

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

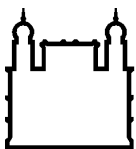
Alex Pauvolid Corrêa

Estudo sobre arbovírus em populações de equinos e artrópodes na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Mestrado em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.

Orientador: **Prof. Dr. Edson Elias da Silva**

Rio de Janeiro
2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

Alex Pauvolid Corrêa

Estudo sobre arbovírus em populações de equinos e artrópodes na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul

Orientador: **Prof. Dr. Edson Elias da Silva**

Banca examinadora

Prof. Dra. Elba Lemos (Presidente)

Prof. Dr. Anthony Érico Guimarães

Prof. Dr. Herman Schatzmayr

Rio de Janeiro, 12 de maio de 2008

À Sergio Pauvolid Corrêa, com amor do seu irmão.

AGRADECIMENTOS

À Mara Lúcia Campos Dias e minha amada família, meus eternos agradecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz, que muito contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho

Me. Aline Dias, Sra. Aline Silva, Dra. Cátia Gregio, Dr. Edson da Silva, Doutoranda Eliane Costa, Dra. Fernanda Burlandy, Doutorando Fernando Tavares, Doutoranda Gina Peres, Dr. José Barros, Srta. Michele Murta, Srta. Renata Leal e Sr. Silas de Oliveira.

À colaboração da Embrapa Pantanal

Dra. Aiesca Pellegrin, Sr. Armino Gonçalves, *In memoriam* de Sr. Ireno Conceição, Sr. Henrique de Jesus, Sr. Hidelberto Petzold, Sr. José Augusto da Silva, Me. José Comastri, Me. Luiz Pellegrin, Sr. Márcio da Silva, Sr. Marcos José Alves, Sr. Marcos Tadeu Araújo, Sr. Nelson Rodrigues, Sr. Roberto Rondon, Sr. Sebastião de Jesus, Dr. Thierry Tomich e Sr. Vandir da Silva.

À colaboração do Laboratório de Díptera Núcleo Culicídeos do Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Anthony Érico Guimarães, Dr. Jeronimo Alencar e Srta. Júlia Silva

À colaboração do Laboratório de Ixodides do Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Marinete Amorim, Dr. Gilberto Gazeta e Dr. Nicolau Serra Freire

À colaboração da Agropecuária Curvo LTDA.

Sr. Elísio Curvo e Sr. Danilo Curvo

À colaboração do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Davis Fernandes Ferreira e Dr. Maulori Curié Cabral

Ao Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Herman Schatzmayr e Dra. Rita Nogueira

Ao Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Elba Lemos

Ao apoio da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Ao apoio do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, sob orientação do chefe do laboratório Professor Doutor Edson Elias da Silva.

“All hematophagous arthropods are considered potential hosts of arbovirus”

Causey, Causey, Maroja & Macedo (1961)

RESUMO

Os arbovírus mantêm-se na natureza devido principalmente à transmissão biológica de um vertebrado infectado a outro susceptível através de artrópodes hematófagos. Assim como em humanos, casos de infecção sub-clínica por arbovírus são freqüentes em animais domésticos, entretanto sua identificação normalmente só ocorre durante epizootias sendo os casos isolados raramente diagnosticados. Regiões como o Pantanal brasileiro, que apresentam fatores como alta densidade populacional equina, circulação de aves migratórias e condições ambientais e climáticas favoráveis à proliferação de artrópodes estão potencialmente sujeitas à circulação de arbovírus. Entretanto, poucos trabalhos foram realizados acerca da presença de arbovírus no Pantanal. Neste sentido o principal objetivo deste trabalho foi estudar a circulação de arbovírus na região. Foram realizadas na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul, em fevereiro e novembro de 2007, amostragens de artrópodes e de soro sanguíneo de equinos. Um total de 75 grupos de culicídeos e 18 de ixodídeos compoendo uma amostragem de 1759 espécimes de artrópodes foram submetidos às técnicas de isolamento viral e RT-PCR, enquanto 135 amostras de soro sanguíneo equino foram submetidas a isolamento viral, testes de soroneutralização (NT) e RT-PCR. Foram pesquisados os arbovírus, vírus da encefalite equina do oeste (WEEV), vírus da encefalite equina do leste (EEEV), vírus Mayaro (MAYV), vírus da encefalite de St Louis (SLEV), vírus Rocio (ROCV), vírus Ilhéus (ILHV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do oeste do Nilo (WNV) e vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) por NT e/ou RT-PCR. *Resultados:* Não houve isolamento viral em nenhuma amostra analisada. Os resultados de detecção de ácido nucléico viral nas amostras de artrópodes e soro equino, pela técnica de RT-PCR, foram também negativos. Foi detectada soropositividade, em equinos não vacinados, de 41,7 % para WEEV e 56,6 % para EEEV. Nenhuma amostra de soro foi positiva (0%) para MAYV e 40 % dos soros foram positivos para SLEV. Foram identificadas 22 espécies de culicídeos. Nossos resultados sugerem por evidência sorológica, circulação de três arbovírus, na Região do Pantanal, causadores de quadros clínicos em seres humanos. A presença desses agentes, aliada às demais condições existentes no país para a sua disseminação, constitui em um problema de saúde pública que deve ser motivo de ações preventivas por parte das autoridades de saúde.

ABSTRACT

Arboviruses are maintained in nature due the biological transmission of an infected vertebrate host to another through hematophagous arthropods. As occur in humans, sub-clinic infection cases due to arboviruses are frequent in domestic animals, however its identification normally only occur during epizooties, and the sporadic cases are seldom diagnosed. Regions like the Brazilian Pantanal, which present high density of equine population, circulation of migratory birds, environmental and climatic conditions which favor the proliferation of arthropods, are susceptible the circulation of arboviruses. The amount of data concerning arboviruses in the Pantanal is scarce; therefore the objective of the present work was study the circulation of arboviruses in the region. During the months of February and November of 2007, a survey and capture of arthropods was carried in the Sub-region of the Nhecolândia in the Pantanal of Mato Grosso do Sul. Equine serum samples were also obtained. A total of 75 groups of Culicidae and 18 of Ixodidae, comprising 1759 specimens of arthropods were submitted to viral isolation and RT-PCR while 135 equine serum samples were submitted to viral isolation, neutralization tests (NT) and RT-PCR. The investigated arboviruses were *Western equine encephalitis virus* (WEEV), *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Mayaro virus* (MAYV), *St Louis encephalitis virus* (SLEV), *Rocio virus* (ROCV), *Ilheus virus* (ILHV), *Yellow fever virus* (YFV), *West Nile virus* (WNV) and *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) by NT and/or RT-PCR. *Results:* No virus was isolated; viral nucleic-acid detection in the arthropods and equine sera by RT-PCR were also negative. Seropositivity in unvaccinated equines was 41,7% for WEEV and 56,6% for EEEV. No serum was positive (0%) for MAYV while 40% of them were positive to SLEV. 22 Culicidae species were identified. Our results suggest by serological evidence, the circulation in the Pantanal Region, of three arboviruses that are etiological agents of human diseases. The occurrence of these agents combined to preexistent condition, in the country, which could favor its dissemination represents a public health concern, which should be take in to account by the Public Health authorities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Localização do Pantanal no território brasileiro	33
Figura 1.2	Sub-regiões do Pantanal brasileiro	34

