PA 2004. Ixodid and argasid tick species and *West Nile virus*. *Emerg Infect Dis* 10(4): 653-657.

Le Guenno B, Bougermouh A, Azzam T, Bouakaz R 1996. West Nile: a deadly virus? *Lancet* 348 (9037): 1315.

Lennette EH, Koprowski H 1946. Antigenic relationships of the West Nile, Japanese B encephalitis, and St. Louis encephalitis viruses. *J Immunol* 52: 235-246.

Levi-Castillo R 1952. The problem of human and equine encephalomyelitis in Ecuador. *Acta Trop (Basel)* 9: 77-80.

Liceaga E 1912. Annual report on yellow fever in the mexican republic. *Am J Public Health (NY)* 2(3): 174-181.

Lima ESS, Silva RAMS 2004. Aspectos morfológicos do parasita Hepatozoon caimani em jacaré (Caiman crocodilus yacare) no Pantanal sul, Comunicado Técnico 41, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Lopes OS, Coimbra TLM, Sacchetta LA, Calisher CH 1978. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation and characterization of the etiologic agent, *Rocio virus*. *Am J Epidemiol* 107: 444-449.

Lopes OS, Sacchetta LA 1974. Epidemiological studies on *Eastern equine encephalitis virus* in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 16: 253-258.

Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pinto GA, Classer CM 1978b. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: II Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *American Journal of Epidemiology* 108: 394-401.

Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pereira LE 1979. Isolation of *St. Louis encephalitis virus* in south Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 28(3): 583-585.

Lopes OS, Sacchetta LA, Francy DB, Jakob WL, Calisher CH 1981. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation of *Rocio virus* from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). *Am J Epidemiol* 113(2): 122-125.

Machado DC, Mondini A, Santana Vdos S, Yonamine PT, Chiaravalloti Neto F, Zanotto PM, Nogueira ML 2012. First identification of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology* 55: 475-483.

Marcondes CB 2001. *Entomologia médica e veterinária*. Editora Atheneu, São Paulo, 432 pp.

Marfin AA, Bleed DM, Lofgren JP, Olin AC, Savage HM, Smith GC, Moore PS, Karabatsos N, Tsai TF 1993. Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis epidemic in Jefferson County Arkansas, 1991. *Am J Trop Med Hyg* 49(1): 30-37.

Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M 2011. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(8): 976-979.

Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N 2005. *West Nile virus* antibodies in colombian horses. *Emerg Infect Dis* 9(11): 1497-1498.

Mauro RA, Tomás WM 1994. Listagem preliminar da avifauna da Estação Ecológica Nhumirim e adjacências, Comunicado Técnico 12, Embrapa Pantanal, Corumbá.



- McIntosh BM, Dickinson DB, McGillivray GM 1969. Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. V. The response of birds to inoculation of virus. *S Afr J Med Sci* 34: 77-82.
- McCaig LF, Janowski HT, Gunn RA, Tsai TF 1994. Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Fort Walton Beach, Florida in 1980. *Am J Trop Med Hyg* 50(3): 387-391.
- McCowan C, Shepherdley C, Slocombe RF 2004. Herpesvirus-like particles in the skin of a saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). *Aust Vet J* 82(6): 375-377.
- McLean RG, Francly DB, Monath TP, Calisher CH, Trent DW 1985. Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 22(2): 232-233.
- Medeiros DB, Nunes MR, Vasconcelos PF, Chang GJ, Kuno G 2007. Complete genome characterization of *Rocio virus* (*Flavivirus: Flaviviridae*), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *J Gen Virol* 88(8): 2237-2246.
- Meiswinkel R 1998. The 1996 outbreak of African horse sickness in South Africa--the entomological perspective. *Arch Virol Suppl* 14: 69-83.
- Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schmahl G 2008. Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: 79-86.
- Mettler NE, Casals J 1971. Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from man in Argentina. *Acta Virol* 15(2): 148-154.
- Mettler NE, Fernández AS, Di Santo MI, Pardo DA 1985. *Flavivirus*: serological survey in horses from the Tandil area. *Rev Argent Microbiol* 17(1): 47-49.
- Miller DL, Manuel MJ, Baldwin C, Burtle G, Ingram D, Hines II ME, Frazier, KS 2003. *West Nile virus* in farmed alligators. *Emerg Infect Dis* 9(7): 794-799.

- Mitchell CJ, Forattini OP 1984. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. *J Med Entomol* 21(1): 34-37.
- Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR 1986. Vector competence experiments with *Rocio virus* and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Rev Saude Publica*. 20: 171-177.
- Miserani MG, McManus C, Santos SA, Silva JA, Mariante AS, Abreu UGP 2002. Avaliação dos fatores que influem nas medidas lineares do cavalo pantaneiro. *Rev Bras Zootec* 31(1): 335-341.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Anderson JF, Vossbrinck CR 2006. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and *West Nile virus* transmission, northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 12(3): 468-474.
- Monath TP, Sabbatini MS, Pauli R, Dafner JF, Mitchell CJ, Bowen GS, Cropp B 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. *Am J Trop Med Hyg* 34(5): 966-975.
- Monath TP, Heinz FX 1996. Flaviviruses. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, *Virology*, Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 961-1034.
- Monath TP, Kemp GE, Cropp CB, Bowen GS 1978. Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with Rocio virus. *Am J Trop Med Hyg* 27: 1251-1254.
- Moncayo AC, Fernandez Z, Ortiz D, Diallo M, Sall A, Hartman S, Davis CT, Coffey L, Mathiot CC, Tesh RB, Weaver SC 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerg Infect Dis* 10(10):1790-1796.
- Mondini A, Cardeal IL, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, Maia IL, Franco C, Góngora DV, Góngora-Rubio F, Cabrera EM, Figueiredo LT, da Fonseca FG, Bronzoni RV, Chiaravalloti-Neto F, Nogueira ML 2007. *Saint Louis encephalitis virus*, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13(1): 176-178.

Mondini A, Bronzoni RV, Cardeal IL, Santos TM, Lázaro E, Nunes SH, Silva GC, Madrid MC, Rahal P, Figueiredo LT, Chiaravalloti-Neto F, Nogueira ML 2007b. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brasil. *J Clin Virol* 40: 84-86.

Montenegro D, Lacerda HR, Lira MT, Oliveira DSC, Lima AAF, Guimarães MJB, Vasconcelos PG 2006. Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(1): 9-13.

Moraes AS, Resende EK, Rodrigues CAG, Mauro RA, Galdino S, Oliveira MD, Crispim SAA, Vieira LM, Soriano BMA, Abreu UGP, Mourão GM 2000. Embrapa Pantanal: 25 anos de pesquisas em prol da conservação do pantanal, os desafios do novo milênio. In Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, III, 2000, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Levis S, Enría D 2006. *West Nile virus* isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 12(10): 1559-1561.

Morales-Betoulle ME, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R, Cordón-Rosales C 2006. *West Nile virus* in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis* 6(12): 1038-1039.

Moreno ES, Rocco IM, Bergo ES, Brasil RA, Siciliano MM, Suzuki A, Silveira VR, Bisordi I, Souza RP; Yellow Fever Working Group 2011. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. *Rev Soc Bras Med Trop* 44(3): 290-296.

Morrison RIG, Ross RK, Antas PTZ. Brazil 1989. In RIG Morrison, RK Ross, *Atlas of nearctic shorebirds on the coast of South America*, v 2, Canadian Wildlife Service Special Publications, Ottawa.

Mourão G, Campos Z 2004. Estrutura de tamanho e razão sexual das populações de jacarés da RPPN-SESC Pantanal e adjacências, Comunicado Técnico 40, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Mourão MP, Bastos MS, Gimaqu JB, Mota BR, Souza GS, Grimmer GH, Galusso ES, Arruda E, Figueiredo LT 2009. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerg Infect Dis* 15(12): 2063-2064.

Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, De Lamballerie X 2007. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(4): 467-477.

Muckenfuss RS, Armstrong C, McCordock HA 1933. Encephalitis-studies on experimental transmission. *Pub Health Rep* 48: 1341.

Nasci RS, White DJ, Stirling H, Oliver J, Daniels TJ, Falco RC, Campbell S, Crans WJ, Savage HM, Lanciotti RS, Moore CG, Godsey MS, Gottfried KL, Mitchell CJ 2001. *West Nile virus* isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. *Emerg Infect Dis* 7(4): 626-630.

Nassar ES, Coimbra TLM, Rocco IM, Pereira LE, Ferreira IB, Souza LTM, Souza DM, Ueda-Ito M, Bergo RCF 1997. Human disease caused by an arbovirus closely related to *Ilheus virus*: Report of five cases. *Intervirology* 40: 247-252.

Natal D, Urbinatti PR, Marucci D 1998. Arbovirus vector ecology in the Brazilian coastal range system. In APA Travassos da Rosa, PFC Vasconcelos, JFS Travassos da Rosa, *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Instituto Evandro Chagas, Belém, pp. 234-247.

Nemeth N, Young G, Ndaluka C, Bielefeldt-Ohmann H, Komar N, Bowen R 2009. Persistent West Nile virus infection in the House Sparrow (*Passer domesticus*). *Arch Virol* 154: 783-789.

Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N 2006. Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J Wildl Dis* 42(1): 1-13.

Nir Y, Lasowski Y, Avivi A, Cgoldwasser R 1969. Survey for antibodies to arboviruses in the serum of various animals in Israel during 1965-1966. *Am J Trop Med Hyg* 18: 416-422.

Nogueira RMR, Eppinghaus AL 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(3): 255-256.

Nogueira RMR, Filippis AM, Coelho JM, Sequeira PC, Schatzmayr HG, Paiva FG, Ramos AM, Miagostovich MP 2002. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33(1): 68-71.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(2): 253.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, Guimarães FR, Araújo ESM, De Simone TS, Baran M, Teixeira GJ, Miagostovich MP 2005. Dengue virus Type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 11(9): 1376-1381.

Nunes AP, Tomás WM 2004. Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: Caracterização e conservação, Documentos 62, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Oem JK, Lee KH, Kim HR, Bae YC, Chung JY, Lee OS, Roh IS 2012. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus infection in Korea. *J Comp Pathol* 147(2-3): 101-105.

Oliveira LD, Pinheiro LEL, Michels IL 2009. Caracterização da Cadeia Turística do Mato Grosso do Sul. *Turismo em Análise* 20(2): 210-229.

Olson GA, Hessler JR, Faith RE 1975. Technics for blood collection and intravascular infusion of reptiles. *Lab Anim Sci* 25(6): 783-786.

Osanai CH, Rosa APT, Tang A, Amaral R, Passos ADC, Tauil PL 1983. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima: Nota previa. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 25(1): 53-54.

Ostlund EN, Andresen JE, Andresen M 2000. West Nile encephalitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 16: 427-441.

Ozkul A, Yildirim Y, Pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D 2006. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 134(4): 826-829.

Paisley JE, Hinckley AF, O'Leary DR, Kramer WC, Lanciotti RS, Campbell GL, Hayes EB 2006. West Nile virus infection among pregnant women in a northern Colorado community, 2003 to 2004. *Pediatrics* 117: 814-820.

Pandey GS, Inoue N, Ohshima K, Okada K, Chihaya Y, Fujimoto Y 1990. Poxvirus infection in Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Res Vet Sci* 49: 171-176.

Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LTM, Couto-Lima D, Campos Z, Nogueira MF, Silva EE, Nogueira RMR, Schatzmayr HG 2011. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(4): 467-474.

Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Alencar J, Santos SJ, Murta M, Serra-Freire NM, Pellegrin AO, Gil-Santana H, Guimarães AE, Silva EE 2010. Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 52: 17-24.

Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, Nogueira MF, Da Silva EE 2010b. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(6): 829-833.

Pauvolid-Corrêa A, Varella RB 2008. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. *Rev Bras Epidemiol* 11(3): 463-472.

Panon G, Fauran P, Digoutte JP 1979. Isolation of Ilheus virus in French Guyana. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 72(4):315-318.

Pavri KM, Singh KRP 1965. Isolation of West Nile virus from *Culex fatigans* mosquitoes from western India. *Ind Jour Med Res* 53: 501-505.

- Pelegriño JL, Suarez M, Guzman MG, Vazquez S, Benitez NR 1996. Vigilancia de las encefalitis de san Luis, equina del este, equina del oeste en la provincia de Ciego de Avila. *Rev Cubana Med Trop* 48(2): 109-113.
- Penrith ML, Nesbit JW, Huchzermeyer FW 1991. Pox virus infection in captive juvenile caimans (*Caiman crocodilus fuscus*) in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 62: 137-139.
- Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TLM, Souza RP, Chamelet ELB 2001. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). *Rev Saude Publica* 35(2): 119-123.
- Phalen DN, Dahlhausen B 2004. West Nile virus. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2(13): 67-78.
- Pinheiro FP, Schatzmayr H, Travassos da Rosa APA, Homma A, Bensabath G 1975. Arbovirus antibodies in children of rural Guanabara, Brazil. *Intervirology* 5(1-2): 93-96.
- Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa AP, Leite OF 1981. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 30(1):145-148.
- Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina AY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, Yazyshina S, Platonova OV, Obukhov IL, Zhukov AN, Vengerov YY, Pokrovskii VI 2001. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 7: 128-132.
- Poovorawan Y, Hutagalung Y, Chongsrisawat V, Boudville I, Bock HL 2006. Dengue virus infection: a major cause of acute hepatic failure in Thai children. *Ann Trop Paediatr* 26(1): 17-23.
- Powell KE, Blakey DL 1977. St Louis encephalitis: The 1975 epidemic in Mississippi. *JAMA* 237(21): 2294-2298.
- Price WH 1957. Studies on the immunological overlap among certain arthropod-borne viruses: the role of serologic relationships in experimental vaccination procedures. *Proc NAS* 47: 115-121.

- Prías-Landínez E, Bernal-Cubides C, Morales-Alarcón A 1968. Isolation of Ilhéus virus from man in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 17(1): 112-114.
- Pugachev KV, Guirakhoo F, Mitchell F, Ocran SW, Parsons M, Johnson BW, Kosoy OL, Lanciotti RS, Roehrig JT, Trent DW, Monath TP 2004. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am J Trop Med Hyg* 71: 639-645.
- Pupo M, Guzmán MG, Fernández R, Llop A, Dickinson FO, Pérez D, Cruz R, González T, Estévez G, González H, Santos P, Kourí G, Andonova M, Lindsay R, Artsob H, Drebot M 2006. *West Nile virus* Infection in humans and horses, Cuba. *Emerg Infect Dis* 12(6): 1022-1024.
- Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, Lefrançois T, Petitclerc M, Martinez D 2004. *West Nile virus*, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis* 10(4): 706-708.
- Ramos MC, Coutinho SD, Matushima ER, Senhorini IL 2002. Poxvirus dermatitis outbreak in farmed brazilian caimans (*Caiman crocodilus yacare*). *Aust Vet J* 80(6): 371-372.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z 2000. Migratory birds and spread of *West Nile virus* in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis* 6(4): 319-328.
- Ravazzani C, Wiederkehr Filho H, Fagnani JP, Costa S 1990. *Pantanal*. Edibran, Curitiba, p 181.
- Rebelo GH, Lugli L 2001. Distribution and abundance of four caiman species (Crocodylia: Alligatoridae) in Jaú National Park, Amazonas, Brazil. *Rev Biol Trop* 49(3-4): 1095-1109.
- Reisen WK, Meyer RP, Milby MM, Presser SB, Emmons RW, Hardy JL, Reeves WC 1992. Ecological observations on the 1989 outbreak of *St. Louis encephalitis virus* in the southern San Joaquin valley of California. *J Med Entomol* 29(3): 472-482.
- Rico-Hesse R 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174(2): 479-493.



Rico-Hesse R 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341.

Rivas F, Diaz LA, Cardenas VM, Daza E, Bruzon L, Alcalá A, De la Hoz O, Caceres FM, Aristizabal G, Martinez JW, Revelo D, De la Hoz F, Boshell J, Camacho T, Calderon L, Olano VA, Villarreal LI, Roselli D, Alvarez G, Ludwig G, Tsai T 1997. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. *J Infect Dis* 175(4): 828-832.

Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K 1996. Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA* 276(14): 1157-1162.

Rocco IM, Katz G, Tubaki RM 2003. Febre amarela silvestre no Estado de São Paulo: casos humanos autóctones. *Rev Inst Adolfo Lutz* 62: 201-206.

Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP, Coimbra TLM, Bessa TAF, Oshiro FM, Lima LBQ, Cerroni MP, Marti AT, Barbosa VM, Katz G, Suzuki A 2005. *St. Louis encephalitis virus*: First isolation from a human in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47(5): 281-285.

Rodaniche E, Galindo P 1963. Ecological observations on Ilhéus virus in the vicinity of Almirante, Republic of Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 12: 924-928.

Rodaniche E, Galindo P 1957b. Isolation of Ilhéus virus from *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala em 1956. *Am J Trop Med Hyg* 6: 686-687.

Rodaniche E, Galindo P 1961. Isolation of the virus of Ilhéus encephalitis from mosquitoes captured in Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 10: 393-394.

Rodaniche E, Galindo P 1957. Isolation of *Yellow fever virus* from *Haemagogus mesodentatus*, *H. equinus* and *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala in 1956. *Am J Trop Med Hyg* 6(2): 232-237.

Rodaniche E, Galindo P, Johnson CM 1957. Isolation of *Yellow fever virus* from *Haemagogus lucifer*, *H. equinus*, *H. spegazzinii* falco, *Sabethes chloropterus* and *Anopheles neivai* captured in Panama in the fall of 1956. *Am J Trop Med Hyg* 6(4): 681-685.

Rodrigues SG, Azevedo RSS, Martins LC, Nunes MRT, Araújo GCB, Monteiro HAO, Segura MNO, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos HB, Vasconcelos PFC 2004. Estudo eco-epidemiológico na área do projeto salobo, Marabá-Pará: Isolamento e identificação de amostras de arbovírus. III Simpósio Internacional sobre arbovírus dos trópicos e febres hemorrágicas. 30 de novembro a 04 de dezembro de 2004, Belém, Pará.

Rodrigues SG, Oliva OP, Araujo FAA, Martins LC, Chiang JO, Henriques DF, Silva EVP, Rodrigues DSG, Prazeres ASC, Tavares-Neto J, Vasconcelos PFC 2010. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. *Rev Pan-Amaz Saude 1*: 81-86.

Romano-Lieber NS, Iversson LB 2000. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. *Rev Saude Publica 34(3)*: 236-242.

Rosa AN, Melo J 1995. *Levantamento da situação atual da produção de touros para o pantanal mato-grossense*, Comunicado Técnico, 14, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Rossi AL 1967. Rural epidemic encephalitis in Venezuela caused by a group A arbovirus (VEE). *Prog Med Virol 9*: 176-203.

Rudnick A 1986. Dengue virus ecology in Malaysia. In A Rudnick, TW Lim *Dengue fever studies in Malaysia*, Institute of Medical Research Bulletin 23, Institute of Medical Research, Kuala Lumpur, p 51-152.

Rudnick A, Marchette NJ, Garcia R 1967. Possible jungle dengue recent studies and hypotheses. *Jpn J Med Sci Biol 20*: 69-74.

Sabattini MS, Shope RE, Vanella JM 1965. Serological survey for arboviruses in Córdoba Province, Argentina. *Am J Trop Med Hyg 14(6)*:1073-1078.

Sakurai T, Bundo K, Igarashi H 1985. Detection of Rocio virus-specific antigenic polypeptides in virus-infected cells and culture fluid by Western blotting method. *Trop Med 27*: 129-140.

Saluzzo JF, Cornet M, Adam C, Eyraud M, Digoutte JP 1986. Dengue 2 in eastern Senegal: serologic survey in simian and human populations 1974–85. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 79(3): 313-322.

Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, Tenorio A 2005. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 126: 101-109.

Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A 2001. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the *Alphavirus* genus. *J Virol Methods* 95: 153-161.

Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120(5): 653-669.