LISTA DE FOTOS

Foto 1.1	Visão aérea da Sub-região da Nhecolândia	35
Foto 1.2	Visão aérea de uma das baías da Sub-região da Nhecolândia	35
Foto 1.3	<i>Mycteria americana</i> Linnaeus, 1758, popularmente conhecida como cabeça seca, em um ninhal na Sub-região da Nhecolândia. É uma espécie de ave migrante dentro do continente americano	36
Foto 1.4	<i>Himantopus melanurus</i> Vieillot, 1817, popularmente conhecida como Pernilongo, em uma salina na Sub-região da Nhecolândia. É uma espécie de ave migrante dentro do território nacional	36
Foto 1.5	Cavalos Pantaneiros se alimentando em uma baía na Sub-região da Nhecolândia	37
Foto 1.6	Equideocultura extensiva na Sub-região da Nhecolândia	37
Foto 4.1	Visão aérea da Fazenda Nhumirim	43
Foto 4.2	Foto de satélite da Fazenda Nhumirim no inverno	43
Foto 4.3	Foto de satélite da Fazenda Nhumirim no verão	43
Foto 4.4	Animais gentilmente cedidos pela Fazenda Santa Maria. Os animais desta propriedade não eram domados	47
Foto 4.5	Um dos Cavalos Pantaneiros gentilmente cedidos pela Fazenda Nhumirim	47
Foto 4.6	Armadilha CDC® em árvore dentro de uma cordilheira na Fazenda Nhumirim para captura de culicídeos acrodendrofílicos	51
Foto 4.7	Armadilha Shannon colocada entre uma cordilheira e uma baía na Fazenda Nhumirim para captura de culicídeos	51
Foto 4.8	Armadilha CDC® colocada próxima ao solo à beira de uma cordilheira na Fazenda Nhumirim, para captura de culicídeos	51
Foto 4.9	Coleta por aspiração com tubo de sucção oral de culicídeos em hematofagia em equino da Fazenda Nhumirim	51
Foto 4.10	Coleta por aspiração com tubo de sucção oral de culicídeos em hematofagia em membro da equipe do Laboratório de Enterovírus dentro de cordilheira na Fazenda Nhumirim	51

Foto 4.11	Residência do trabalhador rural Sr. Roberto Rondon da Embrapa Pantanal, gentilmente cedida para captura de culicídeos através da armadilha CDC® em ambiente intradomiciliar	51
Foto 4.12	Um dos espécimes de <i>Amblyomma cajennense</i> (Fabricius, 1787) Koch, 1844 coletados durante hematofagia em eqüinos venopuncionados	52
Foto 4.13	Um dos espécimes de Culicinae coletados, durante hematofagia em membros da equipe.....	52
Foto 5.1	Foto de gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb, coluna 02 a 18 amostras negativas e colunas 19 e 20, controles positivos compostos por MAYV (270 pb) e WEEV (208 pb) juntos no mesmo poço	88
Foto 5.2	Foto de gel de agarose a 2 % corados com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb coluna 02 a 14 amostras negativas e coluna 15 controle positivo MAYV (270 pb)	88
Fotos 5.3	Foto de gel de acrilamida a 10 % corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb, coluna 02 a 09 amostras negativas e colunas 10, controle positivo SLEV (199 pb)	88
Fotos 5.4	Foto de gel de acrilamida a 10 % corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb, coluna 02 a 09 amostras negativas e colunas 10, controle positivo SLEV (199 pb)	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1	Soropositividade das amostras de soro sanguíneo eqüino	83
Gráfico 5.2	Número absoluto de eqüinos soropositivos	83
Gráfico 5.3	Número absoluto de eqüinos soropositivos com idade superior a sete meses e não vacinados com Encefalovacín®	84
Gráfico 5.4	Distribuição por título de anticorpos do número absoluto de eqüinos soropositivos com idade superior a sete meses e não vacinados com Encefalovacín®	84
Gráfico 5.5	Percentuais de soropositividade em eqüinos vacinados com Encefalovacín®	85
Gráfico 5.6	Percentuais de soropositividade em eqüinos com idade superior a 7 meses de idade e não vacinados com Encefalovacín®	85
Gráfico 5.7	Distribuição por idade de eqüinos soropositivos para EEEV (amarelo), WEEV (verde) e SLEV (azul) e vacinados com Encefalovacín®	86
Gráfico 5.8	Percentual de soropositividade para SLEV em eqüinos de acordo com a propriedade amostrada. Anel exterior Fazenda Nhumirim e anel interior Fazenda Santa Maria	86
Gráfico 5.9	Percentual de espécimes de culicídeos capturados e coletados nos dois períodos de amostragem	95
Gráfico 5.10	Número de espécimes de culicídeos identificados às dez espécies de maior prevalência em fevereiro de 2007	95
Gráfico 5.11	Número de espécimes de culicídeos identificados às dez espécies de maior prevalência em novembro de 2007	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1	Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> em amostras virais controle	59
Quadro 4.2	Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para SLEV em amostra viral controle	59
Quadro 4.3	Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> em amostras de soro sanguíneo eqüino	65
Quadro 4.4	Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i> em amostras de soro sanguíneo eqüino	65
Quadro 4.5	Lista de iniciadores utilizados para Duplex PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i> em amostras de artrópodes	69
Quadro 4.6	Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i> em amostras de artrópodes	69
Quadro 4.7	Sumário das análises realizadas. As áreas marcadas referem-se a realização da referida análise	71
Quadro 5.1	Espécies de Culicidae identificadas em espécimes capturados e coletados na Sub-região da Nhecolândia, no Pantanal de Mato Grosso do Sul em fevereiro e novembro de 2007	90

LISTA DE ORGANOGRAMAS

Organograma 4.1	Animais venopuncionados de acordo com a propriedade, idade e vacinação	46
Organograma 4.2	Seqüência dos eventos realizados em amostras virais controle	60
Organograma 4.3	Seqüência dos eventos realizados em amostras de soro sanguíneo equino	66
Organograma 4.4	Seqüência dos eventos realizados em amostras de artrópodes	70
Organograma 5.1	Animais soropositivos para WEEV de acordo com a propriedade, idade e vacinação	75
Organograma 5.2	Animais soropositivos para EEEV de acordo com a propriedade, idade e vacinação	78
Organograma 5.3	Animais soropositivos para SLEV de acordo com a propriedade, idade e vacinação	81

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Autorização para coleta de sangue dos animais da Fazenda Nhumirim	142
ANEXO B	Autorização para coleta de sangue dos animais da Fazenda Santa Maria	143
ANEXO C	Ficha de titulação das amostras virais controle	144
ANEXO D	Ficha de coleta de sangue dos eqüinos	145
ANEXO E	Ficha de Soroneutralização	146
ANEXO F	Ficha de Soroneutralização detalhada	147
ANEXO G	Licença do IBAMA para coleta e captura dos culicídeos	148
ANEXO H	Coleta e captura de culicídeos realizada em fevereiro de 2007	149
ANEXO I	Coleta e captura de culicídeos realizada em novembro de 2007	154
ANEXO J	Protocolo para trituração de culicídeos	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCCP	Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Pantaneiros
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCID ₅₀	<i>Cell Culture Infective Doses 50%</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
c-DNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CF	<i>Complement Fixation</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECP	Efeito Citopatogênico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
HI	<i>Hemagglutination Inhibition</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IEC	Instituto Evandro Chagas
IF	<i>Immunofluorescence</i>
LabDip	Laboratório de Diptera (Núcleo Culicídeos) do Instituto Oswaldo Cruz
LEV	Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz
Moi	<i>Multiplicity of Infection</i>
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NB-A2	Nível de Biossegurança A2
NT	<i>Neutralization Test</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFU	<i>Plaque Forming Unit</i>
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TRIS	Hidroximetilaminometano
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>

LISTA DE SIGLAS VIRAIS DE ACORDO COM O ICTV

APEUV	<i>Apeu virus</i>
AROAV	<i>Aroa virus</i>
ASFV	<i>African swine fever virus</i>
AURAV	<i>Aura virus</i>
BSQV	<i>Bussuquara virus</i>
CARV	<i>Caraparu virus</i>
CATUV	<i>Catu virus</i>
CEV	<i>California encephalitis virus</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
EAdV	<i>Equine adenovirus</i>
EEEV	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>
EIAV	<i>Equine infectious anemia virus</i>
EHR-1	<i>Equid herpesvirus 1</i>
ERV-1	<i>Equine rhinovirus 1</i>
GMAV	<i>Guama virus</i>
GROV	<i>Guaroa virus</i>
ILHV	<i>Ilheus virus</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
MAGV	<i>Maguari virus</i>
MAYV	<i>Mayaro virus</i>
MTBV	<i>Marituba virus</i>
MUCV	<i>Mucambo virus</i>
MURV	<i>Murutucu virus</i>
NTAV	<i>Ntaya virus</i>
ORIV	<i>Oriboca virus</i>
PIXV	<i>Pixuna virus</i>
ROCV	<i>Rocio virus</i>
SLEV	<i>St Louis encephalitis virus</i>
TCMV	<i>Tacaiuma virus</i>
UNAV	<i>Una virus</i>
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>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	OS ARBOVÍRUS	01
1.1.1	Aspectos gerais	01
1.1.2	Diagnóstico laboratorial	03
1.1.3	Famílias e respectivas espécies virais a serem pesquisadas no presente estudo	05
1.1.3.1	<i>Flaviviridae</i>	05
1.1.3.1.1	<i>Vírus da encefalite de St Louis (SLEV)</i>	06
1.1.3.1.2	<i>Vírus Rocio (ROCV)</i>	08
1.1.3.1.3	<i>Vírus Ilhéus (ILHV)</i>	10
1.1.3.1.4	<i>Vírus da febre amarela (YFV)</i>	12
1.1.3.1.5	<i>Vírus do oeste do Nilo (WNV)</i>	14
1.1.3.2	<i>Togaviridae</i>	18
1.1.3.2.1	<i>Vírus Mayaro (MAYV)</i>	18
1.1.3.2.2	<i>Vírus da encefalite equina do leste (EEEV)</i>	20
1.1.3.2.3	<i>Vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV)</i>	23
1.1.3.2.4	<i>Vírus da encefalite equina do oeste (WEEV)</i>	24
1.1.4	Estudos sobre arbovírus em equinos no Brasil	26
1.2	PANTANAL BRASILEIRO	27
1.2.1	Aspectos gerais	27
1.2.2	Avifauna de hábitos migratórios	29
1.2.3	Fauna culicidiana	30
1.2.4	Cavalo Pantaneiro	31
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40

4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	LOCAIS DE ESTUDO	41
4.2	METODOLOGIA DAS AMOSTRAGENS.....	44
4.2.1	Equinos	44
4.2.2	Artrópodes	48
4.2.2.1	Culicídeos	48
4.2.2.1.1	<i>Capturas e coletas</i>	48
4.2.2.1.2	<i>Identificação</i>	48
4.2.2.1.3	<i>Trituração</i>	49
4.2.2.2	Ixodídeos	49
4.2.2.2.1	<i>Coletas</i>	49
4.2.2.2.2	<i>Identificação</i>	50
4.2.2.2.3	<i>Trituração</i>	50
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS DO MATERIAL COLETADO	53
4.3.1	Cultivos celulares utilizados	53
4.3.2	Amostras virais controle	53
4.3.2.1	Propagação viral	54
4.3.2.2	Titulação viral (padronização da concentração de antígenos virais)	55
4.3.2.3	Extração do ácido nucléico viral	55
4.3.2.4	Síntese do c-DNA	56
4.3.2.5	PCR para <i>Alphavirus</i> ou <i>Flavivirus</i>	56
4.3.2.6	Semi-Nested PCR para <i>Flavivirus</i> ou <i>Alphavirus</i>	57
4.3.2.7	Eletroforese	57
4.3.2.8	Eluição do gel para captura dos oligonucleotídeos e quantificação dos produtos ..	58
4.3.2.9	Reações cíclicas de seqüenciamento nucleotídico	58
4.3.3	Amostras de soro sanguíneo equino	61
4.3.3.1	Teste de Soroneutralização (NT)	61
4.3.3.2	Isolamento viral	62
4.3.3.3	PCR seguido de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i>	63
4.3.3.4	PCR seguido de Nested PCR para <i>Flavivirus</i>	63

4.3.4	Amostras de artrópodes	67
4.3.4.1	Isolamento viral das amostras de artrópodes	67
4.3.4.2	Duplex PCR	67
4.3.4.3	Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>	67
4.3.4.4	PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i>	68
5	RESULTADOS	72
5.1	AMOSTRAS VIRAIS CONTROLE	72
5.1.1	Confirmação da identidade por seqüenciamento nucleotídico	72
5.1.1.1	Vírus da encefalite eqüina do oeste (WEEV)	72
5.1.1.2	Vírus Mayaro (MAYV)	72
5.1.1.3	Vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV)	72
5.1.1.4	Vírus da encefalite de St Louis (SLEV)	72
5.2	AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO EQÜINO	73
5.2.1	Soroneutralização (NT)	73
5.2.1.1	Vírus da encefalite eqüina do oeste (WEEV)	73
5.2.1.2	Vírus Mayaro (MAYV)	76
5.2.1.3	Vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV)	76
5.2.1.4	Vírus da encefalite de St Louis (SLEV)	79
5.2.1.5	Soropositividade para mais de um vírus	82
5.2.2	Isolamento viral	87
5.2.3	PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i>	87
5.2.4	PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i>	87
5.3	AMOSTRAS DE ARTRÓPODES	89
5.3.1	Espécies de culicídeos identificadas em espécimes capturados	89
5.3.1.1	Coleta durante hematofagia em eqüinos	91
5.3.1.2	Coleta durante hematofagia em membros da equipe	91
5.3.1.3	Captura com a utilização da armadilha CDC®	91