Santos SA 1997. Dieta e nutrição de crocodilianos, Documentos 20, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Santos SA 2007. Recomendações sobre manejo nutricional para eqüinos criados em pastagens nativas no Pantanal, Documentos 22, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Santos SA, Mazza MCM, Sereno JRB, Abreu UGP, Silva JA 1995. Avaliação e conservação do cavalo Pantaneiro, Circular técnica 21, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Santos SA, Mazza MCM, Sereno JRB, Mazza CAS, Pedreira ACMS, Mareante AS, Comastri Filho JA, Silva JA, Marques MCA 2005. Descrição do manejo geral de cavalos pantaneiros na região do Pantanal, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 63, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Santos NSO 2002. Diagnóstico laboratorial das viroses. In NSO Santos, MTV Romanos, MD Wigg, Introdução à virologia humana, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p 24-46.

Santos SA, Silva MP, Mauro RA 1993. Preferência alimentar e uso do habitat do cavalo Pantaneiro na Nhecolândia, Pantanal, Comunicado Técnico 11, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP 1986. An outbreak of *Dengue virus* at Rio de Janeiro, 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81(2): 245-226.

Schmidt JR, El Mansoury HK 1963. Natural and experimental infection of egyptian equines with *West Nile virus*. *Ann Trop Med Parasitol* 57: 415-427.

Schmitt SN, Cooley TM, Fitzgerald SD, Bolin SR, Lim A, Schaefer SM, Kiupel M, Maes RK, Hogle SA, O'Brien DJ 2007. An outbreak of Eastern equine encephalitis virus in free-ranging white-tailed deer in Michigan. *J Wildl Dis* 43(4): 635-644.

Scolari APR 2011. Soroprevalência do vírus da Língua azul em ruminantes domésticos no estado do Paraná, Brasil. São José dos Pinhais. [Dissertação em Ciência Animal] – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Segura MNO, Castro FC 2007. *Atlas de Culicídeos na Amazônia Brasileira: características específicas de insetos hematófagos da família Culicidae*. Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 77.

Seidl A, Moraes AS, Aguilar R, Silva MS 1998. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the brazilian Pantanal. *Prev Vet Med* 33(1): 219-234.

Seijo A, Morales A, Poustis G, Romer Y, Efron E, Vilora G, Lloveras S, Giamperetti S, Puente T, Monroig J, Luppo V, Enría D 2011. Outbreak of St. Louis encephalitis in the Metropolitan Buenos Aires Area. *Medicina (B Aires)* 71(3): 211-207.

SEPLANCT – Secretaria de Estado de Planejamento e de Ciência e Tecnologia 2003. Diagnóstico socioeconômico de Mato Grosso do Sul, 2003. Campo Grande, 2003.106.[http://www.msemnumeros.com.br/msemnumeros3/public/informacoes/arquivo\\_informacao164.pdf](http://www.msemnumeros.com.br/msemnumeros3/public/informacoes/arquivo_informacao164.pdf).

Sereno JRB, Melo MIV, Henry MRJM, Cassali GD 1996. Estudo do comportamento sexual de eqüinos da raça pantaneira no período peripuberal, Comunicado Técnico 18, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Shope RE, Causey OR, Andrade AHP, Theiler M 1964. The Venezuelan Equine Encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 13(5): 723-727. In Instituto Evandro Chagas 2002, *Memórias do Instituto Evandro Chagas. Série: Produção Científica*, v 7, Instituto Evandro Chagas, Belém, pp 191-202.

Sick H 1983. Migrações de aves na América do Sul continental, Publicação Técnica, 2, Centro de Estudos de Migrações de Aves, Ministério da Agricultura, Brasília.

Sick H 1997. Ornitologia brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

Silva JR 2010. Pesquisa de infecções por Flavivírus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos por inquérito sorológico e isolamento viral. Ribeirão Preto. Mestrado [Dissertação em Ciências] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Silva JV, Abdon MM 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesq Agropec Bras* 33: 1703-1711.

Silva ML, Galiza GJ, Dantas AF, Oliveira RN, Iamamoto K, Achkar SM, Riet-Correa F 2011. Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 23(3): 570-575.

Silveira F 2006. Fluxo de turistas cresce em 23,9% no Estado, diz Nilde Brun. Capital do Pantanal. Corumbá: 20/01/2006.

[http://www.capitaldopantanal.com.br/index.php?sPagina=cpt002\\_noticia&iNoticia=1552&sCanal](http://www.capitaldopantanal.com.br/index.php?sPagina=cpt002_noticia&iNoticia=1552&sCanal).

Skupski DW, Eglinton GS, Fine AD, Hayes EB, O'Leary DR 2006. West Nile virus during pregnancy: A case study of early second trimester maternal infection. *Fetal Diagn Ther* 21: 293-295.

Smith MG, Blattner RJ, Heys FM 1944. The isolation of the St. Louis encephalitis virus from chicken mites (*Dermanyssus gallinae*) in nature. *Science* 100(2599): 362-363.

Smithburn JS, Hughes TP, Burke AW, Paul JH 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 20: 471-492.

Smithburn KC 1942. Differentiation of the West Nile virus from the viruses of St. Louis and Japanese b encephalitis. *J Immunol* 44: 25-31.

Smithburn KC, Haddow AJ, Lumsden WH 1949. An outbreak of sylvan yellow fever in Uganda with *Aedes (Stegomyia) africanus* Theobald as principal vector and insect host of the virus. *Ann Trop Med Parasitol* 43(1): 74-89.

Solorzano EG 1953. Yellow fever in Ecuador. *Rev Ecuat Hig Med Trop* 10(1-2): 1-6.

Soriano BMA 1999. Caracterização climática da Sub-região da Nhecolândia, Pantanal-MS. In Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, II, 1996, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Soriano BMA, Galdino S 2002. Análise das condições climáticas em 2000 na Sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil., Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 30, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Souza RV, Cunha RV, Miagostovich MP, Timbó MJ, Montenegro F, Pessoa ET, Nogueira RM, Schatzmayr HG 1995. An outbreak of dengue in the state of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90(3): 345-346.

Spence L, Artsob H, Grant L, Th'ng C 1977. St. Louis encephalitis in southern Ontario: Laboratory studies for arboviruses. *Can Med Assoc J* 116(1): 35-37.

Spinsanti L, Basquiera AL, Bulacio S, Somale V, Kim SCH, Ré V, Rabbat D, Zárata A, Zlocowski JC, QuirogaMayor C, Contigiani M, Palacio S 2003. St. Louis Encephalitis in Argentina: the first case reported in the last seventeen years. *Emerg Infect Dis* 9(2): 271-273.

Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Farías AA, Fabbri C, Aguilar JJ, Ré V, Frías M, Almirón WR, Hunsperger E, Siirin M, Da Rosa AT, Tesh

RB, Enría D, Contigiani M 2008. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol* 42(1): 27-33.

Srihongse S, Johnson CM 1971. The first isolation of Bussuquara virus from man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65(4):541-2.

Steinman A, Banet-Noach C, Tal S, Levi O, Simanov L, Perk S, Malkinson M, Shpigel N 2003. West Nile virus infection in crocodiles. *Emerg Infect Dis* 9(7): 887-888.

Stim TB 1969. Arbovirus plaquing in two simian kidney cell lines. *J Gen Virol* 5: 329-338.

Straatmann A, Santos-Torres S, Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Rodrigues SG, Tavares-Neto J 1997. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 511-515.

Sulkin SE, Sims RA, Allen R 1966. Isolation of St. Louis encephalitis virus from bats (*Tadarida b. mexicana*) in Texas. *Science* 152(3719): 223-225.

Tauil PL, Santos JB, Moraes MAP 2005. Febre amarela. In JC Coura, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, v 2, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1755-1765.

Tauro L, Marino B, Diaz LA, Lucca E, Gallozo D, Spinsanti L, Contigiani M 2012. Serological detection of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus in equines from Santa Fe, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4): 553-556.

Tavares-Neto J, Rodrigues SG, Bastos C, Torres-Morales AE, Travassos da Rosa A 1996. Recent occurrence of human infection by Rocio arbovirus in Salvador, Bahia, Brazil. In Resumos do 32º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia, p. 76.

Tavares-Neto J, Rosa APAT, Vasconcelos PFC, Costa JML, Rosa JFST, Marsden PD 1986. Pesquisa de anticorpos para arbovirus no soro de residentes no povoado de Corte de Pedra, Valença, Bahia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81(4): 351-358.

- Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F 1956. A study of the ecology of *West Nile virus* in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 5(4): 579-620.
- Tber Abdelhaq A 1996. West Nile fever in horses in Morocco. *Bull Off Int Epizoot* 11: 867-869.
- Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 25(1): 7-18.
- Telino-Junior WR, Azevedo-Junior SM, Lyra-Neves RM 2003. Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Zool* 20(3): 451-456.
- Thiboutot MM, Kannan S, Kawalekar OU, Shedlock DJ, Khan AS, Sarangan G, Srikanth P, Weiner DB, Muthumani K 2010. Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS Negl Trop Dis* 4(4): e623.
- Thonnon J, Fontenille D, Tall A, Diallo M, Renaudineau Y, Baudez B, Raphenon G 1998. Re-emergence of yellow fever in Senegal in 1995. *Am J Trop Med Hyg* 59(1): 108-114.
- Tiriba AC, Miziara AM, Lourenço R, Costa CRB, Costa CS, Pinto GH 1976. Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do Estado de São Paulo. *Rev Assoc Med Bras* 22: 415-420.
- Tomich RGP, Nogueira MF, Lacerda ACR, Campos FS, Tomas WM, Herrera HM, Lima-Borges PA, Pellegrin AO, Lobato ZIP, Silva RAMS, Pellegrin LA, Barbosa-Stancioli EF 2009. Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e veados campeiros no Pantanal sul-mato-grossense. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61(5): 1222-1226.
- Traore-Lamizana M, Zeller H, Monlun E, Mondo M, Hervy JP, Adam F, Digoutte JP 1994. Dengue 2 outbreak in southeastern Senegal during 1990: virus isolations from mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 31(4): 623-627.



Travassos J, Bruno-Lobo M, Bruno-Lobo GG 1961. Estudos sobre os arbovírus V: Inquérito sorológico e avaliação da imunidade pós-vacinal em eqüinos no Rio de Janeiro. *An Microbiol* 9 (parte A): 213-225.

Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC 1997. Arboviroses. In RNQ Leão, *Doenças infecciosas e parasitárias: Enfoque amazônico*, Cejup Ltda., Belém, p. 207-225.

Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Hervé J-P, Travassos Da Rosa JFS 1984. Surto de febre amarela silvestre no estado do Pará, Brasil. *Bol Epidemiol* 16(15): 97-104.

Trock SC, Meade BJ, Glaser AL, Ostlund EN, Lanciotti RS, Cropp BC, Kulasekera V, Kramer LD, Komar N 2001. *West Nile virus* outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. *Emerg Infect Dis* 4(7): 745-747.

Tsai TF, Cobb WB, Bolin RA, Gilman NJ, Smith GC, Bailey RE, Poland JD, Doran JJ, Emerson JK, Lampert KJ 1987. Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Mesa County, Colorado. *Am J Epidemiol* 126(3): 460-473.

Tsai TF, Mitchell CJ 1988. St. Louis encephalitis. In TP Monath, *The Arboviruses: Epidemiology and ecology*, v 4., CRC Press Inc., Florida, p. 113-144.

Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI 1998. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352: 767-771.

Tubelis DP, Tomás WM 2002. Revisão e atualização da listagem de espécies de aves registradas na planície do Pantanal, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 39, Embrapa Pantanal, Corumbá.

Turell MJ, O'guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, Fernandez R, Travassos da Rosa A, Guzman H, Tesh R, Rossi CA, Ludwig GV, Mangiafico JA, Kondig J, Wasieloski LP, Pecor J, Zyzak M, Schoeler G, Mores CN, Calampa C, Lee JS, Klein TA 2005. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera:Culicidae) collected in the Amazon basin region of Peru. *J Med Entomol* 42(5): 891-898.

Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol* 9(7): 532-541.

Vasilakis N, Fokam EB, Hanson CT, Weinberg E, Sall AA, Whitehead SS, Hanley KA, Weaver SC 2008. Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains. *Virology* 377(2): 296-307.

Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, Weaver SC 2007. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology* 358(2): 402-412.

van der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ 2005. West Nile virus in the vertebrate world. Brief Review. *Arch Virol* 150: 637-657.

Varma MGR 1989b. Yellow fever. In WHO - World Health Organization. Vector biology and control division. *Geographic distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors*, WHO, Geneva, p. 35-36.

Vasconcelos PFC 2003. Yellow Fever. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(2): 275-293.

Vasconcelos PFC, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, Dias JP, Monteiro HA, Oliva OF, Vasconcelos HB, Oliveira RC, Sousa MR, Barbosa Da Silva J, Cruz AC, Martins EC, Travassos Da Rosa JF 2001. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: Implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol* 65(3): 598-604.

Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, Dégallier N, Moraes MA, da Rosa JF, da Rosa ES, Mondet B, Barros VL, da Rosa AP 1997. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhao state, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and entomologic findings. *Am J Trop Med Hyg* 57(2): 132-137.

Vasconcelos PFC, Rosa AP, Rodrigues SG, Rosa ES, Monteiro HA, Cruz AC, Barros VL, Souza MR, Rosa JF 2001b. Yellow fever in Pará State, Amazon region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis* 7(3 Suppl): 565-569.

Vasconcelos PFC, Sperb AF, Monteiro HA, Torres MA, Sousa MR, Vasconcelos HB, Mardini LB, Rodrigues SG 2003. Isolations of *Yellow fever virus* from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97(1): 60-62.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, Dégallier N, Travassos da Rosa ES 1998. Arboviruses pathogenic for man in Brasil. In APA Travassos da Rosa, PFC Vasconcelos, JFS Travassos da Rosa, *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*, Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 72-99.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS 2001. Gestão imprópria do ecossistema natural na Amazônia brasileira resulta na emergência e reemergência de arbovírus. *Cad Saude Publica* 17: 155-164.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa APA, Dégallier N, Pinheiro FP, Sá Filho, GC 1991. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33(6): 465-476.

Venegas EA, Aguilar PV, Cruz C, Guevara C, Kochel TJ, Vargas J, Halsey ES 2012. Ilheus virus infection in human, Bolivia. *Emerg Infect Dis* 18(3): 516-518.

Ventura AK 1965. St. Louis encephalitis virus in Jamaican birds. *Am J Trop Med Hyg* 14: 297-303.

Viana LA, Marques EJ 2005. Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) from Pantanal, Corumbá, MS, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 14(4): 173-175.

Viana LA, Soares P, Paiva F, Lourenço-De-Oliveira R 2010. Caiman-biting mosquitoes and the natural vectors of *Hepatozoon caimani* in Brazil. *J Med Entomol* 47(4): 670-676.

Wamala JF, Malimbo M, Okot CL, Atai-Omoruto AD, Tenywa E, Miller JR, Balinandi S, Shoemaker T, Oyoo C, Omony EO, Kagirita A, Musenero MM, Makumbi I, Nanyunja M, Lutwama JJ, Downing R, Mbonye AK 2012. Epidemiological and laboratory characterization of a yellow fever outbreak in northern Uganda, October 2010-January 2011. *Int J Infect Dis* 16(7): 536-542.

Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC 2000. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 74(7): 3227-3234.

Wang LH, Fu SH, Wang HY, Liang XF, Cheng JX, Jing HM, Cai GL, Li XW, Ze WY, Lv XJ, Wang HQ, Zhang DL, Feng Y, Yin ZD, Sun XH, Shui TJ, Li MH, Li YX, Liang GD 2007. Japanese encephalitis outbreak, Yuncheng, China, 2006. *Emerg Infect Dis* 13(7): 1123-1125.

Ward MP 2005. Epidemic *West Nile virus* encephalomyelitis: A temperature-dependent, spatial model of disease dynamics. *Prev Vet Med* 71: 253-264.

Weaver SC 2006. Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 299: 285-314.

Weaver SC, Barrett AD 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2(10): 789-801.

Weaver SC, Reisen WK 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85(2): 328-345.

Webster LT, Fite GL 1933. A virus encountered in the study of material from cases of encephalitis in the St. Louis and Kansas City epidemics of 1933. *Science* 78(2029): 463-465.

Wheeler SS, Vineyard MP, Woods LW, Reisen WK 2012. Dynamics of West Nile Virus Persistence in House Sparrows (*Passer domesticus*). *PLoS Negl Trop Dis* 6(10): e1860.

White LA 1987. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *J Clin Microbiol* 25(7): 1221-1224.

White DJ, Kramer LD, Backenson PB, Lukacik G, Johnson G, Oliver J, Howard JJ, Means RG, Eidson M, Gotham I, Kulasekera V, Campbell S 2001. Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of *West Nile virus*, New York state. *Emerg Infect Dis* 7(4): 643-649.

WHO - World Health Organization 1985. *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores: Informes técnicos 719*, World Health Organization, Ginebra, 126 pp.

WHO - World Health Organization 2005. Epidemiological trends and current situation of yellow fever. Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/surveillance/en/index.html>

WHO - World Health Organization 2005b. The yellow fever situation in Africa and South America in 2004. *Weekly Epidemiological Record* 29(80): 249-256.

WHO - World Health Organization 2006. Programmes and Projects, Global Alert and Response, Chikungunya in India, 17 October 2006.

[http://www.who.int/csr/don/2006\\_10\\_17/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2006_10_17/en/index.html)

WHO - World Health Organization 2007. Yellow fever overview. Regional Office for Africa. <http://www.afro.who.int/yellowfever>.

WHO - World Health Organization 2007b. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO, Ginebra, p. 26.

WHO - World Health Organization 2008. Outbreak news. Yellow fever, Brazil. *Wkly Epidemiol Rec* 83(7): 61-62.

WHO - World Health Organization 2008b. Yellow fever, Paraguay. *Weekly Epidemiological Record* 12(83): 105-108.

WHO - World Health Organization 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control/New edition, WHO, Ginebra, 147 pp.

WHO - World Health Organization 2012. Yellow fever in Sudan - update. Global Alert and Response (GAR). [http://www.who.int/csr/don/2012\\_12\\_06/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2012_12_06/en/index.html)

WHO - World Health Organization 2012b. Impact of dengue. Global Alert and Response (GAR). <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

Wichmann D, Kularatne S, Ehrhardt S, Wijesinghe S, Brattig NW, Abel W, Burchard GD 2009. Cardiac involvement in dengue virus infections during the 2004/2005 dengue fever season in Sri Lanka. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40(4): 727-730.

Wilkinson J 2010. Transformações e perspectivas dos agronegócios brasileiros. *R. Bras. Zootec* 39: 26-34.

Yeruham I, Van Ham M, Stram Y, Friedgut O, Yadin H, Mumcuoglu KY, Braverman Y 2010. Epidemiological investigation of bovine ephemeral Fever outbreaks in Israel. *Vet Med Int* 15: pii:290541.

Zeinad AK, Novaretti MCZ, Chamone DAF 2004. Vírus do Nilo ocidental: Nova ameaça à segurança transfusional?. *Rev Bras Hematol Hemoter* 26(2): 114-121.

Zeller HG, Traore-Lamizana M, Monlun E, Hervy JP, Mondo M, Digoutte JP 1992. Dengue-2 virus isolation from humans during an epizootic in southeastern Senegal in November, 1990. *Res Virol* 143(2): 101-102.

Zweighthaft RM, Rasmussen C, Brolnitsky O, Lashof JC 1979. St. Louis encephalitis: The Chicago experience. *Am J Trop Med Hyg* 28(1): 114-118.

## Anexo A



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**CEUA**  
Comissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-1/12

Certificamos que o protocolo (P-74/10-5), intitulado "Estudo sobre a circulação de vírus identificados ao grupo da encefalite japonesa em populações de culicídeos, eqüinos, ovinos e crocodilianos no Pantanal de Mato Grosso do Sul", sob a responsabilidade de RITA MARIA RIBEIRO NOGUEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 07/11/2012 e inclui o uso total de :

### *Caïman yacare*

- 40 Machos, Peso: 12,0000.
- 40 Fêmeas, Peso: 12,0000.

### *Equus caballus*

- 400 Machos, Peso: 200,0000.
- 400 Fêmeas, Peso: 200,0000.

### *Bovinae*

- 125 Machos.
- 125 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 7 de novembro de 2011

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

## Anexo B



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 18363-1	<b>Data da Emissão:</b> 19/12/2008 17:02	<b>Data de Validade:</b> 19/12/2009
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 3501829	Nome: ALEX PAUVOLID-CORRÊA	CPF: 068.829.447-25
Título do Projeto: Estudo sobre a circulação de vírus identificados ao grupo da encefalite japonesa em populações de eqüinos, crocodilianos e artrópodes no Pantanal de Mato Grosso do Sul		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ZILCA MARIA DA SILVA CAMPOS	Pesquisadora	284.603.321-87	190145 SSP-MT	Brasileira
2	DINAIR COUTO LIMA	Pesquisadora	902.940.177-04	081052516 IFP-RJ	Brasileira
3	Hermann Gonçalves Schatzmayr	Pesquisador	012.586.807-34	-	Brasileira
4	Rita Maria Ribeiro Nogueira	Pesquisadora	061.126.925-20	-	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORUMBA	MS	Pantanal Sul Matogrossense	Fora de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Ixodidae, Caiman crocodylus, Culicidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Culicidae, Ixodidae, Caiman crocodylus

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual, Armadilha luminosa
3	Método de captura/coleta (Répteis)	Captura manual

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 52985556**



Página 1/3



## Anexo C



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 18363-2</b>	<b>Data da Emissão: 13/04/2010 16:27</b>
<b>Dados do titular</b>	
Nome: ALEX PAUVOLID-CORRÊA	CPF: 068.829.447-25
Título do Projeto: Estudo sobre a circulação de vírus identificados ao grupo da encefalite japonesa em populações de eqüinos, crocodilianos e artrópodes no Pantanal de Mato Grosso do Sul	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura de artrópodes e coleta sanguínea de crocodilianos e eqüinos	01/2009	01/2013
2	Captura de culicídeos e ixodídeos e coleta sanguínea de crocodilianos e eqüinos	02/2010	01/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ZILCA MARIA DA SILVA CAMPOS	Pesquisadora	284.603.321-87	190145 SSP-MT	Brasileira
2	DINAIR COUTO LIMA	Pesquisadora	902.940.177-04	081052516 IFP-RJ	Brasileira
3	Hermann Gonçalves Schatzmayr	Pesquisador	012.586.807-34	-	Brasileira
4	Rita Maria Ribeiro Nogueira	Pesquisadora	061.126.925-20	-	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORUMBA	MS	Pantanal Sul Matogrossense	Fora de UC

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Culicidae, Ixodidae, Caiman crocodylus
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caiman crocodylus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Culicidae (*Qtde: 3000), Ixodidae (*Qtde: 200)

\* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 24376682**



Página 1/3

## Anexo D



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS  
 RENOVÁVEIS - IBAMA  
 SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA

1) Pág. Nº 1/1  
 2) Data Emissão/Issuing Date: 09/01/2009  
 3) Válido Até/Valid Until: 09/07/2009

4) Licença n°/Permit n°: <b>Procure o IBAMA</b>	6) Selo n°/Stamp n°: * * * * * 7) Selo/Stamp  * * * * *	8) Controle/Check: 5015 (FPZ) - 2L9 9) Autoridade Adm. Emissora/Issuing Management Authority  _____ Assinatura/Signature
5) Licença de/Permit for <b>Exportação</b>		

10) Importador/Importer Silvana Levis Monteagudo 2510 Pergamino, Buenos Aires - 2700 fone: - Argentina - AR	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) ALEX PAUVOLID-CORRÊA FIOCRUZ - Avenida Brasil 4365, Pavilhão Helio e Peggy Pereira Sl 103B RIO DE JANEIRO - 21045900 fone: 02125621707 - pauvolid@ioc.fiocruz.br Brasil - BR
--	---

12) País Importador/Country of Import Argentina - AR	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR
---	--

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction  
 S - Scientific/Fins científicos...

15) Condições Especiais/Special Conditions  
 For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations

16) Dados do Transporte/Transportation Data  
 Local/Place: ALF/AI Rio de Janeiro  
 Data Provável/Probable Date: 01/01/2009

ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/  
 THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item	20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) 1			18) ANIMAL MORTO/BODY	19) - - 0.00 UN - -
20) 1. Amblyomma spp.	21) NC	W	22) animal morto/body	23) - -
20) 2. Anocentor spp.	21) NC	W	22) animal morto/body	23) - -
20) 3. Culex spp.	21) NC	W	22) animal morto/body	23) - -
20) 4. Mansonia spp.	21) NC	W	22) animal morto/body	23) - -
20) 5. Psorophora spp.	21) NC	W	22) animal morto/body	23) - -
	NC	W	200 UN -	

----- Fim dos Itens/Items End -----

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções ex situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"  
 "This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; In substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use."

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------


\_\_\_\_\_  
 ASSINATURA/SIGNATURE

1) Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: [cites.sede@ibama.gov.br](mailto:cites.sede@ibama.gov.br)  
 1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil  
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country  
 3ª Via - Aduana / Customs  
 4ª Via - IBAMA

Anexo E

 <p><b>REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL</b>          MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA          INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE          E DOS RECURSOS NATURAIS          RENOVÁVEIS - IBAMA          Sede: Brasília - DF          Caixa Postal: 70002 - CEP 70815-000 - Brasília - DF</p>	 <p><b>CONVENÇÃO SOBRE O          COMÉRCIO INTERNACIONAL          DE ESPÉCIES DA FLORA          E FAUNA SILVESTRES          EM PERIGO DE EXTINÇÃO</b></p>	<p><b>CONVENTION ON          INTERNATIONAL TRADE          IN ENDANGERED SPECIES          OF WILD FLORA          AND FAUNA</b></p>	1) País Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 13/05/2009 3) Válido Até/Valid Until: 13/11/2009																																
4) Licença nº/Permit nº: <p style="text-align: center;"><b>Procure o IBAMA</b></p>	6) Selo nº/Stamp nº: 516939 7) Selo/Stamp   <p style="text-align: center;"><b>516939</b></p>	8) Controle/Check Nº: 516939/PTHE 0200000000 9) Autoridade Autorizadora/Issuing Management Authority   <p style="text-align: right;">Assinatura/Signature</p>																																	
5) Licença de/Permit for <p style="text-align: center;"><b>Exportação</b></p>																																			
10) Importador/Importer Silvana Leita Montenegro 2510 Pergamino, Buenos Aires - 2700 fone: - Argentina - AR	11) Exportador/Re-exportador/Exporter/Re-exporter ALEX PAUVID-CORREIA PROCRUZ - Avenida Brasil 4305, Pavilhão Helen e Peggy Pereira s/n 1033 RIO DE JANEIRO - 21045900 fone: 02125621700 - pauvid@oc.procruz.br Brasil - BR																																		
12) País Importador/Country of Import Argentina - AR	13) País Exportador/Re-exportador/Country of Export/Re-export Brasil - BR																																		
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Científica/In scientific...																																			
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations																																			
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALFIA/ Rio de Janeiro Data Provável/Probable Date: 12/06/2009 <p style="text-align: center;">           ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO            THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.         </p>																																			
17) Item 20) Espécie: nome científico nome vulgar Species: scientific name common name	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovaente-Data Country of Origin-Permit-Data 24) Cód. País de Reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Data																																
20) 1. Caïman yacare Jacaré-do-pantanal	21) S W	22) pele/skin/urum 90 ML -	19) -- 0,00 ML -- 23) -- 24) --																																
----- FIM DOS ÍTEM/S END -----																																			
PARA SIMPLES CONFERÊNCIAS FOR REFERENCE ONLY																																			
*Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções in situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial. *This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domesticated ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge with potential commercial use.*																																			
25) Endosso de Aduana/Customs Endorsement <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="16" style="height: 40px;"> </td> </tr> </tbody> </table>				Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty																
Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty																				
ASSINATURA/SIGNATURE																																			
Verificar/Verify: <a href="http://ibama.gov.br/citave/verificar">http://ibama.gov.br/citave/verificar</a> E-mail: <a href="mailto:cbta.ande@ibama.gov.br">cbta.ande@ibama.gov.br</a> 1ª Via - Original - Importador   Exportador - Brasil   Importer   Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador   Importador - Estrangeiro   Exporter   Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA																																			

## Anexo F

 <b>REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL</b> MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 06670 - CEP 70818-900 - Brasília-DF		 <b>INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE          E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA</b>		1) Pag. Nº 1/2 2) Data Emissão/Issuing Date: 16/02/2011 3) Válido Até/Valid Until: 16/08/2011
4) Licença nº/Permit nº: <p style="text-align: center; font-weight: bold;">11BR005932/DF</p>	6) Selo nº/Stamp nº: ***** 7) Selo/Stamp <p style="text-align: center;">*****</p>	8) Controle/Check 1: DQXUTYZP9EFGZIVZ 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority <div style="text-align: center;">             Assinatura/Signature         </div>		
5) Licença de/Permit for <p style="text-align: center; font-weight: bold;">Exportação</p>				
10) Importador/Importer Nicholas Komar 3150 Rampart Road Fort Collins, Colorado - 80521 fone: - Estados Unidos da América - US		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) ALEX PAUVOLID-CORRÊA FIOCRUZ - Avenida Brasil 4365, Pavilhão Helio e Peggy Pereira Sl 103B RIO DE JANEIRO - 21045900 fone: 02125621707 - pauvalid@ioc.fiocruz.br Brasil - BR		
12) País Importador/Country of Import Estados Unidos da América - US		13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR		
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Scientific/Fins científicos...				
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations				
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/AI Rio de Janeiro Data Provável/Probable Date: 10/02/2011				
ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.				
17) Item	20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) 1			18) ANIMAL MORTO/BODY	19) --3,500.00 UN --
20) 1. Mansonia spp.	21) NC   W	22) animal morto/body 750,00 UN -	23) - -	24) - -
20) 2. Psorophora spp.	21) NC   W	22) animal morto/body 750,00 UN -	23) - -	24) - -
20) 3. Culex spp.	21) NC   W	22) animal morto/body 500,00 UN -	23) - -	24) - -
20) 4. Coquillettidia spp.	21) NC   W	22) animal morto/body 500,00 UN -	23) - -	24) - -
20) 5. Anopheles spp.	21) NC   W	22) animal morto/body 500,00 UN -	23) - -	24) - -

1° Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: [cites.sede@ibama.gov.br](mailto:cites.sede@ibama.gov.br)  
 1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil  
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country  
 3ª Via - Aduana / Customs  
 4ª Via - IBAMA

## Anexo F (Continuação)



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS  
 RENOVÁVEIS - IBAMA  
 SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA

1) Pag. Nº 2/2  
 2) Data Emissão/Issuing Date: 16/02/2011  
 3) Válido Até/Valid Until: 16/08/2011

4) Licença nº/Permit n°: <p style="text-align: center;"><b>11BR005932/DF</b></p>	6) Selo nº/Stamp n°: ***** 7) Selo/Stamp <p style="text-align: center;">*****</p>	8) Controle/Check #: DQXUTYZP9EFGZIVZ 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority <div style="text-align: center;">                       Assinatura/Signature                 </div>
5) Licença de/Permit for <p style="text-align: center;"><b>Exportação</b></p>		
20) 6. Aedeomyia spp.	21) NC   W	22) animal morto/body 500,00 UN -
		23) - 24) -

----- Fim dos Itens/Items End -----

Carlos Mendes Wolney Valente  
 CITES Management Authority

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições /in situ/, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções /ex situ/, desde que coletados em condições /in situ/, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"

"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use."

**25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement**

Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
<div style="text-align: center; margin-top: 20px;">                     _____                      ASSINATURA/SIGNATURE                 </div>															

\* Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: [cites.sede@ibama.gov.br](mailto:cites.sede@ibama.gov.br)  
 1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil  
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country  
 3ª Via - Aduana / Customs  
 4ª Via - IBAMA



## Anexo G



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS  
 RENOVÁVEIS - IBAMA  
 SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF



CONVENÇÃO SOBRE O  
 COMÉRCIO INTERNACIONAL  
 DE ESPÉCIES DA FLORA  
 E FAUNA SELVAGEM  
 EM PERIGO DE EXTINÇÃO

CONVENTION ON  
 INTERNATIONAL TRADE  
 IN ENDANGERED SPECIES  
 OF WILD FAUNA  
 AND FLORA

1) Pag. Nº 1/1  
 2) Data Emissão/Issuing Date: 16/02/2011  
 3) Válido Até/Valid Until: 16/08/2011

4) Licença n°/Permit n°: <p style="text-align: center;"><b>11BR005933/DF</b></p>	6) Selo n°/Stamp n°: 518904 <div style="text-align: center;">                       0 5 1 8 9 0 4                 </div>	8) Controle/Check : 4YEWU6YKGN1S4JB4 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority <div style="text-align: center;">                       Assinatura/Signature                 </div>
5) Licença de/Permit for <p style="text-align: center;"><b>Exportação</b></p>		

10) Importador/Importer Nicholas Komar 3150 Rampart Road Fort Collins, Colorado - 80521 fone: - Estados Unidos da América - US	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) ALEX PAUVOLID-CORRÊA FIOCRUZ - Avenida Brasil 4365, Pavilhão Helio e Peggy Pereira SI 103B RIO DE JANEIRO - 21045900 fone: 02125621707 - pauvalid@ioc.fiocruz.br Brasil - BR
12) País Importador/Country of Import Estados Unidos da América - US	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-exporter) Brasil - BR

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction  
 S - Scientific/Fins científicos...

15) Condições Especiais/Special Conditions  
 For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations

16) Dados do Transporte/Transportation Data  
 Local/Place: ALF/Al Rio de Janeiro  
 Data Provável/Probable Date: 10/02/2011

ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/  
 THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) I		18) SORO/SERUM	19) -- 300,00 ML --
20) 1. Caïman crocodilus subsp. yacare	21) II   W	22) sangue/blood 300,00 ML -	23) - - 24) - -

----- Fim dos Itens/Items End -----

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções in situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"

"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use."

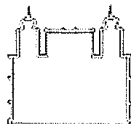
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty
------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------

\_\_\_\_\_  
 ASSINATURA/SIGNATURE

\* Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: [cites.sede@ibama.gov.br](mailto:cites.sede@ibama.gov.br)  
 1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil  
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country  
 3ª Via - Aduana / Customs  
 4ª Via - IBAMA

## Anexo H



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz  
Laboratório de Flavivírus  
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, 1º andar.  
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL  
Tel./fax: (21) 2562-1707, 2562-1920.

### TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE SANGUE DE EQUINOS EM PROPRIEDADE PARTICULAR

#### FAZENDA BAÍA BONITA

##### Dados de identificação:

**Título do trabalho:** Estudo sobre a circulação de vírus identificados ao grupo da encefalite japonesa em populações de culicídeos, equinos, ovinos e crocodilianos no Pantanal de Mato Grosso do Sul.

**Tipo de trabalho:** Tese de doutorado do curso de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, de autoria de Alex Pauvolid-Corrêa e orientação da Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, desenvolvida pelo Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz.

**Responsável:** Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, chefe do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde.

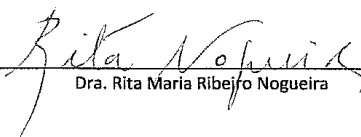
**Telefones e e-mail para contato:** (21) 2562-1707, (21) 2562-1920, [pauvolid@ioc.fiocruz.br](mailto:pauvolid@ioc.fiocruz.br), [rita@ioc.fiocruz.br](mailto:rita@ioc.fiocruz.br).

**Nome e localização da propriedade participante:** Fazenda Baía Bonita, Sub-região da Nhecolândia do Pantanal de Mato Grosso do Sul

**Nome do proprietário (a):** Sra. Maria Esther Battesti de Oliveira

Convidamos a Sra. Maria Esther Battesti de Oliveira, proprietária da Fazenda Baía Bonita a participar da pesquisa intitulada "Estudo sobre a circulação de vírus identificados ao grupo da encefalite japonesa em populações de culicídeos, equinos, ovinos e crocodilianos no Pantanal de Mato Grosso do Sul". A pesquisa objetiva contribuir para o conhecimento da circulação de arbovírus de importância médica e veterinária na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul, através de análises laboratoriais de culicídeos, bem como alíquotas de sangue equino, ovino e crocodiliano.

Na propriedade Fazenda Baía Bonita será realizada amostragem sanguínea em equinos, através da coleta de oito mililitros de sangue total de cada um dos animais a serem utilizados no estudo. O procedimento será realizado pelo veterinário Alex Pauvolid-Corrêa (CRMV-RJ 6996) e tem como riscos mais importantes a ocorrência de hemorragia e aparecimento de hematoma no local da venopunção. Para minimizar os riscos descritos, uma leve compressão por 30 segundos seguida por aplicação de solução comercial larvicida, repelente e cicatrizante será realizada após a venopunção. Entre os benefícios encontrados está o conhecimento da circulação de arbovírus de importância médica e veterinária na área bem como nos animais da propriedade. A participação da Sra. Maria Esther Battesti de Oliveira enquanto proprietária da Fazenda Baía Bonita foi voluntária, cabendo o direito de desistir a qualquer tempo. As informações geradas pela pesquisa podem ser acessadas pela proprietária a partir dos telefones e e-mails informados a qualquer momento. Os gastos referentes às coletas e ao processamento das amostras serão de responsabilidade do Laboratório de Flavivírus.

  
Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira

Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira  
Chefe do Laboratório  
de Flavivírus - IOC/FIOCRUZ  
Matr. SIAPE 0461985-5

Eu, Maria Esther Battesti de Oliveira, proprietária da Fazenda Baía Bonita declaro ter autorizado a realização de amostragem sanguínea em equinos de minha propriedade, após ter sido informada sobre o objetivo da pesquisa acima descrita, bem como os riscos e benefícios dos procedimentos a serem realizados nos animais.

  
Sra. Maria Esther Battesti de Oliveira

## Anexo I

### COLETA DE SORO EQUÍNO

Nº Amostra \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ Fazenda \_\_\_\_\_

Nº Animal \_\_\_\_\_ Nome \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Pelagem \_\_\_\_\_ Sexo ( ) MI ( ) MC ( ) F

Há quanto tempo reside no Pantanal \_\_\_\_\_

Sintomatologia/Observações \_\_\_\_\_

( ) Raiva                      mês/ano ( / )                      ( ) Aborto equino <sup>(RRV-1)</sup>      mês/ano ( / )

( ) Influenza                      mês/ano ( / )                      ( ) Encefalomielite              mês/ano ( / )

( ) Rinopneumonia <sup>(RRV-1/RRV-4)</sup>      mês/ano ( / )                      ( ) Tétano                      mês/ano ( / )

Nº Amostra \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ Fazenda \_\_\_\_\_

Nº Animal \_\_\_\_\_ Nome \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Pelagem \_\_\_\_\_ Sexo ( ) MI ( ) MC ( ) F

Há quanto tempo reside no Pantanal \_\_\_\_\_

Sintomatologia/Observações \_\_\_\_\_

( ) Raiva                      mês/ano ( / )                      ( ) Aborto equino <sup>(RRV-1)</sup>      mês/ano ( / )

( ) Influenza                      mês/ano ( / )                      ( ) Encefalomielite              mês/ano ( / )

( ) Rinopneumonia <sup>(RRV-1/RRV-4)</sup>      mês/ano ( / )                      ( ) Tétano                      mês/ano ( / )

Nº Amostra \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ Fazenda \_\_\_\_\_

Nº Animal \_\_\_\_\_ Nome \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Pelagem \_\_\_\_\_ Sexo ( ) MI ( ) MC ( ) F

Há quanto tempo reside no Pantanal \_\_\_\_\_

Sintomatologia/Observações \_\_\_\_\_

( ) Raiva                      mês/ano ( / )                      ( ) Aborto equino <sup>(RRV-1)</sup>      mês/ano ( / )

( ) Influenza                      mês/ano ( / )                      ( ) Encefalomielite              mês/ano ( / )

( ) Rinopneumonia <sup>(RRV-1/RRV-4)</sup>      mês/ano ( / )                      ( ) Tétano                      mês/ano ( / )

Nº Amostra \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ Fazenda \_\_\_\_\_

Nº Animal \_\_\_\_\_ Nome \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Pelagem \_\_\_\_\_ Sexo ( ) MI ( ) MC ( ) F

Há quanto tempo reside no Pantanal \_\_\_\_\_

Sintomatologia/Observações \_\_\_\_\_

( ) Raiva                      mês/ano ( / )                      ( ) Aborto equino <sup>(RRV-1)</sup>      mês/ano ( / )

( ) Influenza                      mês/ano ( / )                      ( ) Encefalomielite              mês/ano ( / )

( ) Rinopneumonia <sup>(RRV-1/RRV-4)</sup>      mês/ano ( / )                      ( ) Tétano                      mês/ano ( / )



## Anexo J

### Preparação de antígeno para ELISA de bloqueio

#### 1. Infecção das garrafas de C6/36

- a. Prepare duas garrafas de 150cm<sup>2</sup> (T-150) com C6/36, uma a ser infectada (T-150A) e outra a ser usada para controle do antígeno (T-150B). Prepare também uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> (T25) a ser usada como controle celular.
- b. Quando as monocamadas estiverem confluentes, normalmente dois dias de preparadas, considere um índice de multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1 e calcule o volume do inoculo viral a ser diluído em 5 mL de meio de manutenção com 2% de SFB.