5.3.1.3.1	<i>Captura de culicídeos acrodendrofílicos com armadilha CDC®</i>	92
5.3.1.3.2	<i>Captura com armadilha CDC® no interior da residência de um trabalhador rural</i>	92
5.3.1.4	Captura com armadilha Shannon	92
5.3.1.5	Eficiência das técnicas utilizadas para captura e coleta de culicídeos utilizadas ...	93
5.3.1.5.1	<i>Fevereiro de 2007</i>	93
5.3.1.5.2	<i>Novembro de 2007</i>	93
5.3.1.5.3	<i>Fevereiro e Novembro de 2007</i>	94
5.3.2	Espécies de ixodídeos identificadas em espécimes coletados	96
5.3.3	Isolamento viral das amostras de artrópodes	96
5.3.4	Duplex PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i> em amostras de artrópodes	96
5.3.5	PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i> em amostras de artrópodes	96
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÃO	109
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1 **INTRODUÇÃO**
1.1 **OS ARBOVÍRUS**
1.1.1 **Aspectos gerais**

Em 1942, a expressão *arthropod-borne virus* foi introduzida para descrição do grupo de vírus animais que se propagam em artrópodes e são transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Duas décadas depois, o Subcomitê Internacional para Nomenclatura Viral recomendou a adoção oficial do termo *arbovirus* (arbovírus) para designação dos vírus que são mantidos na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados (OMS, 1985). Em ciclos arbovirais, artrópodes susceptíveis participam como hospedeiro definitivo permanecendo infectado durante toda a sua vida e por isso são considerados vetores e reservatórios de arbovírus (Causey, 1958). Salvo em condições especiais, os arbovírus não são transmitidos entre vertebrados sem o intermédio de artrópodes (Casals & Reeves, 1959). À exceção do vírus da peste suína africana (ASFV), a ausência de arbovírus compostos por ácido desoxirribonucléico (DNA) sugere que a grande plasticidade genética e altas taxas de mutação dos vírus compostos por ácido ribonucléico (RNA) permitiram a este grupo, propagação em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Weaver, 2006).

De aproximadamente 500 vírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus e outros Vírus de Vertebrados, cerca de 100 espécies de arbovírus são conhecidas por infectarem humanos e 40 por infectarem animais domésticos (Karabatsos, 1985; Varma, 1989a). Muitas arboviroses caracterizadas por síndromes sistêmicas inespecíficas ou pela baixa incidência, freqüentemente permanecem sem identificação mesmo em países com maior apoio laboratorial para os diagnósticos, o que causa uma subnotificação dos casos (Brés, 1988).

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 (HI), fixação do complemento (CF) e neutralização (NT) reunidos por Casals (1963). Os três primeiros grupos caracterizados foram designados pelas letras A, B e C, sendo os demais nomeados de acordo com a classificação taxonômica dos primeiros vírus isolados no respectivo grupo (Calisher & Karabatsos, 1988). Os arbovírus estão taxonômicamente distribuídos em diversas famílias virais, como *Picornaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae* (OMS, 1985). Atualmente, os arbovírus estão taxonômicamente classificados de

acordo com o 8º Relatório do Comitê Internacional para Nomenclatura Viral (ICTV), referência padrão e definitiva para a taxonomia viral (Fauquet *et al.*, 2005).

Dos arbovírus conhecidos que infectam o homem, aproximadamente 40 espécies estão envolvidas em quadros de febre, encefalite, artralgia, mialgia, exantema ou febre hemorrágica no continente americano (Causey & Causey, 1962; Beaty, Calisher & Shope, 1995). Algumas destas espécies, como vírus da encefalite de St Louis (SLEV), vírus da encefalite Califórnia (CEV), vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV) e vírus da encefalite eqüina do oeste (WEEV) são considerados importantes agentes etiológicos de desordens neurológicas humana e à exceção de SLEV, também eqüina (Hammon & Reeves, 1952; Burke & Monath, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001c). Os vírus EEEV, SLEV e mais recentemente o vírus do oeste do Nilo (WNV) são os principais arbovírus envolvidos em casos de meningite asséptica no homem (Calisher *et al.*, 1990; Chadwick, 2005). No final da década de 1990, à infecção por WNV até então não detectado no ocidente, foram atribuídos quadros clínicos de encefalite humana e animal, principalmente em eqüinos na América do Norte (Nash *et al.*, 2001; Ostlund *et al.*, 2001; Trock *et al.*, 2001).

Na América do Sul, há muitos anos ocorrem epidemias por arbovírus na região 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, camundongos utilizados como sentinelas e culicídeos foram isolados arbovírus em 4,8% das pessoas, 62,6% dos primatas, 13,5% dos grupos de camundongos e em 1,8% dos grupos de culicídeos avaliados. O estudo identificou em espécimes sanguíneos humanos, os togavirídeos identificados a vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV) e vírus Mayaro (MAYV), os flavivirídeos vírus Ilhéus (ILHV) e vírus da febre amarela (YFV) e os bunivirídeos vírus Oriboca (ORIV), vírus Apeu (APEUV), vírus Caraparu (CARV), vírus Murutucu (MURV), vírus Marituba (MTBV), vírus Guama (GMAV) e vírus Catu (CATUV).

Neste estudo todos os bunivirídeos identificados, além do vírus Tacaiuma (TCMV) e do flavivirídeo vírus Bussuquara (BSQV), sorotipo de vírus Aroa (AROAV), foram descritos pela primeira vez em território brasileiro (Causey, Causey, Maroja & Macedo, 1961). Em outro extenso trabalho, um inquérito sorológico realizado com trabalhadores residentes na cidade de Belém no PA no início da década de 1960, detectou em ordem decrescente de prevalência, anticorpos para os arbovírus CARV, MAYV, vírus Guaroa (GROV), vírus Mucambo (MUCV), MURV, vírus Maguari (MAGV), ORIV, vírus Una (UNAV), EEEV, vírus Aura (AURAV) e TCMV (Bensabath & Andrade, 1962). Em mais de 40 anos de arbovirologia na Amazônia brasileira foram isolados vírus identificados a mais de 180 espécies de arbovírus, sendo 32

reconhecidamente patogênicas ao homem (Vasconcelos *et al.*, 2001c). Embora o maior número de relatos da ocorrência de arboviroses no Brasil tenha sido proveniente de estudos na região amazônica, a circulação de arbovírus em populações humana e animal tem sido comumente relatada em todas as regiões do país. Além da Região Norte, vestígios da circulação viral e até mesmo epidemias e epizootias causadas por arbovírus foram e vêm sendo reportados na Região Nordeste (Tavares-Neto *et al.*, 1986; Souza *et al.*, 1995; Straatmann *et al.*, 1997; Montenegro *et al.*, 2006), Sudeste (Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo, 1961; Nunes *et al.*, 2005), Centro-Oeste (Iversson, Travassos da Rosa & Barros, 1993; Feres *et al.*, 2006) e Sul do país (Fernandéz, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol, 2000; Barcellos *et al.*, 2005).