Exemplo:

- Uma T-150 C6/36 confluyente =  $5 \times 10^7$  células.
- Título de WNV =  $1.6 \times 10^8$  UFP/100  $\mu$ L.
- MOI de 0.1 = 1 partícula viral infecciosa para cada 10 células.

$5 \times 10^7 / 10 =$  Logo,  $5 \times 10^6$  partículas virais infecciosas são necessárias.

$$\begin{array}{l} 1.6 \times 10^8 \text{ PFU} \quad \text{-----} \quad 100 \mu\text{L} \quad 1.6 \times 10^8 \times X \mu\text{L} = 5 \times 10^8 \quad X = 3.12 \mu\text{L} \\ 5 \times 10^6 \text{ PFU} \quad \text{-----} \quad X \mu\text{L} \quad X \mu\text{L} = 5 \times 10^8 / 1.6 \times 10^8 \end{array}$$

(MOI) – O índice de multiplicidade de infecção é a razão entre o número de partículas virais infecciosas e o número de células alvo em um determinado espaço.

Por exemplo: MOI de 0.1 significa uma partícula viral infecciosa para cada dez células.

## Anexo J (Continuação)

- Descartar o meio das garrafas.
- Inocular as células de T-25 com 1 mL de meio de manutenção.
- Inocular as células de T-150B com 5 mL de meio de manutenção.
- Inocular as células de T-150A com 5 mL de vírus diluído.
- Incubar as garrafas por 1h a 28°C com 5% CO<sub>2</sub>, movimentando gentilmente as garrafas a cada quinze minutos.
- Adicionar 5 mL de meio de manutenção a T-25, 20 mL de meio de manutenção a T-150B e por fim, adicionar 20 mL de vírus diluído a T-150A e então incubar todas as garrafas a 28°C com 5% CO<sub>2</sub>.

### 2. Coleta das células

- a. No auge da replicação viral, usualmente 120h após inoculação por WNV, coletar as células de T-150B e depois de T-150A usando *cell scraper*.
- b. Visualizar e então descartar T-25.
- c. Transferir o sobrenadante de T-150B para um tubo para centrifuga (CT) de 50 mL.
- d. Transferir o sobrenadante de T-150A para um tubo para centrifuga (CT) de 50 mL.
- e. Centrifugar os CTs a 4000 rpm a 0°C por 10 minutos.
- f. Descartar o sobrenadante.
- g. Usando uma pipeta sorológica, resuspender os *pellets* em 6 mL de solução salina borato pH 9 (BS9) e transferir para um CT de 15 mL.
- h. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos.

## Anexo J (Continuação)

- i. Repetir as letras f, g e h duas vezes (Total de 3 lavagens) e então descartar os sobrenadantes.
- j. Adicionar 0.9 mL de 0.1% SDS, seguida pela adição de 0.1 mL of Triton-X 100 e então resuspending com pipeta sorológica.
- k. Adicionar 2 mL de BS9, somando um total de 3 mL. Não adicionar BS9 para um antígeno mais concentrado.
- l. Agitar em *vortex*!
- m. Com um sonicador que a *probe* entra no tubo, sonicar iniciando-se pelas células de T-150B, utilizando-se 30 de amplitude por 30 segundos a 3 minutos. Os tubos devem estar em gelo durante a sonicação! (A amplitude e o tempo de sonicação podem ser aumentados caso o *pellet* não tenha sido desintegrado). **O *pellet* precisa estar totalmente desintegrado a olho nu! Caso ainda seja possível se ver grumos de células deve-se continuar a sonicação até a total desintegração do *pellet*.** Recomenda-se fazer um teste com o sonicador em água antes de iniciar a sonicação nas células
- n. Centrifugar a 8000 rpm por 10min a 4°C. Caso não tenha uma centrífuga que atinja esta velocidade, considerar aliquotar os 3 mL em dois tubos de 2 mL para centrifugação em microcentrífuga!
- o. Armazenar em novos tubos, alíquotas de 200 µL dos sobrenadantes em congelador -70°C e descartar os tubos centrifugados com debris celulares. Marcar no rótulo dos tubos aqueles que contêm antígeno de WNV (a partir de T-150A) e aqueles apenas com células (a partir de T-150B).
- p. **Evitar congelar e descongelar o antígeno!** Por isso a recomendação em se aliquotar em 200 µL.

(CT) - 50 mL Self-Standing Centrifuge Tube, Plug Seal Cap, Polypropylene, RNase-/DNase-free, Nonpyrogenic, Sterile CORNING® 430897.

(BS9) - Para 1 Litro: 80 mL sodium chloride (1.5M NaCl), 100 mL boric acid (0.5M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 24 mL sodium hydroxide (1.0M NaOH), q.s para 900ml dH<sub>2</sub>O, ajustar pH para 9 com NaOH ou HCL, q.s para 1L dH<sub>2</sub>O e armazenar a 4°C.

## Anexo J (Continuação)

(Boric acid - 0.5M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) - 30.92g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, adicionar 700 mL de dH<sub>2</sub>O quente, dissolver, quando frio q.s para 1L dH<sub>2</sub>O e armazenar em temperatura ambiente.

(Sodium chloride - 1.5M NaCl) - 87.66g NaCl, q.s para 1L dH<sub>2</sub>O e armazenar em temperature ambiente.

(Sodium hydroxide - 1.0M NaOH) - 10g NaOH, q.s para 250 mL dH<sub>2</sub>O (fresca)  
(0.1% SDS) - 100 µL SDS 10% em 9900 µL de dH<sub>2</sub>O.

Primeira versão: Ginger Young

Revisado por Alex Pauvalid-Correa

## Anexo K

### TESTE PARA CÁLCULO DE DILUIÇÃO DE ANTÍGENO E ANTICORPO MONOCLONAL

#### 1. Adicionar antígeno diluído em placa de poliestireno de 96 poços (96WPS)

- Diluir antígeno (Ag) em *Coating Buffer* (CB) da diluição 1:40 até 1:5120 como segue:
- Em um eppendorff® de 2 mL adicionar 30 µL de Ag + 1170 µL de CB = 1200 µL diluído a 1:40.
- Homogeneizar por pelo menos 10 segundos em *vortex* e então transferir 200 µL de antígeno a 1:40 à linha A (Do poço A1 até o poço A5)
- Adicionar 100 µL de CB da linha B (B1 até B5) para a linha H (H1 to H5)
- Com uma pipeta multicanal transferir 100 µL da linha A para B, então da linha B para C e assim sucessivamente. Ao final, todos os poços da coluna 1 até a coluna 5 têm que ter 100 µL de Ag diluído.
- Envolver 96WPS com PF e então incubar *overnight* a 4°C.

#### 2. Diluição de Anticorpos monoclonais (MAb)

- Durante a incubação de 96WPS, usando uma placa de polipropileno de 96 poços (96WPP) diluir MAb em *Blocking Buffer* (BB) da diluição 1:40 até 1:5120 como segue:
- Em um eppendorff® de 2 mL adicionar 5 µL de MAb + 1245 µL de BB = 1250 µL em diluição de 1:250.
- Homogeneizar por pelo menos 10 segundos em *vortex* e então transferir 120 µL de MAb diluído a 1:250 para a coluna 1.
- Adicionar 60 µL de BB da coluna 2 para 5.

## Anexo K (Continuação)

- Com pipeta multicanal transferir 60  $\mu\text{L}$  da coluna 1 para 2, então da coluna 2 para a coluna 3 e assim sucessivamente. Ao final, todos os poços da coluna 1 até a coluna 5 devem ter 60  $\mu\text{L}$  de MAb diluído.

### 3. Adicionar BB

- Depois de uma incubação *overnight*, lavar a 96WPS de quarto a seis vezes com solução de lavagem (WS) usando lavador de placas automático.
- Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de BB a cada poço da 96WPS.
- Incubar 96WPS a 37°C por pelo menos 40min.
- Depois da incubação, lavar a 96WPS de quarto a seis vezes com WS usando um lavador de placas automático.

### 4. Teste de Ag e MAb

- Transferir 50  $\mu\text{L}$  das diluições de MAb da 96WPP para seus respectivos poços em 96WPS.
- Envolver 96WPS com PF e então incubar a 37°C por 1h.

### 5. Aquecer a o leitor de ELISA

- Faltando 30 minutos para o fim da última incubação, ligar o leitor de placas e regular para *measure optical density* 405 ou 415 nm.

### 6. Utilização do substrato peroxidase

- Faltando 10 minutos para o fim da última incubação combinar igual volume de cada uma das duas soluções (A e B) do *Peroxidase Substrate System* ABTS® (ABTS) usando um CT.
- Depois da incubação, lavar 96WPS de quarto a seis vezes com o lavador de placas automático.

## Anexo K (Continuação)

- Homogeneizar ABTS por pelo menos 10 segundos em *vortex* antes de transferir para um reservatório de reagente.
- Adicionar 75 µL da solução de ABTS diretamente a cada poço da 96WPS.
- Incubar a 37°C por 10 minutos

### 7. Leitura das placas

- Levar as placas ao leitor de placas e gravar e imprimir os resultados.

### 8. Interpretando os resultados

- Aplicar os resultados na seguinte fórmula:

$$100 - [(TS - B)/(CS - B)] \times 100$$

TS - *Mean optical density* da amostra de soro testada

CS - *Mean optical density* do soro utilizado como controle negativo

B - *Background optical density*, usualmente a média dos 36 poços da coluna 5 até a coluna 12 (poços B).

Ag (1:40) MAb (1:250)	Ag (1:40) MAb (1:500)	Ag (1:40) MAb (1:1000)	Ag (1:40) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:80) MAb (1:250)	Ag (1:80) MAb (1:500)	Ag (1:80) MAb (1:1000)	Ag (1:80) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:160) MAb (1:250)	Ag (1:160) MAb (1:500)	Ag (1:160) MAb (1:1000)	Ag (1:160) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:320) MAb (1:250)	Ag (1:320) MAb (1:500)	Ag (1:320) MAb (1:1000)	Ag (1:320) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:640) MAb (1:250)	Ag (1:640) MAb (1:500)	Ag (1:640) MAb (1:1000)	Ag (1:640) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:1280) MAb (1:250)	Ag (1:1280) MAb (1:500)	Ag (1:1280) MAb (1:1000)	Ag (1:1280) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:2560) MAb (1:250)	Ag (1:2560) MAb (1:500)	Ag (1:2560) MAb (1:1000)	Ag (1:2560) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B
Ag (1:5120) MAb (1:250)	Ag (1:5120) MAb (1:500)	Ag (1:5120) MAb (1:1000)	Ag (1:5120) MAb (1:2000)	B	B	B	B	B	B	B	B

## Anexo K (Continuação)

(CT) - 50 mL Self-Standing Centrifuge Tube, Plug Seal Cap, Polypropylene, RNase-/DNase-free, Nonpyrogenic, Sterile CORNING® 430897

(96WPS) - 96 well cell culture cluster, Flat bottom with low evaporation lid, Tissue culture treated, Nonpyrogenic, Polystyrene, Sterile COSTAR® 3595

(96WPP) - 96 well cell culture cluster, Round bottom with Polystyrene lid, Nonpyrogenic, Polypropylene, Sterile COSTAR® 3879

(CB) – Para 1 litro: 50mM sodium carbonate (5.3g), 50mM sodium bicarbonate (4.2g), Ajustar o pH para 9.6 e armazenar a 4°C.

(BB) - 5% leite sem gordura em solução WS. Para 1 Litro: 50g de leite em pó sem gordura, 1 mL Tween20, 100 mL PBS10X e qs para 1 litro de água deionizada.

(PF) – Parafilm "M" laboratory film, American National Can™

(WS) - 0.1% Tween20 em phosphate Buffered saline (PBS) 1X. Para 1 litro: 1 mL Tween20, 100 mL PBS10X e qs para 1 litro de água deionizada.

(PBS10X) - 92.3g hemagglutination buffer e qs para 1 litro de água deionizada.

(PBS1X) - 100 mL de PBS10X e qs para 1 litro de água deionizada.

First version: Ginger Young

Reviewed by Alex Pauvolid-Correa



## Anexo L

### PROTOCOLO DE ELISA DE BLOQUEIO PARA FLAVIVÍRUS

1. Adicionar antígeno aos poços da placa de poliestireno de 96 poços (96WPS)
  - Diluir o antígeno\* em *Coating Buffer* (CB) usando tubos para centrífuga (CT) de acordo com a diluição de antígeno ótima.
  - Homogeneizar por pelo menos 10 segundos em *vortex* antes de transferir para o reservatório de reagente.
  - Adicionar a 60 poços da 96WPS, 100 µL do antígeno diluído\*.
  - Envolver a 96WPS com *parafilm* (PF) e então incubar *overnight* a 4°C.
2. Lavar placas
  - Lavar a 96WPS de quarto a seis vezes com *Washing Solution* (WS) usando um lavador de placa automático.
3. Adicionando *Blocking buffer* (BB)
  - Adicionar 200 µL de BB a cada poço da 96WPS.
  - Incubar a 37°C por pelo menos 40 minutos.
4. Lavagem das placas
  - Lavar a 96WPS de quarto a seis vezes com WS usando um lavador de placas automático.
5. Diluição das amostras de soro
  - Durante a incubação de 96WPS, usando uma placa de polipropileno de 96 poços (96WPP) diluir as amostras de soro a serem testadas em diluição de 1:10 em BB.
  - Incluir três poços para cada amostra, além de controle positivo e negativo.

## Anexo L (Continuação)

\* Na primeira vez, adicionar o antígeno negativo (produzido a partir de apenas células) em metade dos poços para avaliar a especificidade do MAb usado.

- Transferir 50 µL do soro diluído, além dos controles da 96WPP para os poços internos da 96WPS.
- Envolver a 96WPS com PF e então incubar a 37°C por 2h.

### 6. Lavagem das placas

- Lavar a 96WPS de quarto a seis vezes com WS usando um lavador de placas automático.

### 7. Diluição do anticorpo monoclonal (MAb)

- Faltando alguns minutos para o fim da última incubação, diluir MAb *horse radish peroxide labeled* em BB usando um CT de acordo com a diluição ótima.
- Homogeneizar por pelo menos 10 segundos em *vortex* antes de transferir para um reservatório de reagentes.
- Adicionar 50 µL de MAb diluído diretamente a cada poço da 96WPS.
- Envolver a 96WPS com PF e então incubar a 37°C por 1h.

### 8. Lavagem de placas

- Lavar 96WPS de quarto a seis vezes com WS usando um lavador de placas automático.

### 9. Aquecer o leitor de ELISA

- Faltando 30 minutos para o fim da última incubação, ligar o leitor de placas e regular para *measure optical density* 405 ou 415 nm.

## Anexo L (Continuação)

### 10. Utilização do substrato peroxidase

- Faltando 10 minutos para o final da última incubação, combinar iguais volumes de cada uma das soluções (A e B) da *Peroxidase Substrate System* ABTS® usando um CT.
- Homogeneizar por pelo menos 10 segundos em *vortex* antes de transferir para o reservatório de reagente.
- Adicionar 75 µL de solução de ABTS diretamente a cada poço da 96WPS.
- Incubar a 37°C por 10 minutos.

### 11. Leitura de placas

- Levar as placas para o leitor de placas e depois gravar e imprimir os resultados.

### 12. Interpretação dos resultados

- Aplicar os resultados na seguinte fórmula:

$$100 - [(TS - B)/(CS - B)] \times 100$$

TS - *Mean optical density* da amostra de soro testada

CS - *Mean optical density* da amostra de soro utilizado como controle negativo

B - *Background optical density*, usualmente a média dos 36 poços externos (poços B)

C até U - Amostras; + controles positivos; - controles negativos

## Anexo L (Continuação)

B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	C	C	C	I	I	I	P	P	P	+	B
B	D	D	D	J	J	J	Q	Q	Q	+	B
B	E	E	E	L	L	L	R	R	R	+	B
B	F	F	F	M	M	M	S	S	S	-	B
B	G	G	G	N	N	N	T	T	T	-	B
B	H	H	H	O	O	O	U	U	U	-	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

(CT) - 50 mL Self-Standing Centrifuge Tube, Plug Seal Cap, Polypropylene, RNase-/DNase-free, Nonpyrogenic, Sterile CORNING® 430897

(96WPS) - 96 well cell culture cluster, Flat bottom with low evaporation lid, Tissue culture treated, Nonpyrogenic, Polystyrene, Sterile COSTAR® 3595

(CB) - Por 1 litro: 50mM sodium carbonate (5.3g), 50mM sodium bicarbonate (4.2g), Ajustar o pH para 9.6 e armazenar a 4°C

(PF) - Parafilm™ laboratory film, American National Can™

(WS) - 0.1% Tween20 em phosphate Buffered saline (PBS) 1X. Para 1 litro: 1 mL Tween20, 100 mL PBS10X e qs para 1 litro de água deionizada.

(PBS10X) - 92.3g hemagglutination buffer e qs para 1 litro de água deionizada

(PBS1X) - 100 mL de PBS10X e qs para 1 litro de água deionizada

(BB) - 5% de leite em pó sem gordura em solução WS. Para 1 litro: 50g de leite em pó sem gordura, 1 mL Tween20, 100 mL PBS10X e qs para 1 litro de água deionizada.

(96WPP) - 96 well cell culture cluster, Round bottom with Polystyrene lid, Nonpyrogenic, Polypropylene, Sterile COSTAR® 3879

First version: Ginger Young

Reviewed by Alex Pauvolid-Correa

## Anexo M

### Propagação e titulação viral

- Preparar uma garrafa de 150 cm<sup>2</sup> (T-150), a ser infectada, e uma de 25 cm<sup>2</sup> (T-25), a ser usada como controle celular, de células VERO ou C6/36. Normalmente a propagação de WNV é realizada em C6/36 e a dos demais flavivírus em VERO.
- Com monocamadas semi-confluentes ou confluentes calcular a diluição da suspensão viral considerando um MOI 0,1 como descrito em Anexo (J)
- Descartar o meio de cultura das garrafas
- Inocular T-25 com 1 mL de meio de manutenção
- Inocular T-150 com 5 mL de suspensão viral diluída
- Incubar as garrafas por 1h a 28°C (C6/36) ou 37°C (VERO) com 5% CO<sub>2</sub> agitando levemente a cada 15 minutos
- Ao final da incubação, adicionar 5 mL de meio de manutenção em T-25 e 20 mL de meio de manutenção em T-150 e incubar as garrafas em mesmas condições de temperatura com 5%CO<sub>2</sub>
- No pico de replicação viral, como 120h após a infecção por WNV, coletar e transferir o sobrenadante para um tubo a ser centrifugado e desprezar as garrafas.
- Centrifugar em 10000 rpm a 4°C por 10 minutos
- Coletar o sobrenadante, adicionar 20% de SFB, agitar em *vortex*, e alíquotar em pequenas frações a serem mantidas a -70°C
- Para evitar sucessivos descongelamentos, durante a propagação viral preparar diversas alíquotas de modo que para cada ensaio seja utilizada uma alíquota ainda não previamente descongelada.