Na Região Sudeste, além do vírus Dengue (DENV), agente etiológico de sucessivas epidemias ocorridas em áreas urbanas a partir da década de 1980 (Schatzmayr, Nogueira & Travassos da Rosa, 1986; Lima *et al.*, 1999; Corrêa, França & Bogutchi, 2005; Nogueira *et al.*, 2005), a ocorrência de outros arbovírus como vírus Rocio (ROCV) e SLEV vem sendo descrita principalmente em regiões de Mata Atlântica remanescente, como o Vale do Ribeira no sul do estado de São Paulo (SP) (Iversson, 1977; Iversson, Travassos da Rosa & Rosa, 1989; Ferreira *et al.*, 1994; Iversson, 1994; Romano-Lieber, 2000). 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). Uma revisão das atividades do Laboratório de Vírus de Belém, realizadas na região amazônica durante a década de 1950 mostrou que, na área estudada, apesar da utilização do camundongo imaturo sentinela proporcionar o meio mais eficiente para detecção de atividade arboviral, o estudo de todas as fontes naturais incluindo vertebrados domésticos e silvestres e artrópodes vetores contribuem para um compreensivo reconhecimento da circulação de arbovírus na região (Causey, 1962).

1.1.2 **Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial clássico das arboviroses tem sido realizado com base em dois parâmetros, o isolamento e identificação dos vírus e 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 identificadas como Efeito Citopatogênico (ECP) (Santos,

2002). A extraordinária especificidade dos anticorpos para com determinados antígenos os torna valiosos para detecção, purificação e quantificação de antígenos (Abbas & Lichtman, 2005). Os testes sorológicos mais utilizados são NT, CF, HI, imunofluorescência (IF) e o ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas (ELISA) (Santos, 2002). Os testes apresentam objetivos distintos sendo HI comumente utilizado para a detecção de anticorpos, CF para identificação de amostras virais isoladas e NT para detecção de anticorpos e caracterização dos vírus isolados (Vasconcelos *et al.*, 1991). Em um estudo realizado para avaliação dos principais métodos de diagnóstico sorológico utilizados em pesquisa de CEV nos Estados Unidos da América (EUA), o NT com diluição sérica seriada demonstrou alta especificidade e algumas vantagens técnicas em relação ao HI e CF, como boa sensibilidade e simplicidade na execução e preparação de reagentes (Lindsey, Calisher & Mathews, 1976). Em virtude de sua especificidade, o NT também é o teste sorológico mais indicado para pesquisa de infecção pregressa por SLEV, ILHV e YFV (Vasconcelos *et al.*, 1991; Brasil, 1999; Burke & Monath, 2001).

Embora o isolamento e identificação viral em arbovirologia foram e ainda vêm sendo feitos através de inoculação intracerebral em camundongos recém nascidos (Causey, Causey, Maroja & Macedo, 1961; Causey, 1962; Lopes, Coimbra, Sacchetta & Calisher, 1978; Scherer & Chin, 1983; Vasconcelos *et al.*, 1991; Nassar *et al.*, 1997; Straatman *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 1998), a utilização de culturas celulares apresenta bons resultados e por isso vem sendo amplamente utilizada na propagação, isolamento e identificação viral (Lopes, Sacchetta, Coimbra & Pereira, 1979; White, 1987; Tesh *et al.*, 1999; Danielová, Holubová & Daniel, 2002; Santos, 2002; Aguilar *et al.*, 2004; Turell *et al.*, 2005).

A maioria dos arbovírus pode ser propagada em culturas de células de vertebrados produzindo ECP. Entre as células que apresentam boa susceptibilidade aos arbovírus estão células renais de mamíferos, como as dos primatas *Cercopithecus aethiops* (Linnaeus, 1758) e *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780) respectivamente conhecidas como VERO e LLC-MK₂, de roedores como o *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) conhecida como BHK-21 (ATCC, 1979; Beaty, Calisher & Shope, 1995) e de invertebrados como o clone celular C6/36 originada a partir do Culicidae *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (White, 1987).

Uma outra e mais recente abordagem no diagnóstico das arboviroses é a detecção de antígenos ou ácidos nucléicos virais. O diagnóstico viral através de técnicas de detecção de ácido nucléico pode ser aplicado na pesquisa de virtualmente qualquer vírus (Knipe & Howley, 2001). Dependendo da seqüência 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 ribonucléico estão a transcrição reversa em reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), onde os transcritos de um gene em particular são detectados usando-se primeiramente uma transcriptase reversa para produzir cópias de moléculas de DNA complementares (c-DNA) ao RNA mensageiro antes da amplificação por PCR (Abbas & Lichtman, 2005), Multiplex PCR que consiste em um ensaio de amplificação onde são introduzidos no mesmo tubo dois ou mais conjuntos de iniciadores específicos para alvos diferentes, Nested PCR que utiliza dois conjuntos de iniciadores em duas reações de PCR consecutivas, sendo que o produto da primeira servirá como alvo para a segunda, seqüenciamento nucleotídico que através do seqüenciamento do produto amplificado, permite análise filogenética do vírus seqüenciado (Knipe & Howley, 2001; Britto *et al.*, 2005) e RT-PCR em tempo real que tem demonstrado grande sensibilidade à detecção de ácido nucléico viral em espécimes biológicos de vertebrados e invertebrados (Lanciotti *et al.*, 2000; Hadfield *et al.*, 2001; Kauffman *et al.*, 2003).

O RT-PCR é a técnica molecular mais comumente realizada em pesquisa para arbovírus em grupos de artrópodes e vem sendo amplamente utilizada na vigilância epidemiológica de diversas arboviroses (White *et al.*, 2001; Tonbak *et al.*, 2006; Ré *et al.*, 2008).

1.1.3 Famílias e respectivas espécies virais a serem pesquisadas no presente estudo

1.1.3.1 *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é taxonômicamente composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus* e está representada por partículas esféricas envelopadas de 40 a 60 nm de diâmetro, com genoma RNA fita simples de polaridade positiva (Ackermann & Bertheaume, 1995). De acordo com o ICTV, ao gênero *Flavivirus* estão classificadas aproximadamente 50 espécies virais de difícil identificação morfológica e taxonômicamente divididas em dez grupos antigenicamente relacionados (Price, 1957; Madeley, 1988; Schatzmayr & Barth, 2005; Fauquet *et al.*, 2005).