## Anexo M (Continuação)

### Titulação viral

#### Materiais:

- Criotubos estéreis de 1.8 mL
- Micropipetas 200 µL
- Ponteiras com barreira de 200 µL estéreis
- Gelo triturado
- Estufa 37°C com 5% CO<sub>2</sub>
- Banho Maria a 43°C
- Pipeta sorológica de 25 mL
- Fonte luminosa
- Balança
- *Vortex*

#### Reativos:

- Meio 2X Ye-lah (L-15 2X, MEM 2X...)
- Bicarbonato de Sódio (NaCHO<sub>3</sub>)
- Penicilina/Estreptomicina
- Gentamycin
- L-Glutamina
- Fungizone
- Agarose
- Meio diluente (Eagle earle, MEM, L-15...)
- Água deionizada

## Anexo M (Continuação)

- Suspensões virais tituladas
- Vermelho Neutro

### Procedimentos:

Antes de iniciar o trabalho, devem-se observar as monocamadas celulares das microplacas de 6 poços que deverão estar em condições ótimas com aproximadamente 80% de confluência e mantê-las em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

- Rotular oito criotubos de 1,8 mL com as diluições 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-8</sup> e um tubo CC (Controle celular).
- Aplicar 900 µL de diluente em todos os oito criotubos e manter todos os tubos em gelo.
- Preparar a primeira solução de *overlay* como segue:

Primeiro precisa-se calcular o volume que será utilizado. Para cada poço das microplacas de seis poços, utiliza-se 3 mL da primeira solução de *overlay*.

Neste exemplo, temos oito diluições e utilizaremos uma microplaca de seis poços para cada diluição (seis poços para cada diluição). Logo serão utilizadas oito microplacas de seis poços para as diluições. Além disso, utilizaremos uma microplaca para controle celular.

Desta forma, ao final serão utilizadas 8 + 1 = 9 microplacas de seis poços. Logo, 9 X 6 X 3 = 162 mL. Entretanto pela viscosidade sempre se perde volume na preparação e por isso é altamente recomendável preparar aproximadamente 100 mL a mais do necessário. Portanto 250 mL serão preparados.

Para cada 100 mL da primeira solução de *overlay* utiliza-se:

- NaCHO<sub>3</sub> 3 mL
- Pen/Estrepto 100X 1 mL
- L-Glutamina 1 mL
- Anfotericina B 1000X 100 µL
- Gentamicina 1000X 100 µL

## Anexo M (Continuação)

- 2X Ye-lah\* q.s. to 50 mL
- 1% agarose deionizada) 50 mL (0,5g de agarose, 50 mL de água)

De acordo com o exemplo precisamos de 250 mL, logo:

- NaCHO<sub>3</sub> 7,5 mL
- Penicilina/Estrepto 100X 2,5 mL
- L-Glutamina 2,5 mL
- Anfotericina B 1000X 250 µL
- Gentamicina 1000X 250 µL
- 2X Ye-lah\* q.s. to 125 mL
- 1% agarose deionizada) 125 mL (1,25g de agarose, 125 mL de água)

Para a preparação da primeira solução de *overlay*, primeiro se prepara a agarose:

Em um Becker que caiba dentro de um micro-ondas, adiciona-se agarose em pó e depois a água deionizada. A agarose deve ser aquecida em micro-ondas até ficar uma solução límpida totalmente dissolvida, assim como se utiliza em preparação de gel de eletroforese. O tempo de aquecimento varia de acordo com o volume e o tipo de micro-ondas.

\*Os componentes do meio 2X Ye-lah estão descritos no Anexo (P).

Preparada a agarose, manter o Becker tampado evitando contaminação e em Banho-maria à 43°C. Para facilitar todo o processo, se possível manter um Banho-Maria dentro do fluxo.

*Recomenda-se preparar e manter em Banho-Maria a agarose logo no início da primeira incubação. A agarose preparada há apenas alguns minutos antes de sua utilização poderia estar muito quente e queimar a monocamada celular.*



## Anexo M (Continuação)

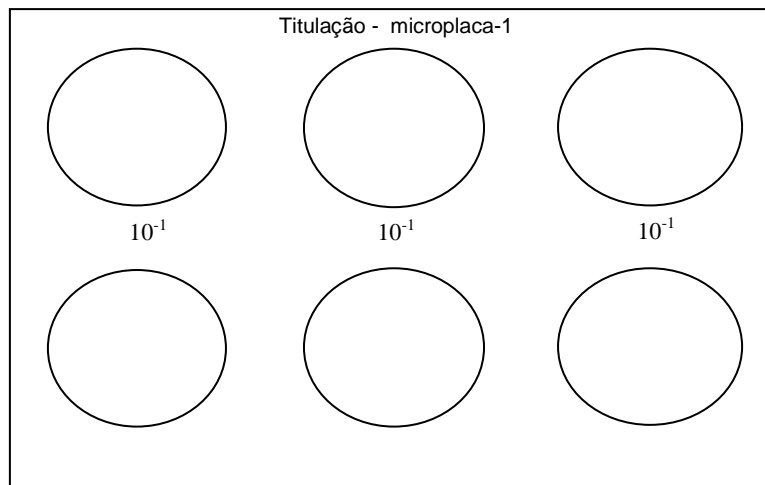
Prepara-se agora o restante da solução:

Em uma proveta adicionar todos os reagentes deixando por último a adição do meio 2X Ye-lah até atingir o volume final que neste exemplo é de 125 mL.

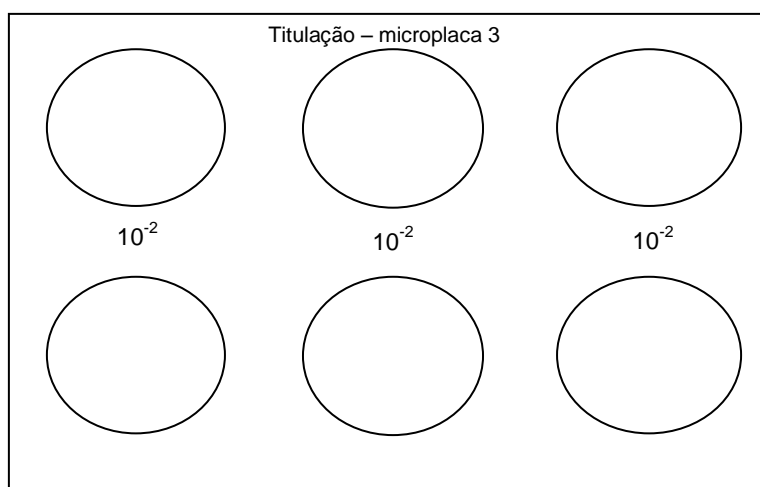
Transfere-se todo o volume para outro frasco a ser também mantido no mesmo Banho-Maria da agarose. Não se deve misturar a solução de agarose e o restante da solução neste momento porque muitas vezes como o restante da solução está bem mais frio do que a agarose que acabou de ser preparada em micro-ondas, a mistura dos dois poderia solidificar a agarose impedindo o seu uso. A solução deverá estar líquida para ser utilizada.

Se possível, manter o nível de água do banho-Maria suficiente para cobrir o nível tanto da agarose como do restante da solução.

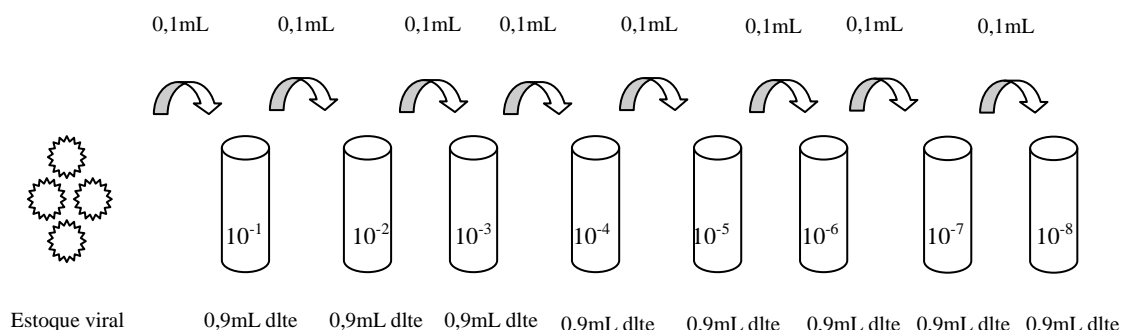
- Preparada a primeira solução de *overlay*, numeram-se as microplacas de seis poços com cultura de VERO.



## Anexo M (Continuação)



Inicia-se a diluição viral. Descongelar o estoque viral, vortexar e aplicar 100  $\mu$ L no tubo  $10^{-1}$ , vortexar e aplicar 100  $\mu$ L do tubo  $10^{-1}$  para o tubo  $10^{-2}$ , vortexar e aplicar 100  $\mu$ L do  $10^{-2}$  para o tubo  $10^{-3}$  e assim sucessivamente:



**ATENÇÃO ! CASO A SUSPENSÃO VIRAL QUE ESTÁ SENDO TITULADA VENHA A SER UTILIZADA APENAS PARA PRNT INCLUIR AS ETAPAS A1 e A2**

**A1** - Após preparadas as diluições, aplicar a uma microplaca de 96 poços 140  $\mu$ L de cada diluição, além do diluente em seis poços usando uma coluna para cada diluição, como por exemplo: Coluna 1 (poço A até poço F) 140  $\mu$ L de diluente, coluna 2 (poço A até poço F) 140  $\mu$ L de diluição  $10^{-8}$ , coluna 3 (poço A até poço F) 140  $\mu$ L de diluição  $10^{-7}$  ...

**A2** - Incubar a placa de 96 poços por 1h a 37°C com 5%  $\text{CO}_2$  simulando a incubação entre soro diluído e suspensão viral diluída que ocorre na PRNT.

## Anexo M (Continuação)

Descarta-se o meio de cultura dos poços da primeira microplaca de seis poços a ser inoculada que é a microplaca do controle celular, apenas vertendo a microplaca e derramando o meio em um descarte sobre a caixa retangular forrada com papel toalha que é usado para impedir que espirre.

Deixa-se a microplaca aberta e inicia-se a inoculação de 100 µL de diluente em cada um dos seis poços da microplaca do controle celular.

Depois se inicia a inoculação em mesmo volume das diluições iniciando-se pela maior diluição  $10^{-8}$  até a menor diluição  $10^{-1}$ . Nesta ordem pode se quiser usar a mesma ponteira com barreira. Após inoculação fechar a microplaca mantendo-a no fluxo. Inicia-se o descarte de meio da segunda microplaca  $10^{-7}$  e assim sucessivamente.

*ATENÇÃO! A inoculação deve ser feita pelo canto dos poços e o mais rápido possível para se evitar o ressecamento das monocamadas celulares. O horário do início da incubação das microplacas também deverá ser anotado para que cada microplaca tenha sido incubada por 1h.*

Quando as nove microplacas já foram inoculadas e estão empilhadas no fluxo, levá-las para a estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> onde serão incubadas por 1 h. Esta caracteriza a primeira incubação (segunda incubação caso incluídas etapas A1 e A2).

Durante a incubação as microplacas inoculadas deverão ser levemente movimentadas a cada 15 a 20 minutos de modo a facilitar a adsorção viral e também manter úmida a monocamada celular.

Faltando 20 minutos para o fim da incubação, adicionar o restante da primeira solução de *overlay*, que estava em um frasco separado, ao frasco com agarose.

Ao final de 1h da incubação, trazer as microplacas de seis poços para o fluxo e iniciar no fluxo a aplicação da primeira solução de *overlay*.

*ATENÇÃO! Lembrar que se deve iniciar a aplicação do overlay pelas primeiras microplacas inoculadas que estarão naturalmente embaixo na pilha.*

Usando uma pipeta sorológica aplicar pelo canto do poço, 3 mL da solução de *overlay* na mesma ordem em que os poços foram inoculados.

Após aplicação da solução de *overlay* deixar as microplacas por 20 minutos no fluxo para permitir a solidificação. Levar as microplacas para o fluxo para nova incubação.

Agora estas microplacas ficarão incubadas se possível sem qualquer movimentação até a formação de placas que pode variar de dois dias para alfavírus, três dias para WNV e quatro dias para SLEV, ILHV etc.

## Anexo M (Continuação)

### Segunda solução de *overlay*

O dia da aplicação da segunda solução de *overlay* varia de acordo com o vírus que está sendo utilizado e basicamente tem como princípio fornecer mais nutrientes para a cultura celular e corar as células vivas permitindo a detecção de placas, que por serem áreas de morte celular não estarão coradas.

*ATENÇÃO! O corante utilizado na segunda solução de overlay é uma solução tóxica para as células prejudicando o metabolismo celular e por isso o segundo overlay deverá ser feito apenas na véspera ou a poucos dias da leitura final do resultado.*

Para WNV, por exemplo, pode-se aplicar a segunda solução de *overlay* no 3º dia pós-infecção para realização da leitura no 4º dia. O ideal é aplicar a segunda solução de *overlay* um pouco antes do ápice do ECP.

A preparação da segunda solução de *overlay* é praticamente a mesma da primeira solução de *overlay* com exceção para a inclusão do corante vermelho neutro

*ATENÇÃO! O modo de preparação da segunda solução de overlay deve ser feito exatamente como feito para a preparação da primeira solução de overlay! Isso significa preparar a solução aproximadamente 1h antes de sua aplicação e deixando a mistura da solução final para uns 20 minutos antes do início da aplicação.*

A segunda solução de *overlay* deve ser preparada como segue:

Para cada 100 mL da segunda solução de *overlay* utiliza-se:

- NaCHO<sub>3</sub> 3 mL
- Vermelho Neutro 2 mL
- Pen/Estreptomicina 100X 1 mL
- L-Glutamine 1 mL
- Anfotericina B 1000X 100 µL
- Gentamicina 1000X 100 µL
- 2X Ye-lah q.s. to 50 mL
- 1% agarose deionizada) 50 mL (0,5g de agarose, 50 mL de água)

## Anexo M (Continuação)

Usando uma pipeta sorológica aplicar pelo canto do poço, 3 mL da segunda solução de *overlay*.

Após aplicação da solução de *overlay* deixar as microplacas por 20 minutos no fluxo e então levar as microplacas para o fluxo para a última incubação.

A partir de quatro horas depois ou no dia seguinte, realizar a contagem de placas em uma sala escura com uma fonte luminosa. Marcar as placas pelo lado de baixo da microplaca com um marcador escuro. Melhor visualização é feita pelo fundo da microplaca, isto é com o lado de baixo da microplaca voltado para o pesquisador.

Confirmar a ausência de placas formadas por vírus na microplaca do controle celular, assim como confirmar a qualidade das monocamadas celulares. Iniciar a leitura anotando o número de placas em cada poço.

### Cálculo do título

Fazer a média do número de placas nos seis poços de cada microplaca, resultando em média de placas por diluição.

Fazer a média das duas médias das últimas duas diluições em que se pode contar pelo menos 15 placas, considerando as diluições.

Por exemplo:

Muitas placas em todos os poços de  $10^{-5}$  impedindo a contagem

Média de 120 placas em  $10^{-6}$

Média de 18 placas em  $10^{-7}$

Média de 3 placas em  $10^{-8}$

$$\frac{120 \times 10^6 + 18 \times 10^7}{2} = \frac{12 \times 10^7 + 18 \times 10^7}{2} = \frac{30 \times 10^7}{2}$$

$$15 \times 10^7 = 1,5 \times 10^8$$

Logo o título desta suspensão viral é de  $1,5 \times 10^8$  por 100  $\mu$ L

Alex Pauvolid-Correa

## Anexo N

### Teste de neutralização por redução de placas (PRNT)

#### Materiais:

- Microplacas de polipropileno e com tampa de poliestireno, de 96 poços com fundo curvo e estéreis. O polipropileno impede agregação de anticorpos ao fundo dos poços e é a microplaca mais indicada uma vez que esta microplaca será utilizada apenas para diluição do soro e incubação com a suspensão viral)
- Microplacas de poliestireno com tampa, de seis poços com fundo plano e estéreis e com monocamada de células VERO semi-confluente de preferência com dois a três dias de preparadas.
- Micropipetas 200 µL
- Micropipeta multicanal 200 µL
- Ponteiras com barreira de 200 µL estéreis
- Ponteiras sem barreira de 200 µL estéreis
- Gelo triturado
- Tubos eppendroff
- Tubos Falcon de 15 e 50 mL
- Estufa 37°C com 5% CO<sub>2</sub>
- Banho Maria a 43°C e a 56°C
- Pipeta sorológica de 25 mL
- Fonte luminosa
- Balança
- *Vortex*

## Anexo N (Continuação)

### Reativos:

- Meio 2X Ye-lah (L-15 2X, MEM 2X...)
- Bicarbonato de Sódio (NaCHO<sub>3</sub>)
- Penicilina/Estreptomicina
- Gentamycin
- L-Glutamina
- Fungizone
- Agarose
- Meio diluente (Eagle earle, MEM, L-15...)
- Água deionizada
- Suspensões virais tituladas
- Vermelho Neutro

### Procedimento

- Antes de iniciar o trabalho, devem-se observar as monocamadas celulares das microplacas de seis poços que deverão estar em condições ótimas com aproximadamente 80% de confluência e mantê-las em estufa a 37°C com 5% CO<sup>2</sup>.
- Se as amostras já tiverem sido utilizadas para isolamento viral ou caso não venham a ser submetidas ao isolamento viral, inativar as amostras por 30 minutos a 56°C em Banho-Maria. Caso as amostras ainda sejam utilizadas para isolamento viral, fracionar uma alíquota e então inativar.

## Anexo N (Continuação)

Rotular uma microplaca de 96 poços da seguinte forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1						P9					
B	P2						P10					
C	P3						P11					
D	P4						P12					
E	P5						P13					
F	P6						P14					
G	P7						P15					
H	P8						P16					

Microplaca amostras: P1 até P16 representam amostras com seis diluições.

Rotular outra microplaca de 96 poços a ser utilizada para titulação da diluição viral que será utilizada no ensaio da seguinte forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SD											
B	1:5											
C	1:10											
D	1:20											
E												
F	CC											
G	CV											
H	$\alpha$											

Microplaca titulação: SD= Sem diluição, CV= Controle viral, CC=Controle celular e  $\alpha$ = Amostra controle positiva



## Anexo N (Continuação)

### Diluições das amostras a serem utilizadas

- Decidir o fator de diluição a ser utilizado para as amostras:
- Fator de diluição 2 (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320)
- Fator de diluição 4 (1:10, 1:40, 1:160, 1:640, 1:2560, 1:10240)

### Cálculo das diluições das amostras a serem aplicadas às microplacas de 96 poços:

Para se fazer a diluição inicial da amostra a ser utilizada na PRNT, deve-se levar em consideração que além do soro diluído, aos poços serão inoculados consecutivamente e em igual volume a suspensão viral diluída.

Desta forma, para diluir em microplaca de 96 poços uma amostra a ser iniciada no ensaio de PRNT em 1:10, deve-se calcular a primeira diluição como 1:5 considerando que após a inoculação em igual volume da suspensão viral, a amostra passará então a 1:10, a diluição 1:20 passará a ser 1:20 e assim sucessivamente.