No Brasil, os principais *Flavivirus* já reportados como agentes etiológicos em arboviroses humanas YFV, DENV, SLEV e ROCV estão taxonômicamente agrupados de acordo com suas características antigênicas em grupo do vírus da febre amarela, grupo do vírus dengue, grupo do vírus da encefalite japonesa e grupo do vírus Ntaya respectivamente (Laemmert & Causey, 1962; Iversson, Travassos da Rosa & Rosa, 1989; Nassar *et al.*, 1997; Casali *et al.*, 2004; Rocco *et al.*,

2005). Em 40 anos de arbovirologia na Amazônia brasileira, o Instituto Evandro Chagas (IEC) detectou, através de isolamento viral, a presença de espécies virais classificadas a *Flavivirus* em diversas amostras de culicídeos, mamíferos silvestres e domésticos, aves e homem (Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

1.1.3.1.1 *Vírus da encefalite de St Louis (SLEV)*

À infecção sintomática por SLEV, *Flavivirus* antigenicamente associado ao grupo do vírus da encefalite japonesa, são atribuídas zoonoses acometendo principalmente aves no Novo Mundo. Ocasionalmente, a infecção sintomática por SLEV é reportada em seres humanos em quadros clínicos que normalmente envolvem febre aguda e encefalite (Monath & Heinz, 1996). Casos de infecção humana sintomática são reportados por todo o continente americano (Cortés *et al.*, 1975; Spence, Artsob, Grant & Th'ng, 1977; Kaplan, Longhurst & Randall, 1978; Pelegrino *et al.*, 1996; Spinsanti *et al.*, 2003), entretanto o maior número de casos vem sendo registrado na América do Norte e principalmente nos EUA, onde reportam-se epidemias por SLEV em todas as regiões geográficas do país (Altman & Goldfield, 1968; Powell & Blakey, 1977; Zweighaft, Rasmussen, Brolnitsky & Lashof, 1979; Tsai *et al.*, 1987; Tsai *et al.*, 1988; Reisen *et al.*, 1992; Marfin *et al.*, 1993; McCaig, Janowski, Gunn & Tsai, 1994; Jones *et al.*, 2002). Entre 1964 e 2006 foram reportados nos EUA mais de 4600 casos da doença (CDC, 2007a).

Na América do Sul, a infecção humana por SLEV também vem sendo relatada, em 2005 uma epidemia envolvendo 47 casos clínicos confirmados foi descrita na província argentina de Córdoba (Mettler & Casals, 1971; Spinsanti *et al.*, 2008).

No Brasil diversos trabalhos 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 em 5,5% das amostras analisadas (Causey, Shope & Theiler, 1964). Em 1978, também na Região Norte do Brasil, partículas virais identificadas a SLEV foram isoladas de uma amostra sanguínea de um paciente sintomático na cidade de Belém (Pinheiro, LeDuc, Travassos da Rosa & Leite, 1981).

A circulação de SLEV também tem sido detectada em outras regiões do país, em um trabalho realizado no interior de SP, 5% dos espécimes biológicos humanos em ausência de doença clínica apresentaram anticorpos inibidores de hemaglutinação e neutralizantes para SLEV (Lopes, Sacchetta, Coimbra & Pereira, 1979). Na década de 1970, um inquérito sorológico realizado com crianças em idade escolar no então estado da Guanabara detectou a presença de

imunoglobulinas anti-SLEV em 3% do grupo avaliado (Pinheiro *et al.*, 1975). Em outro inquérito sorológico realizado 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, enquanto ROCV e ILHV juntos somaram 5,5% (Romano-Lieber & Iversson, 2000). Em meados da década de 1980, a sorologia realizada em habitantes do município de Valença no estado da Bahia (BA) detectou a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação por SLEV em indivíduos assintomáticos (Tavares-Neto *et al.*, 1986).

Em 2004, vírus identificados a SLEV foram isolados em um caso de infecção humana sintomática, pela primeira vez em SP. Através de sua caracterização molecular e subsequente análise em dendrograma, este isolado denominado SPH253157 demonstrou maior proximidade filogenética ao isolado argentino 79V-2533 do grupo III, do que aos seis isolados previamente identificados no Brasil pertencentes aos grupos II e V (Rocco *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006a).

Em 2006, durante uma epidemia de DENV-3 na cidade de São José do Rio Preto em SP, a presença de vírus identificados a SLEV foi detectada em seis pacientes negativos e um positivo para DENV. O seqüenciamento nucleotídico dos oligonucleotídeos específicos detectados por Multiplex Nested RT-PCR revelou seqüências idênticas entre si e homologia de 96% ao isolado argentino AY6-32544 (Mondini *et al.*, 2007).

Entre os animais silvestres, as aves são consideradas o mais importante grupo de manutenção e amplificação do vírus na natureza (Tsai & Mitchell, 1988). No final da década de 1960, vírus identificados a SLEV foram isolados de amostras sanguíneas de espécimes de aves identificadas a *Crypturellus noctivagus* (Wied-Neuwied, 1820) e *Thraupis sayaca* (Linnaeus, 1766), respectivamente conhecidas como jaó-do-sul e sanhaço, capturadas no interior de SP (Lopes, Sacchetta, Coimbra & Pereira, 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 relevante inquérito sorológico, 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, sendo 25 residentes e oito migratórias estritas (Ferreira *et al.*, 1994). Além das aves, a circulação de SLEV já foi reportada em outras classes de vertebrados, principalmente répteis e mamíferos (Spalatin, Connell, Burton & Gollop, 1964; Buck *et al.*, 1993).

Entre os animais domésticos, a circulação de SLEV tem sido identificada principalmente em equinos em prevalências discrepantes. Em um inquérito soroepidemiológico 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 eqüinos no mesmo país, a presença de imunoglobulinas neutralizantes de SLEV foi detectada em apenas 2% dos 282 animais avaliados (Mettler, Fernández, Di Santo & Pardo, 1985).

Quanto aos hospedeiros invertebrados, atribui-se a transmissão de SLEV basicamente a insetos, principalmente culicídeos identificados a *Culex* Linnaeus, 1758, *Aedes* Meigen, 1818, *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827, *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827, *Trichoprosopon* Theobald, 1901 e *Wyeomyia* Theobald, 1901 (Aitken *et al.*, 1964; Anderson *et al.*, 1957; Galindo, Rodaniche & Johnson, 1959; Galindo *et al.*, 1964; Figueiredo, 2007). Todavia, a presença viral também já foi detectada em aracnídeos identificados à espécie *Dermacentor variabilis* Say, 1821 (McLean *et al.*, 1985). Na região amazônica, vírus identificados a SLEV foram detectados através de isolamento viral nestas duas classes de artrópodes, em Insecta identificados a *Culex* (*Culex*) spp. e *Sabethes belisarioi* Neiva, 1908 e em Aracnida identificados a *Gigantolaelaps* spp., capturados como ectoparasitos em roedores (Turell *et al.*, 2005; Causey, Shope & Theiler, 1964; Abba *et al.*, 2001; Serra-Freire, 2001).

1.1.3.1.2 *Vírus Rocio* (ROCV)

À infecção por ROCV, isolados pela primeira vez por Lopes, Coimbra, Sacchetta & Calisher (1978) no litoral de SP, são atribuídas muitas epidemias de meningoencefalites em comunidades costeiras da região do Vale do Ribeira naquele estado, durante a década de 1970 (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). Apesar do programa de vigilância para circulação arboviral, conduzido na região desde a década 1960, entre 1975 e 1976 uma epidemia de encefalite com mais de 1000 casos registrados em 20 municípios paulistas da região foi posteriormente atribuída à infecção por ROCV (Iversson, 1977; Lopes *et al.*, 1978; Iversson, 1980; Iversson, 1994).