### Diluição e aplicação nas microplacas das amostras e titulação:

Exemplo 1: Para uma PRNT com 16 amostras (P1 até P16) em microplaca de seis poços utilizando-se Fator de diluição 2 e iniciando-se por 1:10, aplica-se à microplaca de 96 poços:

#### Microplaca amostras

- 192 µL de diluente nas colunas 1 e 7
- 120 µL de diluente em todas as outras colunas
- 48 µL de cada amostra inativada nas colunas 1 e 7

## Anexo N (Continuação)

### Microplaca Titulação

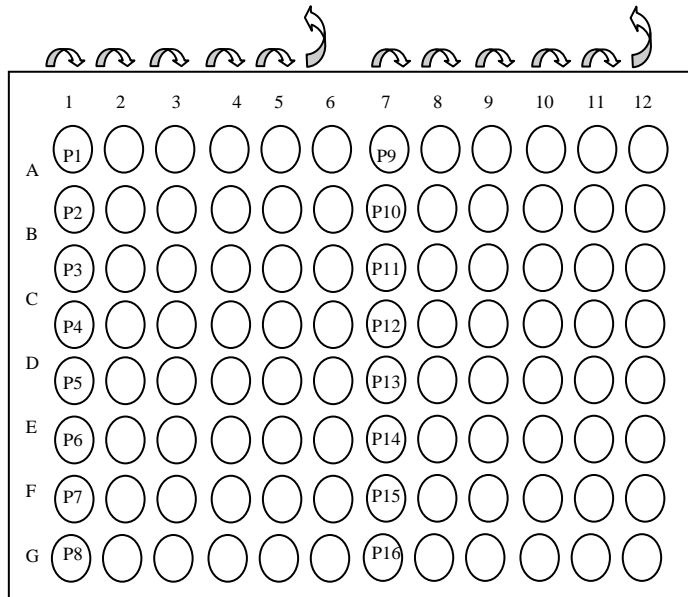
- \*Aplica-se à fileira SD (A1 a A6), 100  $\mu$ L de diluente
- \*Aplica-se à fileira 1:5 (B1 a B6), 240  $\mu$ L de diluente
- \*Aplica-se à fileira 1:10 (C1 a C6), 150  $\mu$ L de diluente
- \*Aplica-se à fileira 1:20 (D1 a D6), 150  $\mu$ L de diluente
- Aplica-se ao poço CC, 240  $\mu$ L de diluente
- Aplica-se ao poço CV, 120  $\mu$ L de diluente
- Aplica-se ao poço  $\alpha$ , 96  $\mu$ L de diluente
- Aplica-se ao poço  $\alpha$ , 24  $\mu$ L da amostra controle positivo

\*A titulação da suspensão viral que está sendo utilizada no ensaio que será explicada a frente!

Utilizando-se a micropipeta multicanal e ponteiros sem barreira se desejar, após homogeneização da coluna 1 serão passadas 120  $\mu$ L para a coluna 2, após homogeneização 120  $\mu$ L para a coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 6. Ao final, 120  $\mu$ L da coluna 6 serão descartados para que todos os poços tenham o mesmo volume de 120  $\mu$ L com diluições de 1:5 até 1:160.

Posteriormente serão inoculados 120  $\mu$ L de suspensão viral diluída e as diluições passarão a ser de 1:10 até 1:320. O volume final de 240  $\mu$ L de cada diluição foi calculado para ser suficiente para a aplicação de 100  $\mu$ L em duplicatas em poços da microplaca de seis poços de cultura celular.

## Anexo N (Continuação)



Microplaca amostras: Diluição das amostras de soro

Ao final da diluição dos soros e da aplicação de diluente na microplaca titulação, manter as microplacas fechadas a 8°C (geladeira) enquanto se prepara a diluição viral!

### Diluição da suspensão viral

Preparar uma diluição da suspensão viral de modo que o volume final de 100 µL de soro diluído mais suspensão viral (SR+SV) que será inoculado em cada poço da microplaca de cultivo celular tenha um número adequado de UFP. O número adequado de UFP deve ser ajustado ao tamanho da placa de lise produzida pelo vírus e o tipo de microplaca que foi selecionada e não deverá ser menor que 30UFP para PRNT<sub>90</sub>.

Microplacas de seis poços são sempre preferidas porque, pelo tamanho dos poços, as placas podem ser contadas com maior clareza e por isso com acurácia. Normalmente se recomenda trabalhar com 50 a 80 UFP em 100 µL de SR+VR. Para vírus que produzem placas de lise grandes recomenda-se a utilização de um número menor de UFP.

Exemplo1: Considerando PRNT para DENV-1, utilizando-se Fator de diluição 2 e iniciando-se por 1:10 em uma microplaca de 6 poços. Calcula-se a diluição viral da seguinte forma:

Devido às relativamente grandes placas de lise de DENV-1 sugere-se a utilização de 80UFP (Normalmente calcula-se para um número de UFP acima do desejado, de

## Anexo N (Continuação)

pelo menos de 10 a 20 mais, porque muitas vezes o que se vê nos ensaios é um número de placas inferior ao que foi calculado). Isso é particularmente importante porque para que o resultado de um ensaio possa ser confiável em uma PRNT<sub>90</sub> é preciso haver ao menos 30 placas no controle viral.

\* Apesar de serem inoculados 100 µL em cada poço, prepara-se 120 µL (60 µL SR + 60 µL VR) por poço para haver uma margem confiável durante a passagem da microplaca de 96 poços para a microplaca de seis poços com cultura celular. Neste exemplo prepararemos 240 µL porque utilizaremos dois poços por diluição

$$100 \mu\text{L SR+VR} \text{ ----- } 80 \text{ UFP}$$

$$*120 \mu\text{L SR+VR} \text{ ----- } X$$

$$100X = 120 \times 70\text{UFP} \quad X = 96\text{UFP}$$

Conhecido o título viral, calcula-se o número de UFP no volume a ser utilizado para formação do conjugado na microplaca de 96 poços.

$$1000 \mu\text{L} \text{ ----- } 1.6 \times 10^6 \text{ UFP}$$

$$60 \mu\text{L} \text{ ----- } X \quad X = 9.6 \times 10^4 \text{ UFP}$$

Calcula-se a diluição viral, dividindo-se o número de UFP presente em 60 µL da suspensão viral estoque não diluída ( $9,6 \times 10^4$ ) pelo número de UFP que queremos ter em 120 µL (60 µL SR + 60 µL VR), que neste caso é 96UFP:

$$\frac{9,6 \times 10^4}{96} = 1000$$

Logo, o estoque viral a ser utilizado deverá estar diluído em 1:1000.

Para fazer a diluição viral primeiro precisamos saber quanto de suspensão viral será necessário.

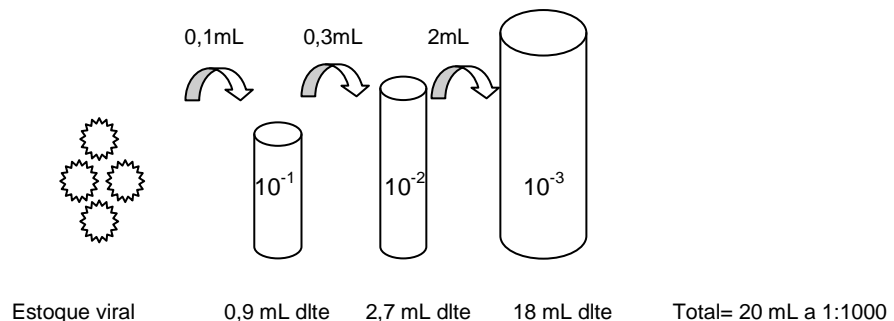
Neste exemplo temos 16 amostras em uma microplaca de 96 poços a serem inoculados 120 µL de suspensão viral diluída em cada um dos poços das seis diluições. Serão 120 µL de soro diluído e 120 µL de vírus diluído em cada poço.

## Anexo N (Continuação)

Logo, 96 poços X 120  $\mu\text{L}$  = 11,520  $\mu\text{L}$ . Entretanto ainda temos a microplaca titulação em que serão utilizados + 840  $\mu\text{L}$  = 12,360  $\mu\text{L}$  (A aplicação na microplaca titulação será mais bem explicada à frente).

Normalmente prepara-se um volume maior do que o necessário de suspensão viral para que não haja o risco de faltar suspensão viral durante o ensaio

Logo, a seguinte diluição poderia ser realizada:



Atenção! Toda a diluição viral deverá ser realizada e mantida em gelo e cada diluição deverá ser homogeneizada em *vortex* antes de se retirar uma alíquota para a seguinte diluição.

Vortexar a última diluição e colocar todo o volume em um recipiente estéril (reservatório de reagente ou placa de petri) de modo a ser possível se utilizar a pipeta multicanal. Manter o recipiente em gelo.

Trazer as microplacas de 96 poços da geladeira e aplicar, utilizando uma pipeta multicanal e com ponteiras com barreira, 120  $\mu\text{L}$  de suspensão viral diluída em cada poço da microplaca amostras.

Aplica-se 120  $\mu\text{L}$  de suspensão viral diluída no poço CV e  $\alpha$ . Utilizando-se pipeta multicanal iniciar a aplicação da suspensão viral no restante da microplaca titulação como segue:

A titulação da diluição viral que está sendo utilizada para o ensaio é realizada para confirmar o número de UFP que está sendo utilizado, uma vez que o número de UFP observado no ensaio pode ser diferente do número de UFP que foi calculado.

Preparar quatro diluições iniciando-se pela diluição 1:2, refletindo a situação do SR+VR, e a partir desta diluição realizar as diluições seguintes. Por exemplo,

## Anexo N (Continuação)

trabalhando com 90% de neutralização se recomenda as diluições “sem diluir” (na verdade é 1:2) refletindo SR+VR, 1:5, 1:10 e 1:20, como segue:

Aplica-se à fileira SD (A1 a A6) com ponteira com barreira, 100 µL da suspensão viral na diluição 1:1000\*.

Após homogeneização com micropipeta multicanal com ponteira com barreira passar 60 µL da fileira SD para a fileira 1:5 (B1 a B6).

Após homogeneização com micropipeta multicanal com ponteira com barreira passar 150 µL da fileira 1:5 para a fileira 1:10 (C1 a C6).

Após homogeneização com micropipeta multicanal com ponteira com barreira passar 150 µL da fileira 1:10 para a fileira 1:20 (D1 a D6).

Envolver em parafilm as microplacas amostras e titulação e incubar por 1 hora a 37°C.

Durante a incubação, numerar as microplacas de seis poços de cultura VERO de acordo as amostras e diluições e colocar novamente na estufa a 37°C com 5% CO<sup>2</sup>

### A primeira solução de *overlay*

Ainda durante a incubação preparar a primeira solução de *overlay*. Primeiro precisa-se calcular o volume que será utilizado. Para cada poço das microplacas de seis poços, utiliza-se 3 mL da primeira solução de *overlay*.

Neste exemplo, temos 16 amostras e utilizaremos duas microplacas de seis poços para cada amostra (duplicatas para cada diluição). Logo serão utilizadas 32 microplacas de seis poços para as amostras. Além disso, utilizaremos uma microplaca para cada diluição SD, 1:5, 1:10 e 1:20 a ser utilizado como controle da diluição viral a ser utilizada no ensaio (4 microplacas) e também mais uma microplaca que será utilizada para o controle celular (2 poços), controle positivo (2 poços), controle viral que é o mesmo que SD (2 poços).

Desta forma, ao final serão utilizadas  $32 + 4 + 1 = 37$  microplacas de seis poços. Logo,  $37 \times 6 \times 3 = 666$  mL. Entretanto pela viscosidade sempre se perde volume na preparação e por isso é altamente recomendável preparar aproximadamente 100 mL a mais do necessário. Portanto 800 mL serão preparados.

## Anexo N (Continuação)

Para cada 100 mL da primeira solução de *overlay* utiliza-se:

- NaCHO<sub>3</sub> 3 mL
- Pen/Estrepto 100X 1 mL
- L-Glutamina 1 mL
- Anfotericina B 1000X 100 µL
- Gentamicina 1000X 100 µL
- 2X Ye-lah\* q.s. to 50 mL
- 1% agarose deionizada) 50 mL (0,5g de agarose, 50 mL de água)

De acordo com o exemplo precisamos de 800 mL, logo:

- NaCHO<sub>3</sub> 24 mL
- Penicilina/Estrepto 100X 8 mL
- L-Glutamina 8 mL
- Anfotericina B 1000X 800 µL
- Gentamicina 1000X 800 µL
- 2X Ye-lah\* q.s. to 400 mL
- 1% agarose deionizada) 400 mL (4g de agarose, 400 mL de água)

Para a preparação da primeira solução de *overlay*, primeiro se prepara a agarose:

Em um Becker que caiba dentro de um micro-ondas, adiciona-se 4g de agarose em pó e depois 400 mL de água deionizada. A agarose deve ser aquecida em micro-ondas até ficar uma solução límpida totalmente dissolvida, assim como se utiliza em

## Anexo N (Continuação)

preparação de gel de eletroforese. O tempo de aquecimento varia de acordo com o volume e o tipo de micro-ondas.

\*Os componentes do meio 2X Ye-lah estão descritos no Anexo (P).

Preparada a agarose, manter o Becker tampado evitando contaminação e em Banho-maria a 43°C. Para facilitar todo o processo, se possível manter um Banho-Maria dentro do fluxo.

*Recomenda-se preparar e manter em Banho-Maria a agarose logo no início da primeira incubação. A agarose preparada há apenas alguns minutos antes de sua utilização poderia estar muito quente e queimar a monocamada celular.*

Prepara-se agora o restante da solução:

Em uma proveta adicionar todos os reagentes deixando por último a adição do meio 2X Ye-lah até atingir o volume final que neste exemplo é de 400 mL.

Transfere-se todo o volume para outro frasco a ser também mantido no mesmo Banho-Maria da agarose. Não se deve a solução de agarose e o restante da solução neste momento porque muitas vezes como o restante da solução está bem mais frio do que a agarose que acabou de ser preparada em Micro-ondas, a mistura dos dois poderia solidificar a agarose impedindo o seu uso. A solução deverá estar líquida para ser utilizada.

Se possível, manter o nível de água do Banho-Maria suficiente para cobrir o nível tanto da agarose como do restante da solução.

Restando 10 minutos para o final da primeira incubação, trazer todas as microplacas de seis poços já rotuladas que estão na estufa para dentro do fluxo.

Levar um descarte em forma de caixa retangular forrado com uma ou duas folhas de papel toalha para dentro do fluxo, para descarte do meio de manutenção das placas.

Ao fim da incubação de 1 h a 37°C com 5% CO<sup>2</sup>, 100 µL das amostras diluídas e incubadas com a suspensão viral diluída assim como a titulação da diluição viral que está sendo utilizada para o ensaio serão inoculados nos respectivos poços das microplacas de seis poços.

Ao final da incubação trazer as microplacas de 96 poços que estavam incubadas na estufa para dentro do fluxo

Descarta-se o meio de cultura dos poços da primeira microplaca de seis poços a ser inoculada, apenas vertendo a microplaca e derramando o meio em um descarte sobre a caixa retangular forrada com papel toalha que é usado para impedir respingos.



## Anexo N (Continuação)

Deixa-se a microplaca aberta e inicia-se a inoculação da diluição 1:10 para 1:320 utilizando-se a mesma ponteira com barreira para cada amostra. Assim, com a mesma ponteira aplica-se 100 µL da diluição 1:10 em dois poços, com a mesma ponteira aplica-se 100 µL da diluição 1:20 em dois poços e assim sucessivamente. Descarta-se a ponteira.

Após inoculação fechar a microplaca mantendo-a no fluxo. Inicia-se o descarte de meio da segunda microplaca e assim sucessivamente.

Quando dez microplacas já foram inoculadas e estão empilhadas no fluxo, levá-las para a estufa a 37°C com 5% de CO<sup>2</sup> onde serão incubadas por 1 h. Esta caracteriza a segunda incubação!

*ATENÇÃO! O processo de inoculação deverá ser feito o mais rápido possível e o horário do início da incubação de cada pilha de 10 microplacas deverá ser anotado para que cada pilha tenha sido incubada por 1h.*

Durante a incubação as pilhas de 10 placas inoculadas deverão ser levemente movimentadas a cada 15 a 20 minutos de modo a facilitar a adsorção viral e também manter úmida a monocamada celular.

Faltando 20 minutos para o fim da segunda incubação, adicionar o restante da primeira solução de *overlay*, que estava em um frasco separado, ao frasco com agarose.

Ao final de 1h da segunda incubação, trazer a pilha de microplacas para o fluxo e iniciar no fluxo a aplicação da primeira solução de *overlay*.

*ATENÇÃO! Lembrar que se deve iniciar a aplicação do overlay pelas primeiras microplacas inoculadas que estão naturalmente estarão embaixo na pilha.*

Usando uma pipeta sorológica aplicar pelo canto do poço, 3 mL da solução de *overlay* na mesma ordem em que os poços foram inoculados.

Após aplicação da solução de *overlay* deixar as microplacas por 20 minutos no fluxo para permitir a solidificação. Levar as microplacas para o fluxo para a terceira incubação.

Agora estas microplacas ficarão incubadas se possível sem qualquer movimentação até a formação de placas.

### Segunda solução de *overlay*

O dia da aplicação da segunda solução de *overlay* varia de acordo com o vírus que está sendo utilizado e basicamente tem como princípio fornecer mais nutrientes para

## Anexo N (Continuação)

a cultura celular e corar as células vivas permitindo a detecção de placas, que por serem áreas de morte celular não estarão coradas.

*ATENÇÃO! O corante utilizado na segunda solução de overlay é uma solução tóxica para as células prejudicando o metabolismo celular e por isso o segundo overlay deverá ser feito apenas na véspera ou a poucos dias da leitura final do resultado.*

Para WNV, por exemplo, pode-se aplicar a segunda solução de *overlay* no 3º dia pós-infecção para realização da leitura no 4º dia. O ideal é aplicar a segunda solução de *overlay* um pouco antes do ápice do ECP.

A preparação da segunda solução de *overlay* é praticamente a mesma da primeira solução de *overlay* com exceção para a inclusão do corante vermelho neutro

*ATENÇÃO! O modo de preparação da segunda solução de overlay deve ser feito exatamente como feito para a preparação da primeira solução de overlay! Isso significa preparar a solução aproximadamente 1h antes de sua aplicação e deixando a mistura da solução final para uns 20 minutos antes do início da aplicação.*

A segunda solução de *overlay* deve ser preparada como segue:

Para cada 100 mL da segunda solução de *overlay* utiliza-se:

- NaCHO<sub>3</sub> 3 mL
- Vermelho Neutro 2 mL
- Pen/Estreptomicina 100X 1 mL
- L-Glutamine 1 mL
- Anfotericina B 1000X 100 µL
- Gentamicina 1000X 100 µL
- 2X Ye-lah q.s. to 50 mL
- 1% agarose deionizada) 50 mL (0,5g de agarose, 50 mL de água

## Anexo N (Continuação)

Usando uma pipeta sorológica aplicar pelo canto do poço, 3 mL da segunda solução de *overlay*.

Após aplicação da solução de *overlay* deixar as microplacas por 20 minutos no fluxo e então levar as microplacas para o fluxo para a quarta e última incubação.

No dia seguinte, realizar a contagem de placas em uma sala escura com uma fonte luminosa. Marcar as placas pelo lado de baixo da microplaca com um marcador escuro. Melhor visualização é feita pelo fundo da microplaca, isto é com o lado de baixo da microplaca voltado para o pesquisador.

Iniciar a leitura pela microplaca titulação, anotando o número de placas em cada poço.

Fazer a média do número de placas das duplicatas de CV, CC e  $\alpha$ .

Fazer a média do número de placas dos seis poços de SD, 1:5, 1:10 e 1:20. SD é a mais importante microplaca porque a média do número de placas desta microplaca é o que foi utilizado em todas as amostras e por isso será utilizado como referência. A média do número de placas de 1:5, 1:10 e 1:20 são importantes quando o ensaio apresenta um número muito grande de placas que impede a contagem em SD. Neste caso, se utiliza estas diluições para saber o número real de placas no ensaio.

Por exemplo, suponhamos que neste ensaio havia tantas placas, que ao se tocarem ficou impossível contar quantas havia nos poços de SD. Pelo número menor de placas isso provavelmente não vai acontecer nas diluições seguintes. Então fazemos a média de placas de 1:5, por exemplo, e ao multiplicar por 5 estimamos quantas placas haviam em SD.

Suponhamos que em uma PRNT<sub>90</sub>, a média do número de placas da diluição SD foi de 50UFP. Amostras positivas apresentarão uma média de cinco ou menos placas e as amostras negativas apresentarão uma média de seis ou mais placas.

Caso a média de placas não seja um número inteiro, arredondam-se os valores. Por exemplo, em uma média de 56 placas em SD, as amostras positivas serão aquelas em que há 5,6 ou menos placas. Como não se conta fração de placa podemos arredondar os 10% para seis placas. Se o mesmo acontecer com 5,4 arredonda-se para 5.