Após a epidemia de 1975, apesar da detecção de infecções sintomáticas por ROCV até o início da década de 1980 (Iversson, Coimbra, Travassos da Rosa & Monath, 1992), em 80 casos notificados de encefalite entre 1978 e 1983 a infecção por ROCV foi confirmada em apenas um (Iversson & Coimbra, 1984; Iversson, Travassos da Rosa & Rosa, 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 apenas 3% das amostras avaliadas, entretanto foi detectada evidência sorológica de infecção pelo *Alphavirus* VEEV em 19% das amostras (Romano-Lieber & Iversson, 2000). A circulação do *Alphavirus* no Vale do Ribeira durante o início da década de 1990 foi corroborada pela detecção de anticorpos anti-VEEV em soldados sintomáticos em treinamento na região (Iversson *et al.*, 1990).

Apesar do maior número de relatos na região sudeste, a soropositividade para ROCV também já foi reportada na BA, no nordeste brasileiro (Straatmann *et al.*, 1997). Apesar da classificação taxonômica ao grupo do vírus Ntaya como um isolado de ILHV (Fauquet *et al.*, 2005), a análise filogenética em recente caracterização genômica completa de ROCV revela que apesar da grande proximidade genética a ILHV, este vírus deve permanecer classificado a uma espécie viral distinta (Medeiros *et al.*, 2007).

O ciclo natural de transmissão do ROCV não é bem conhecido, contudo estudos ecológicos e experimentais sugerem que as aves silvestres constituem os principais hospedeiros vertebrados e que aves domésticas podem atuar como hospedeiros amplificadores. Durante a epidemia de 1975, a circulação em aves foi confirmada através de isolamento viral em um espécime silvestre identificado a *Zonotrichia capensis* (Muller, 1776), popularmente conhecido como tico-tico (Lopes, Coimbra, Sacchetta & Calisher, 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* (Vieillot, 1823), 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 disseminados a outras regiões com características ecológicas semelhantes (Tavares-Neto *et al.*, 1986; Iversson, 1994; Tavares-Neto *et al.*, 1996).

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 culicíneos identificados a *Psorophora ferox* Humboldt, 1819 coletados durante a epidemia de 1975 (Lopes *et al.*, 1981). A comprovação experimental da capacidade de infecção e transmissão de ROCV por culicíneos identificados a esta espécie e a *Aedes scapularis* (Rondani, 1848), associada às características biológicas da espécie *Aedes serratus* Theobald, 1901

e do sub-gênero *Culex (Melanoconion)* spp. as sugerem como potenciais vetores deste arbovírus em ambiente silvestre (Forattini *et al.*, 1978; Mitchell & Forattini, 1984; Mitchell, Forattini & Miller, 1986; Natal, Urbinatti & Marucci, 1998).

1.1.3.1.3 *Vírus Ilhéus (ILHV)*

Em 1944, durante investigação epidemiológica em área endêmica de febre amarela no nordeste do Brasil, a tentativa de isolamento viral de grupos de culicídeos compostos predominantemente pelas espécies *A. serratus* e *P. ferox* detectou a presença de um novo vírus neurotrópico. Além do isolamento viral, a detecção de soropositividade em trabalhadores locais e a demonstração experimental da capacidade de transmissão viral pelos culicídeos *A. serratus*, *Ps. ferox* e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) confirmaram a circulação na BA de um arbovírus ainda não previamente detectado, então denominado vírus Ilhéus (ILHV) (Laemmert & Hughes, 1947).

A manutenção de ILHV na natureza é atribuída ao ciclo silvestre envolvendo a espécie *Ps. ferox* como principal hospedeiro invertebrado (Turell *et al.*, 2005). Entretanto partículas virais identificadas a ILHV também já foram isoladas em espécimes identificados a *Psorophora albipes* Theobald, 1907 *Aedes fulvus* Wiedemann, 1828 e *Haemagogus leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 (Vasconcelos *et al.*, 1991). Fora do Brasil, espécimes identificados a *Aedes scapularis* (Rondani, 1848), *Aedes angustivittatus* Dyar & Knab, 1907, *Culex caudelli* Dyar & Knab, 1906, *Culex nigripalpus* Theobald, 1901, *Culex vomerifer* Komp, 1932, *Haemagogus capricornii* Lutz, 1904, *Psorophora lutzii* Theobald, 1901, *Sabethes chloropterus* Humboldt, 1819 e *Trichoprosopon* sp. foram relacionados à transmissão de ILHV na América Central. (Rodaniche & Galindo, 1957; Aitken, 1960; Rodaniche & Galindo, 1961; Galindo, 1963; Rodaniche & Galindo, 1963).

Com relação à metodologia sorológica a ser empregada para o diagnóstico da infecção por ILHV em hospedeiros vertebrados susceptíveis, o NT é o método mais indicado em virtude da possibilidade de reação cruzada com ROCV e com o vírus da encefalite japonesa (JEV) (Vasconcelos *et al.*, 1991).

Entre os hospedeiros vertebrados domésticos, a soropositividade para ILHV tem sido identificada principalmente em equinos (Travassos da Rosa, Travassos da Rosa, Pinheiro & Vasconcelos, 1997). A sorologia de 500 animais do Jockey Clube do Brasil na cidade do Rio de Janeiro realizada por Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo (1961) identificou soropositividade para ILHV em 34,8% das amostras avaliadas. 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, Silva, Travassos da Rosa & Barros, 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, sendo 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* (Linnaeus, 1758) e *Callithrix penicillata* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812) e em carnívoro identificado a *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) (Pereira *et al.*, 2001) conhecidos respectivamente como sagüi-de-tufo-branco, sagüi-de-tufo-preto e quati.

Provas sorológicas positivas e isolamento viral em humanos no Brasil também vêm sendo relatados, em arbovirologia realizada na Amazônia durante a década de 1950, partículas virais identificadas a ILHV foram detectadas em espécimes biológicos de animais sentinelas, mosquitos identificados a *Aedes* Meigen, 1818 e em indivíduos humanos sintomáticos (Causey, Causey, Maroja & Macedo, 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 soropositividade em espécimes biológicos de vertebrados seja comum após infecção pelo vírus (Cruz, 1994), um agente etiológico intimamente relacionado antigenicamente a ILHV foi detectado através de isolamento viral em espécimes biológicos de pacientes humanos sintomáticos e soronegativos para ILHV (Nassar *et al.*, 1997).