Alex Pauvolid-Correa

## Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal

Alex Pauvolid-Corrêa<sup>1</sup>†, Maria Alejandra Morales<sup>2</sup>, Silvana Levis<sup>2</sup>, Luis Tadeu Moraes Figueiredo<sup>4</sup>,  
Dinair Couto-Lima<sup>1</sup>, Zilca Campos<sup>3</sup>, Marcia Furlan Nogueira<sup>3</sup>, Edson Elias da Silva<sup>5</sup>,  
Rita Maria Ribeiro Nogueira<sup>1</sup>, Hermann Gonçalves Schatzmayr<sup>1</sup>†

<sup>1</sup>Laboratório de Flavivírus <sup>2</sup>Laboratório de Enterovírus, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Ministério da Saúde, Avenida Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil <sup>3</sup>Laboratório de Arbovirus, Instituto Nacional de Enfermidades Virales Humanas Dr Julio I Maiztegui, Pergamino, BsAs, Argentina <sup>4</sup>Embrapa Pantanal, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Corumbá, MS, Brasil <sup>5</sup>Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

*Despite evidence of West Nile virus (WNV) activity in Colombia, Venezuela and Argentina, this virus has not been reported in most South American countries. In February 2009, we commenced an investigation for WNV in mosquitoes, horses and caimans from the Pantanal, Central-West Brazil. The sera of 168 horses and 30 caimans were initially tested using a flaviviruses-specific epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay (blocking ELISA) for the detection of flavivirus-reactive antibodies. The seropositive samples were further tested using a plaque-reduction neutralisation test (PRNT<sub>50</sub>) for WNV and its most closely-related flaviviruses that circulate in Brazil to confirm the detection of specific virus-neutralising antibodies. Of the 93 (55.4%) blocking ELISA-seropositive horse serum samples, five (3%) were seropositive for WNV, nine (5.4%) were seropositive for St. Louis encephalitis virus, 18 (10.7%) were seropositive for Ilheus virus, three (1.8%) were seropositive for Cacipacore virus and none were seropositive for Rocio virus using PRNT<sub>50</sub> with a criteria of  $\geq$  four-fold antibody titre difference. All caimans were negative for flaviviruses-specific antibodies using the blocking ELISA. No virus genome was detected from caiman blood or mosquito samples. The present study is the first report of confirmed serological evidence of WNV activity in Brazil.*

Key words: West Nile virus - Pantanal - neutralisation - equines - caimans - Brazil

In 1937, an unknown neurotropic virus called West Nile virus (WNV) was isolated from the blood of a low-grade febrile woman from northeastern Uganda (Smithburn et al. 1940). Afterwards, WNV was detected in Africa, the Middle East, Asia and Europe and was associated mainly with sporadic or size-limited outbreaks of WNV fever, which was usually a self-limited and uncomplicated febrile syndrome (Coutissinier-Paris 2006). However, in the mid-1990s, a major WNV fever epidemic in Europe with a high rate of neurological infections occurred in the lower Danube valley and Bucharest areas in Romania (Tsai et al. 1998). Concomitantly, human and animal outbreaks of WNV fever with neurological disorders were reported in the old world, which warned of the change of WNV fever impact on animal and public health (Tber Abdelhaq 1996, Platonov et al. 2001). In 1999, WNV definitively reemerged as a worldwide major

public health and veterinarian concern when it was detected in the Western Hemisphere for the first time as the cause of human and equine encephalitis outbreaks concomitant with extensive mortality in birds in the northeastern United States of America (USA) (CDC 1999). The virus rapidly spread through North America and towards Latin America (Komar & Clark 2006). There have been recent reports of serological evidence of WNV activity in Colombia (Mattar et al. 2005), Venezuela (Bosch et al. 2007) and especially Argentina, where anti-WNV antibodies have been detected in birds (Diaz et al. 2008) and the virus was isolated for the first time in South America from the brains of horses that had died of encephalitis (Morales et al. 2006). However, most South American countries, including the largest, Brazil, remain without reports of WNV infection. Alerted by the periodical outbreaks of WNV encephalitis in the USA (Lindsey et al. 2010) and the serological evidence of WNV activity in South America, we performed this study.

The Brazilian Pantanal was selected as a suitable place for the study of WNV circulation because of the following factors: (i) natural foci of WNV infections have been mostly described in wetland ecosystems, such as deltas and flood plains, as reported in France (Joubert et al. 1970), Venezuela (Bosch et al. 2007), Romania (Tsai et al. 1998) and Italy (Autorino et al. 2002), (ii) the local movement of migratory birds (Nunes & Tomas 2008), (iii) the unsuccessful efforts of the detection of WNV-specific antibodies in the free-ranging birds in Brazilian coastal areas (MS 2003, 2004), (iv) the recent detec-

Financial support: CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ

† *In memoriam*

APC is a recipient of the scholarship of CNPq in the Doctor of Tropical Medicine Program at Fiocruz. This work is part of APC's PhD Thesis at the Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, presented in part at the XXI National Meeting of Virology, Gramado, RS, Brazil, October 17-20th, 2010.

+ Corresponding author: pauvolid@ioc.fiocruz.br

Received 16 December 2010

Accepted 11 May 2011

## Anexo O (Continuação)

468 Antibodies to West Nile virus, Brazil • Alex Pauvolid-Corrêa et al.

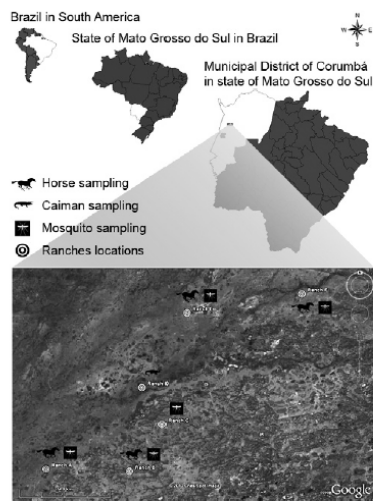
tion of arbovirus vectors blood-feeding on human and equine hosts in the area (Pauvolid-Corrêa et al. 2010a) and, finally, (v) the serological evidence of arbovirus activity in the area (Iversson et al. 1993), which includes St. Louis encephalitis virus (SLEV) (Pauvolid-Corrêa et al. 2010b), a species that is antigenically related to WNV (Smithburn 1942). In view of these data, the hypothesis that the Brazilian Pantanal is one of the most susceptible areas to WNV circulation in Brazil (Pauvolid-Corrêa & Varella 2008) seemed promising.

The Pantanal is a tropical, seasonal wetland of approximately 140,000 km<sup>2</sup> that is fed by tributaries of the upper Paraguay River in the centre of South America, which covers mainly Brazilian but also Paraguayan and Bolivian territories and is classified as one of the largest freshwater wetland ecosystems in the world (Alho 2005). The Brazilian Pantanal, which represents 85% of the total Pantanal area, is located within the states of Mato Grosso do Sul and Mato Grosso in Central-West Brazil, which are recognised as South and North Pantanal, respectively (Alho et al. 1988). This region is ecologically classified into sub-regions according to vegetation, flooding and physiography (Silva & Abdon 1988). The Nhecolândia sub-region that is situated in South Pantanal is one of the largest, comprising approximately one fifth of the total area, and is characterised by hundreds of shallow lakes that display varying degrees of salinity and coalescence with the system during floods (Adámoli 1982).

Recent studies have demonstrated that some crocodilian species may be infected by WNV (Steinman et al. 2003, Jacobson et al. 2005) and that *Alligator mississippiensis* may also have a viremic load that affords the infection of blood-feeding Culicidae vectors, which suggests that in areas with high population densities of these alligators, juvenile individuals could play an important role in WNV transmission (Klenk et al. 2004). Taking these data into account, the unsuccessful efforts to detect WNV circulation in the avian hosts in Brazil and the widespread, high prevalence of the Crocodylia species, *Caiman crocodilus yacare*, in the Brazilian Pantanal (Campos et al. 2005), our strategy was to investigate the WNV circulation in the potential vectors, dead-end hosts and natural secondary amplifying hosts through the collection and testing of mosquitoes and serum samples of horses and wild caimans from the Nhecolândia sub-region. No morbidity was observed during the sampling period and only apparently healthy horses and caimans were sampled in the present study.

### MATERIALS AND METHODS

**Study area** - In February 2009, mosquitoes and blood samples from horses and wild caimans were collected in six different cattle ranches of the Nhecolândia sub-region (18°20' 19°40'S and 57°14' 55°00'W) during the rainy season. Considering the free circulation of mosquitoes, horses and wild caimans in large ranches, sample collections for the study were undertaken in a 700-square-kilometre (70,000 ha) area (Figure). The collections for this study were authorised by the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources (license IBAMA 18363-1/2009).



Sampling locations of West Nile virus investigation conducted in the Pantanal, Brazil.

**Samples collections** - Adult mosquitoes were captured at sites that were randomly selected using CDC automatic light traps and manual aspirators while landing to blood-feed on horses and research team members as routinely reported. Living mosquito specimens were transported to a field laboratory where they were immobilised by chilling and the species were identified through direct observation of the morphological characteristics according to the taxonomic keys (Lane 1953, Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). The mosquitoes were grouped into pools of up to 50 individuals that were sorted with respect to trap, site of capture and species and they were then stored in liquid nitrogen in the field.

Caimans were captured from sites where a high concentration of these animals was observed. The animals were seized by boat in lentic systems that were formed by intermittent rivers and taken to the banks. All animals were weighed, measured, gendered, numbered and bled before release. The whole procedure was performed only with physical restraint and each animal was worked and released within 15 min. Caiman blood samples were obtained by puncture of the internal jugular vein between the 1st and 2nd cervical vertebrae as described previously (Olson et al. 1975).

Blood samples were taken from horses of different ages from different ranches. Concomitantly, an interview was conducted with the rural workers of the ranches that were visited who were asked if they had seen horses with any abnormality, such as clinical signs that involved the central or peripheral nervous system. We also collected information about the sex, age and breed of the horses that were present. Additional information included whether the horse had recently received vaccine or medical treatment and whether any horse had been moved into or out of South Pantanal.



## Anexo O (Continuação)

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(4), June 2011 469

*Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay (blocking ELISA)* - Caiman and horse sera were first screened for flaviviruses-reactive antibodies using a blocking ELISA as described previously (Blitvich et al. 2003a, c). Briefly, the ability of the sera to block the binding of the monoclonal antibody 6B6C-1 to the WNV antigen was compared to the blocking ability of negative control horse serum. The monoclonal antibody 6B6C-1 is appropriate to screen for any flavivirus-reactive antibody. Data are expressed as relative percentages. Samples were considered seropositive when the inhibition values produced were  $\geq 35\%$ .

*Plaque-reduction neutralisation test (PRNT)* - The seropositive sera of the blocking ELISA was sequentially heat-inactivated and submitted to a PRNT<sub>90</sub> as described previously (Russell et al. 1967). Briefly, two-fold dilutions that ranged from 1:10-1:320 of each blocking ELISA seropositive sample were tested for their ability to neutralise plaque formation by the chimeras SLEV and WNV that were derived from highly attenuated Yellow fever virus that contain the premembrane-envelope (prM-E) and prM-E and envelope protein genes, respectively (Arroyo et al. 2001, Pugachev et al. 2004, Komar et al. 2009), and Cacipacore virus (CPCV), Ilheus virus (ILHV) and Rocio virus (ROCV), which are the Brazilian flaviviruses that are phylogenetically related to WNV (Kuno et al. 1998). Serum was considered seropositive to a virus species when it reduced at least 90% of the formation of plaques of this virus at  $\geq 1:40$  dilutions and its neutralising antibody titre was  $\geq$  four-fold greater than what was observed for the other tested flaviviruses. The WNV seropositive samples were also submitted to PRNT<sub>90</sub> for Bussuquara virus (BSQV).

*Virus isolation* - The caiman sera and mosquito samples were assayed for virus isolation. The caiman serum samples at 1:5 dilutions were inoculated into VERO cell culture flasks (Stim 1969). The macerated mosquito pool suspensions were inoculated into C6/36 cell culture flasks (White 1987). The incubated cell flasks were observed during 14 days to look for any evidence of viral cytopathic effect (CPE).

*Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)* - The molecular approach was performed in all caiman serum samples and the mosquito samples in which the inoculated flasks showed CPE in virus isolation. These samples were submitted to RNA extraction using a commercial kit (QIAamp® Viral RNA Mini Kit QIAGEN, USA) in accordance with the manufacturer's instructions and was followed by a generic nested RT-PCR, which sequenced for the detection and identification of arbovirus members of the *Flavivirus* and *Alphavirus* genus, as described previously (Sánchez-Seco et al. 2001, 2005).

### RESULTS

Serum samples of 168 horses from four of the six studied cattle ranches were sampled. Most of these equines were adult, tame, healthy thoroughbreds of the Cavalo Pantaneiro breed. All 168 horse sera were first tested using the blocking ELISA and 93 (55.4%) were se-

ropositive. When this subset of 93 seropositive samples was tested using PRNT<sub>90</sub>, five (3%) were seropositive for WNV, nine (5.4%) were seropositive for SLEV, 18 (10.7%) were seropositive for ILHV, three (1.8%) were seropositive for CPCV, but none were seropositive for ROCV, using the criteria of a  $\geq$  four-fold antibody titre difference among the five flaviviruses that were assayed. All of the WNV-seropositive samples were  $< 1:10$  for BSQV (Table). From the remaining 58 (34.5%) blocking ELISA seropositive samples, 56 (33.3%) samples were considered seropositive for an undetermined flavivirus using the  $< 4$ -fold antibody titre difference and two (1.2%) were considered seronegative with titres  $< 1:10$  for all of the flaviviruses that were assayed by PRNT<sub>90</sub>.

From the five horses that were seropositive for WNV, two horses had dates of birth available and were four and five years old at the time of blood collection. All five seropositive animals had no history of journey outside South Pantanal or WNV vaccination. All WNV-seropositive samples were retested for confirmation and the antibody serum titres were 1:80 (n = 1), 1:160 (n = 2) and  $\geq 1:320$  (n = 2). The sera of these two horses with antibody serum titres  $\geq 1:320$  were retested with higher dilutions and an antibody serum titre of 1:320 was confirmed. These five WNV-seropositive horses came from three out of the four ranches where horses were sampled.

Concerning SLEV of the nine seropositive horses from the four ranches sampled, six had dates of birth available with ages that ranged from four-11 years old. All of the SLEV-seropositive horses had never left South Pantanal and their antibody serum titres ranged from 1:40- $\geq 1:320$ .

Of 18 ILHV-seropositive horses, 12 had available dates of birth with ages that ranged from three-13 years old in animals from all of the ranches where horses were sampled. None of these animals had a history of travel and their antibody serum titres ranged from 1:40- $\geq 1:320$ .

From the three horses that were seropositive for CPCV, two had available dates of birth and were 12 years old at the time of blood collection. These two animals were from the same ranch, had never left the region and had antibody serum titres for CPCV of 1:160. Most of the blocking ELISA-seropositive samples had antibody titres  $< 1:10$  for ROCV. Of the samples with antibody titres  $\geq 1:10$  for ROCV, only one had a titre  $\geq 1:40$ . Because the antibody titre difference for the other flaviviruses assayed was less than four-fold, it was considered seropositive for an undetermined flavivirus. Of the 93 blocking ELISA-seropositive horses, 56 (60.2%) with titre differences less than four-fold were considered seropositive for an undetermined flavivirus. The two blocking ELISA-seropositive samples that had serum titres  $< 1:10$  for all five flaviviruses assayed were considered as seronegative in the present study.

Thirty caiman specimens up to 1.5 m in length were captured from two distinct sites of the same ranch. The sera from the 30 caimans displayed negative results to virus isolation, RT-PCR and blocking ELISA and were subsequently not submitted to PRNT<sub>90</sub> methods.

A total of 1,204 mosquitoes from 10 species were captured at 19 sites that were randomly selected on five ranches. Specimens of the following species were captured:

## Anexo O (Continuação)

470 Antibodies to West Nile virus, Brazil • Alex Pauvolid-Corrêa et al.

*Ochlerotatus scapularis*, *Psorophora albigena*, *Sabethes albiprivus*, *Culex declarator*, *Culex quinquefasciatus*, *Mansonia titillans*, *Anopheles albitarsis s.l.*, *Psorophora ferox*, *Anopheles triannulatus s.l.* and *Psorophora ciliata*. The mosquitoes were grouped into 65 pools of up to 50 individuals that were sorted with respect to trap, site of capture and species. Of a total of the 65 mosquito pools

that were assayed, one (1.5%) pool with 22 specimens of *O. scapularis* exhibited CPE four days post-infection (dpi). The same CPE was observed on subsequent passages by inoculation into new C6/36 cell culture flasks four dpi. Nevertheless, despite the CPE, the pool and the supernatant from the sequential passages was negative to flaviviruses and alphaviruses as measured by RT-PCR.

TABLE  
Plaque-reduction neutralisation test antibody titres for SLEV, ILHV, WNV, ROCV, CPCV and BSQV in epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay-reactive horses which were seropositive for a determined species considering the four-fold titre difference criteria

ID	Ranch	Age	Sex	Tame	Travel	SLEV <sup>a</sup>	ILHV	WNV <sup>a</sup>	ROCV	CPCV	BSQV	Interpretation
136	B	12	F	T	N	1:20	1:80	< 1:10	1:20	1:20	-	ILHV
140	B	8	F	T	N	1:20	≥ 1:160	< 1:10	< 1:10	1:10	-	ILHV
145	B	11	F	T	N	1:40	≥ 1:320	1:10	1:10	1:80	-	ILHV
158	B	6	F	T	N	1:80	1:10	1:20	< 1:10	1:20	-	SLEV
160	B	12	F	T	N	< 1:10	> 1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
162	B	3	F	T	N	< 1:10	> 1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
174	B	4	F	U	N	1:40	< 1:20	< 1:10	< 1:10	1:10	-	SLEV
182	B	4	F	U	N	1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	SLEV
183	B	4	F	U	N	1:10	1:40	< 1:10	< 1:10	1:10	-	ILHV
190	A	13	G	T	N	1:40	≥ 1:160	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
194	A	12	G	T	N	1:20	< 1:40	1:20	1:20	1:160	-	CPCV
197	A	13	G	T	N	< 1:10	> 1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
199	A	12	G	T	N	< 1:10	> 1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
203	A	12	G	T	N	1:20	< 1:40	< 1:10	1:20	1:160	-	CPCV
207	A	13	G	T	N	< 1:10	1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
208	A	8	G	T	N	1:160	1:40	1:20	1:10	1:40	-	SLEV
211	A	11	G	T	N	≥ 1:320	< 1:40	1:10	< 1:10	1:10	-	SLEV
214	A	5	G	T	N	1:20	< 1:40	1:320	< 1:10	< 1:20	< 1:10	WNV
216	A	7	G	T	N	1:20	≥ 1:320	1:80	1:20	1:80	-	ILHV
220	A	5	G	T	N	1:160	< 1:40	1:10	< 1:10	< 1:10	-	SLEV
241	A	4	G	U	N	< 1:10	≥ 1:80	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
250	A	4	G	U	N	< 1:10	< 1:40	1:160	< 1:10	< 1:20	< 1:10	WNV
253	F	UNK	G	T	N	< 1:10	> 1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
268	F	UNK	G	T	N	1:80	< 1:10	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	SLEV
269	F	UNK	G	T	N	1:80	< 1:40	1:20	< 1:10	1:20	-	SLEV
270	F	UNK	F	T	N	< 1:10	1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
271	F	UNK	S	U	N	1:10	≥ 1:160	1:20	< 1:10	1:40	-	ILHV
280	F	UNK	F	U	N	1:20	< 1:10	1:80	< 1:10	< 1:20	< 1:10	WNV
283	E	UNK	G	T	N	< 1:10	1:40	< 1:10	< 1:10	< 1:20	-	ILHV
285	E	UNK	G	T	N	< 1:10	< 1:40	1:160	< 1:10	1:20	< 1:10	WNV
290	E	UNK	G	T	N	< 1:10	1:80	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV
303	E	UNK	G	T	N	< 1:10	1:10	< 1:10	< 1:10	1:40	-	CPCV
305	E	UNK	G	T	N	≥ 1:320	< 1:40	1:20	1:10	< 1:10	-	SLEV
306	E	UNK	G	T	N	1:10	< 1:40	1:320	< 1:10	1:80	< 1:10	WNV
309	E	UNK	G	T	N	1:10	1:80	< 1:10	< 1:10	< 1:10	-	ILHV

a: chimera; BSQV: Bussuquara virus; CPCV: Cacipacore virus; F: female; G: gelding; ID: identification of animal; ILHV: Ilheus virus; N: no travel outside South Pantanal; ROCV: Rocio virus; S: stallion; SLEV: Saint Louis encephalitis virus; T: tamed; U: untamed; UNK: unknown; WNV: West Nile virus; -: non-submitted.

## Anexo O (Continuação)

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(4), June 2011 471

### DISCUSSION

Flaviviruses serological test result interpretation is sometimes complex and requires careful evaluation (Komar 2001), especially where data from areas of intense flaviviruses co-circulation is expected, such as for South American countries. Considering the complex cross-reactivity of flaviviruses, several studies have adopted ELISA as a screening method followed by more virus-specific serological tests, such as PRNT methods (Blitvich et al. 2003b, Morales-Betoulle et al. 2006, Diaz et al. 2008). In the present study, the use of blocking ELISA as a screening method followed by PRNT<sub>90</sub> for the most related sylvatic Brazilian flaviviruses allowed for the detection of specific neutralising antibodies to WNV in 3% of the horses tested from the Pantanal region for the first time in Brazil.

Based on the results that were obtained with the blocking ELISA, 93 horse sera presented antibodies to flaviviruses. When the same sera were tested using PRNT<sub>90</sub> for SLEV, WNV, ILHV, ROCV and CPCV, except for two samples, none had a serum titre < 1:10 for all of the flaviviruses that were tested, which disclosed the high specificity of the blocking ELISA method. According to our data, in conjunction with the fact that blocking ELISA does not require the use of multiple capture antibodies, which designated this test as useful for virtually any vertebrate species, the present study corroborated the application of blocking ELISA as an efficient screening method for flaviviruses serosurveys.

We have searched for the circulation of WNV in a country with an intense circulation of other flaviviruses. Therefore, to avoid misinterpretation based on serum cross-reactions it was necessary to employ a maximum specificity PRNT and only consider seropositive samples that promote a ≥ 90% reduction in the number of WNV plaques as has been described previously in South and Central American serosurveys (Quirin et al. 2004, Mattar et al. 2005). Besides SLEV, ROCV, ILHV and CPCV, other Brazilian sylvatic flaviviruses that are related to WNV include the BSQV and Iguape virus (IGUV) (Kuno et al. 1998). Despite the geographic dispersal of BSQV, which is mainly located in the Caribbean and Central America (Gubler et al. 2007), the WNV seropositive samples were also submitted to PRNT<sub>90</sub> for BSQV to minimise potential high-titered cross reaction antibodies. However, considering that IGUV was only isolated from sentinel mice in the Southeastern Brazil (Coimbra et al. 1993) and that serosurveys suggest infrequent occurrence of overt infection, in the present study IGUV was not included in the PRNT methods.

To minimise the cross-reaction results in this serosurvey to WNV, we considered the seropositivity for WNV and for each of the other flaviviruses assayed, only sera with a 1:40 monotypic reaction or with an antibody titre higher than 1:40 and a four-fold higher to a species than its other related flaviviruses that were assayed. However, considering these criteria, 56 (60.2%) of the 93 blocking ELISA-seropositive samples were seropositive for an undetermined flavivirus species. The high prevalence of these inconclusive results may be attributed to the cross-reacting antibodies that are usually observed among species of a Japanese encephalitis virus group (JEVG)

(Tarr & Hammon 1974) and to the original antigenic sin phenomenon, where some individuals that are sequentially infected by a heterologous flavivirus species can boost antibody levels against the original virus, which produces heterologous cross-reacting antibodies (Inouye et al. 1984). Considering the similar maintenance cycles of the flaviviruses that were assayed together with the hypothesis of its co-circulation in the South Pantanal, the original antigenic sin phenomenon may have had an effect on the difference of antibody titres among the flaviviruses that were assayed and some sequential infections by a heterologous flavivirus species may not have been detected. Of the 56 horses that were seropositive for an undetermined flavivirus species, 13 (23.2%) had antibody titres ≥ 1:40 for WNV, nine (69.2%) of which had antibody titres ≥ 1:80. Therefore, it is possible that the other 13 (7.7%) of the 168 horses that were tested had contact with WNV. It is noteworthy that neutralising antibody titres are frequently more than two-fold lower in PRNT with chimeras WNV and SLEV than with wild virus (Pugachev et al. 2004, Komar et al. 2009). Therefore, it is also quite possible that some low titre WNV and SLEV-seropositive samples were not detected.

The detection of specific neutralising antibodies to WNV in 3% of horses tested in the Pantanal region from Brazil was reported in this study. This prevalence is similar to the values previously reported for horses from other countries of Central and South America, such as Venezuela, where a prevalence of 4.3% was described (Bosch et al. 2007); Colombia, with a prevalence of 9% (Mattar et al. 2005), and El Salvador, with the highest seropositivity to WNV of 13.7% (Cruz et al. 2005). Despite the adoption of the same criteria for the detection of WNV-seropositive animals, it is important to note the difference of the flaviviruses that were used in the PRNT methods that were performed in different areas.

The CPCV, which is a Brazilian virus of JEVG, is as phylogenetically related to WNV as SLEV and is even more closely related to WNV than ILHV, BSQV or ROCV, which belong to other flavivirus serocomplexes (Kuno et al. 1998). Although CPCV is a non-pathogenic arbovirus to date, we detected many samples with neutralising antibodies for both CPCV and WNV, which suggest that in future serosurveys for WNV and other sylvatic flaviviruses to be conducted in Brazil, the investigation for CPCV should be included as a differential diagnosis.

The highest seropositivity for ILHV was expected because the circulation of ILHV in South Pantanal horses was reported in the 1990s (Iversson et al. 1993). Although ROCV, which is an indigenous Brazilian flavivirus species, was the causative agent of an extensive encephalitis epidemic in Southeastern Brazil in the 1970s (Tiriba et al. 1976), the detection of neutralizing antibodies for ROCV nowadays is unusual. Our findings corroborate this data because except for one sample, all blocking ELISA-seropositive horses had PRNT antibody titres < 1:40 for ROCV. One should be aware that, although phylogenetically related to ILHV (Medeiros et al. 2007) that presented the highest prevalence in our study, none of the horses tested were seropositive for ROCV, which demonstrates the high-quality specificity of the PRNT assay.



## Anexo O (Continuação)

472 Antibodies to West Nile virus, Brazil • Alex Pauvolid-Corrêa et al.

Based on our serological data, we reported indirect evidence that argues for the silent activity of WNV in the Brazilian Pantanal. Considering this hypothesis and taking into account the age available for the seropositive animals of four and five years old, we can infer that at least during the period from 2005-2009, WNV circulated in the area. The detection of SLEV-seropositive four-year-old horses suggested that some were infected by SLEV between 2005-2009, which corroborates the recent report of the detection of neutralising antibodies to SLEV in horses sampled in 2007 in the same area of the present study (Pauvolid-Corrêa et al. 2010b). For CPCV, the two seropositive horses with available dates of birth were 12 years old; therefore, the period of probable circulation was difficult to determine. The circulation of ILHV in South Pantanal was described in the 1990s (Iversson et al. 1993) and this putative circulation has remained. However, according to the age of our 18 ILHV-seropositive animals, we can only deduce that between 2006-2009, ILHV circulated in the area. Although a better estimation of recent circulation of these flaviviruses for future surveillance should be based on IgM assays, our data suggested the viral activity after 2005 of at least three flaviviruses, including WNV, in the Brazilian Pantanal.

We encourage further more encompassing surveys for WNV in the South Pantanal and other bordering areas that especially focus on virus isolation to definitively confirm the circulation of WNV in the region, and consequently, identify vectors and vertebrate hosts that are involved in the virus local maintenance cycle and transmission. Despite of the serological evidence of horse infections by WNV in the Pantanal region presented here, morbidity was not observed, which suggests that WNV could be circulating through silent enzootic cycles in an area with pristine conditions. In fact, WNV has not been related to horse disease in most of the South American countries with the exception of Argentina (Morales et al. 2006). However, WNV is an important cause of encephalitis in horses in the USA and should be considered in the future in the differential diagnosis of neurological infections in horses from South Pantanal.

Despite of the small number of caimans that were sampled, the negative results obtained using virus isolation, RT-PCR and blocking ELISA suggested that the participation of caimans in flaviviruses cycles in South Pantanal is improbable. Nevertheless, the high prevalence of this crocodylian species in the Pantanal and the high concentration that was observed in some remaining collections of water during the dry season associated to the present data of serological evidence of the activity of members of JEVG in the area justify the need of further arbovirus investigations in local caimans.

All mosquito species identified in the present study were previously reported in the Nhecolândia sub-region (Pauvolid-Corrêa et al. 2010a). Moreover, the non-detection of *Flavivirus* and *Alphavirus* RNA in the *O. scapularis* pool that caused CPE in C6/36 cells implied a virus identity that was not related to WNV, SLEV or alphaviruses, which would have been indicated by the RT-PCR. Further investigations of the other arbovirus groups are currently in progress.

Finally, we have reinforced that the Brazilian Pantanal is an interesting scenario where sylvatic flaviviruses cycles are probably maintained in silent progression in a relatively balanced ecosystem. The recently increased environmental degradation of this sensitive, complex biome could lead to changes in the intricate ecological relationships that disturb natural enzootic arbovirus cycles, which potentially favours local arbovirus outbreaks.

### ACKNOWLEDGEMENTS

To the cordial people of the Pantanal, who have wisely managed to keep the Pantanal preserved through the centuries, especially the rural workers of the ranches sampled including Marcelo Santos, Francisco Rondon, Luis Fernando Santiago, Gilberto Silva, Marcelo Dias, José Mendes, Marcos Moraes, Luiz Graça, Luiz da Silva, Benis da Silva and Sebastião Gonzaga, to Henrique de Jesus, Augusto Silva, Cremilson Gonçalves, Murilo Maciel and Oziel da Silva, of Embrapa Pantanal to Victoria Luppo, Pablo Baroni, Lucas Bogdanic, Stella Fuster and Silvina Coenaga, of Instituto Nacional de Enfermidades Virales Humanas, to Vanessa Muller, of Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, and to Heitor Herrera, Fernando Tavares, Flávia dos Santos, Ana Bispo and Elba Lemos, of Fiocruz, for their contributions.

### REFERENCES

- Adámoli I 1982. *O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito "Complexo Pantanal"*. In Anais do 32º Congresso Nacional de Botânica, Teresina, p. 109-119.
- Alho CJR 2005. *The Pantanal*. In LH Fraser, PA Keddy, *The world's largest wetlands: ecology and conservation*, Cambridge University Press, New York, p. 203-271.
- Alho CJR, Lacher TE, Gonçalves HC 1988. *Environmental degradation in the Pantanal ecosystem*. *Bioscience* 38: 164-171.
- Arroyo J, Miller CA, Catalan J, Monath TP 2001. *Yellow fever virus live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development*. *Trends Mol Med* 7: 350-354.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT 2002. *West Nile virus epidemic in horses, Tuscany Region, Italy*. *Emerg Infect Dis* 8: 1372-1378.
- Blitvich BJ, Bowen RA, Marlenee NL, Hall RA, Bunning ML, Beaty BJ 2003a. *Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals*. *J Clin Microbiol* 41: 2676-2679.
- Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, Gonzalez-Rojas JJ, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ 2003b. *Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila state, Mexico*. *Emerg Infect Dis* 9: 853-856.
- Blitvich BJ, Marlenee NL, Hall RA, Calisher CH, Bowen RA, Roehrig JT, Komar N, Langevin SA, Beaty BJ 2003c. *Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species*. *J Clin Microbiol* 41: 1041-1047.
- Bosch I, Herrera F, Navarro J, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, Jones M, Fernández E, Pérez N, Pérez-Emán J, Guimarães AE, Barrera R, Valero N, Ruiz J, Velásquez G, Martínez J, Comach G, Komar N, Spielman A, Kramer L 2007. *West Nile virus, Venezuela*. *Emerg Infect Dis* 13: 651-653.
- Campos ZMS, Coutinho ME, Mourão G 2005. *Metodologia para contagem e avaliação de ninhos de jacaré-do-pantanal usando o ultraleve*, Embrapa Pantanal, Circular Técnica 58, Corumbá, 3 pp.

## Anexo O (Continuação)

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(4), June 2011 473

- CDC - Centers for Disease Control and Prevention 1999. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis-New York, 1999. *Morb Mortal Wkly Rep* 48: 845-849.
- Coimbra TLM, Nassar ES, Nagamori AH, Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Ueidato M, Romano NS 1993. Iguape: a newly recognized flavivirus from São Paulo state, Brazil. *Intervirol* 36: 144-152.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 228 pp.
- Couissinier-Paris P 2006. West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bull Soc Pathol Exot* 99: 348-354.
- Cruz L, Cardenas VM, Abarca M, Rodriguez T, Reyna RF, Serpas MV, Fontaine RE, Beasley DWC, Travassos Da Rosa APA, Weaver SC, Tesh RB, Powers AM, Suarez-Rangel G 2005. Short report: serological evidence of West Nile virus activity in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg* 72: 612-615.
- Diaz LA, Komar N, Visintin A, Júri MJD, Stein M, Allende RL, Spinsanti L, Konigheim B, Aguilar J, Laurito M, Almirón W, Contigiani M 2008. West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg Infect Dis* 14: 689-691.
- Gubler DJ, Kuno G, Markoff L 2007. Flaviviruses. In DM Knipe, PM Howley, DE Griffin, RA Lamb, SE Straus, MA Martin, B Roizman, *Field's Virology*, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1153-1252.
- Inouye S, Matsuno S, Tsurukubo Y 1984. "Original antigenic sin" phenomenon in experimental flavivirus infections of guinea pigs: studies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol Immunol* 28: 569-574.
- Iversson LB, Silva RAMS, Travassos da Rosa APA, Barros VLRS 1993. Circulation of Eastern equine encephalitis, ilheus, maguari and tacaigua viruses in equines of the Brazilian Pantanal. South America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35: 355-359.
- Jacobson ER, Ginn PE, Troutman JM, Farina L, Stark L, Klenk K, Burkhalter KL, Komar NJ 2005. West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *Wildl Dis* 41: 96-106.
- Joubert L, Oudart J, Hannoun C, Beytout D, Corniou B, Guillon JC, Panthier R 1970. Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 118: 239-247.
- Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, Gordy P, Beckett S, Komar N, Gubler D, Bunning M 2004. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis* 10: 2150-2155.
- Komar N 2001. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann NY Acad Sci* 951: 58-73.
- Komar N, Clark GG 2006. West Nile virus activity in Latin America and Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 19: 112-117.
- Komar N, Langevin S, Monath TP 2009. Use of a surrogate chimeric virus to detect West Nile virus-neutralizing antibodies in avian and equine sera. *Clin Vaccine Immunol* 16: 134-135.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp B 1998. Phylogeny of the genus flavivirus. *J Virol* 72: 73-83.
- Lane J 1953. *Neotropical Culicidae*, Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 1112 pp.
- Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M 2010. Surveillance for human West Nile virus disease - United States, 1999-2008. *MMWR Surveill Summ* 59: 1-17.
- Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N 2005. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis* 9: 1497-1498.
- Medeiros DB, Nunes MR, Vasconcelos PF, Chang GJ, Kuno G 2007. Complete genome characterization of Rocío virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in São Paulo state. *J Gen Virol* 88: 2237-2246.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Levis S, Enria D 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 12: 1559-1561.
- Morales-Betoulle ME, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R, Cordón-Rosales C 2006. West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis* 6: 1038-1039.
- MS - Ministério da Saúde, Brasil 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Primeiro inquérito sorológico em aves migratórias e nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus do Nilo ocidental. *Boletim eletrônico epidemiológico* 3: 3-12.
- MS - Ministério da Saúde, Brasil 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da febre do Nilo ocidental e outros vírus. *Boletim eletrônico epidemiológico* 4: 1-12.
- Nunes AP, Tomas WM 2008. *Aves migratórias e nômades ocorrentes no Pantanal*, Embrapa Pantanal, Corumbá, 123 pp.
- Olson GA, Hessler JR, Faith RE 1975. Technics for blood collection and intravascular infusion of reptiles. *Lab Anim Sci* 25: 783-786.
- Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Alencar J, Santos SJ, Murta M, Serra-Freire NM, Pellegrin AO, Gil-Santana H, Guimarães AE, Silva EE 2010a. Preliminary investigation of Culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52: 17-24.
- Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, Nogueira MF, Da Silva EE 2010b. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 829-833.
- Pauvolid-Corrêa A, Varella RB 2008. Epidemiological aspects of West Nile fever. *Rev Bras Epidemiol* 11: 463-472.
- Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina AY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, Yazyshina S, Platonova OV, Obukhov IL, Zhukov AN, Vengerov YY, Pokrovskii VI 2001. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 7: 128-132.
- Pugachev KV, Guirakhoo F, Mitchell F, Ocran SW, Parsons M, Johnson BW, Kosoy OL, Lanciotti RS, Roehrig JT, Trent DW, Monath TP 2004. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am J Trop Med Hyg* 71: 639-645.
- Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, Lefrançois T, Petitclerc M, Martinez D 2004. West Nile virus, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis* 10: 706-708.
- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol* 99: 285-290.
- Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, Tenorio A 2005. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 126: 101-109.
- Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A 2001. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the *Alphavirus* genus. *J Virol Methods* 95: 153-161.

## Anexo O (Continuação)

474 Antibodies to West Nile virus, Brazil • Alex Pauvolid-Corrêa et al.

- Silva JV, Abdon MM 1988. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesq Agrop Bras* 33: 1703-1711.
- Smithburn KC 1942. Differentiation of the West Nile virus from the viruses of St. Louis and Japanese b encephalitis. *J Immunol* 44: 25-31.
- Smithburn JS, Hughes TP, Burke AW, Paul JH 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 20: 471-492.
- Steinman A, Banet-Noach C, Tal S, Levi O, Simanov L, Perk S, Malkinson M, Shpigel N 2003. West Nile virus infection in crocodiles. *Emerg Infect Dis* 9: 887-888.
- Stim TB 1969. Arbovirus plaquing in two simian kidney cell lines. *J Gen Virol* 5: 329-338.
- Tarr GC, Hammon WM 1974. Cross-protection between group B arboviruses: resistance in mice to Japanese B encephalitis and St. Louis encephalitis viruses induced by dengue virus immunization. *Infect Immun* 9: 909-915.
- Tber Abdelhaq A 1996. West Nile fever in horses in Morocco. *Bull Off Int Epizoot* 11: 867-869.
- Tiriba AC, Miziara AM, Lourenço R, Costa CRB, Costa CS, Pinto GH 1976. Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul de São Paulo. *Rev Assoc Med Bras* 22: 415-420.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI 1998. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352: 767-771.
- White LA 1987. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *J Clin Microbiol* 25: 1221-1224.

## Anexo P

### 2X Ye-Lah MEIO DE *OVERLAY* SEM BICARBONATO DE SÓDIO:

	<u>1L</u>	<u>5L</u>	<u>10L</u>
10X Earle's BSS w/o Phenol Red	196 mL	980 mL	1960 mL
Ye-Lah Meio	66 mL	330 mL	660 mL
Soro fetal bovino (2%)	40 mL	200 mL	400 mL
Fungizona 1000X	2 mL	10 mL	20 mL
Gentamicina 1000X	2 mL	10 mL	20 mL
Água destilada estéril	694 mL	3470 mL	6940 mL

#### Ye-Lah meio:

Combinar solução de *Yeast extract* + solução de Lactalbumin hydrolysate 1:1, autoclavar por 15 min, aliquotar e rotular.

Armazenar Meio Ye-Lah a 4°C por até 3-4 meses.

#### Solução *Yeast extract*:

<i>Yeast extract</i>	20 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

#### Solução Lactalbumin hydrolysate:

Lactalbumin hydrolysate	100 g
H <sub>2</sub> O	1000 mL

Jason Velez (CDC)