1.1.3.1.4 *Vírus da febre amarela (YFV)*

Antigenicamente classificado ao grupo B, YFV se mantém na natureza principalmente através de ciclos enzoóticos silvestres envolvendo hospedeiros invertebrados como vetores e reservatórios e primatas não-humanos como hospedeiros vertebrados susceptíveis. De acordo com a ecologia da doença são reconhecidas duas modalidades epidemiológicas da febre amarela, a silvestre e a urbana. Entre elas não existem diferenças etiológicas, clínicas e fisiopatológicas mas sim nos elementos que formam o ciclo de manutenção (Brasil, 1999). Atualmente, em virtude da expressiva diminuição do ciclo urbano, a febre amarela é essencialmente uma zoonose endêmica sazonal em florestas africanas e sul-americanas delimitadas pelo paralelo 12 das latitudes norte e sul (Brasil, 2004b).

Em ciclo silvestre os elementos envolvidos são primatas silvestres como hospedeiros vertebrados susceptíveis e culicídeos acrodendrofilicos como vetores e reservatórios do vírus amarílico, enquanto na modalidade urbana o homem é o hospedeiro vertebrado susceptível e culicídeos antropofílicos os vetores (Brasil, 2004b).

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 (Varma, 1985) e *Galago senegalensis* É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1796 no continente africano. Entre os primatas não-humanos neotropicais, espécies identificadas aos gêneros *Alouatta*, *Callithrix* e *Ateles* apresentam alta susceptibilidade ao vírus com coeficientes de letalidade elevados, enquanto *Cebus* spp. apresentam baixos coeficientes de letalidade e geralmente desenvolvem imunidade (Brasil, 1999).

Em relação aos hospedeiros invertebrados, apesar de relatos de Ixodida naturalmente infectados na África e a demonstração da capacidade vetorial destes aracnídeos experimentalmente infectados no Brasil (Aragão, 1936; Germain *et al.*, 1979), os insetos taxonomicamente classificados à ordem Diptera e família Culicidae apresentam maior relevância epidemiológica no ciclo de transmissão de YFV. As principais espécies envolvidas são *A. aegypti* em ciclo urbano e *Aedes africanus* Theobald, 1901 em ciclo silvestre no continente africano e *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921, *Haemagogus leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 e *S. chloropterus* em ciclo silvestre na América do Sul (Varma, 1985; Vasconcelos *et al.*, 2001b). Contudo, a espécimes identificados a outras espécies de culicídeos têm se atribuído competência

vetorial em ciclo de transmissão de YFV como *Aedes furcifer* Edwards, 1913, *Aedes luteocephalus* Newstead, 1907 e *Aedes simpsoni* Theobald, 1905 na África, *Haemagogus lucifer* Howard, Dyar & Knab, 1912, *Haemagogus equinus* Theobald, 1903, *Haemagogus spegazzinii* Brethes, 1912, *Haemagogus mesodentatus* Komp & Kumm, 1938 e *Anopheles neivai* Howard, Dyar & Knab, 1912 na América Central e *A. scapularis*, *Haemagogus albomaculatus* Theobald, 1903 e *Sabethes soperi* Lane & Cerqueira, 1942 na América do Sul (Smithburn, Haddow & Lumsden, 1949; Rodaniche, Galindo & Johnson, 1957; Rodaniche & Galindo, 1957; Travassos da Rosa, Vasconcelos, Hervé & Travassos da Rosa, 1984; OMS, 1985; Dégallier *et al.*, 1992; Vasconcelos *et al.*, 1997; Thonnon *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2001a; 2003). Espécimes identificados à espécie *S. soperi* são considerados importantes vetores no estado de Mato Grosso do Sul (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).

Atualmente restrito a alguns países africanos, a manutenção viral em ambiente urbano não é detectada no Brasil desde 1942, entretanto alguns casos isolados não autóctones vêm sendo esporadicamente reportados em cidades brasileiras (Filippis *et al.*, 2001; Brasil, 2008c). 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, 2007b).

Entre 2000 e 2004, foram reportados 3208 casos de febre amarela no mundo. Dos 2579 casos registrados no continente africano, mais da metade foi reportada em Guiné e Costa do Marfim. No mesmo período foram reportados 629 casos na América do Sul, sendo 385 notificados em Brasil e Colômbia. Em 2004, apesar do menor número de casos sul-americanos em relação a África, o coeficiente de letalidade da febre amarela na América do Sul foi de 47%, superando os 11% reportados no continente africano (OMS, 2005; 2005b; 2007).

Entre dezembro de 2007 a março de 2008 foram confirmados 38 casos com 20 evoluções a óbito por febre amarela silvestre no Brasil, no mesmo período foram reportadas epizootias em primatas não-humanos em mais de 250 municípios brasileiros, sendo 221 localizados no estado de Goiás e Distrito Federal (Brasil, 2008d). Há décadas a febre amarela é uma doença imunoprevenível no Brasil, entretanto apesar da disponibilidade vacinal, a partir da década de 1930 foram registrados até o final do século passado no país aproximadamente 2200 óbitos em decorrência da infecção por YFV (Benchimol, 2001).

1.1.3.1.5 *Vírus do oeste do Nilo (WNV)*

Desde sua introdução na América do Norte em 1999 foram reportados nos EUA, mais de 27500 casos humanos de infecção por WNV com mais de 1000 casos fatais. A epidemiologia naquele país revela que até o momento, aproximadamente 41% dos casos apresentam doença neuroinvasiva, forma mais grave da infecção manifestada principalmente por meningite e encefalite, 57% desenvolvem a Febre do Nilo, forma mais branda da doença sem acometimento neurológico e que 2% dos casos se manifestam através de sintomas inespecíficos como a paralisia flácida aguda (CDC, 2008).

Apesar de recente a detecção de casos autóctones no Novo Mundo, relatos de infecções mórbidas ou não, atribuídas ao WNV na África (Taylor *et al.*, 1956; Schmidt & Mansoury, 1963), Europa (Filipe & Pinto, 1969; Ernk *et al.*, 1971; Filipe, 1972) e Ásia (Bernkopf, Levine & Nerson, 1953; Pavri & Singh, 1965; Gaidamovich & Sokhey, 1973) ocorrem desde 1940, quando um então vírus neurotrópico desconhecido foi isolado de uma mulher no distrito de West Nile, uma província no nordeste de Uganda (Smithburn *et al.*, 1940). Recente pesquisa paleopatológica sugere que a infecção humana pelo WNV possa ser ainda mais antiga, de acordo com o estudo de descrições históricas, a encefalite por WNV pode ter sido a causa mortis do rei da Macedônia, Alexandre "o grande", em 323 a.C. (Marr & Calisher, 2003).

O conhecimento atual da ecologia do WNV sugere sua manutenção ambiental em ciclos enzoóticos envolvendo primariamente aves e mosquitos (Ben-Nathan *et al.*, 2006). Na natureza, a capacidade de perpetuação do vírus em condições climáticas adversas em clima temperado é atribuída à transmissão viral vertical e à sua capacidade de manutenção durante a diapausa do vetor (Kramer, Li & Shi, 2007). À semelhança da epidemia brasileira de ROCV ocorrida no sul de SP durante a década de 1970 (Iversson, 1977), um 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, Novaretti & Chamone, 2004).

Apesar da principal forma de infecção por WNV em seres humanos ocorrer através da hematofagia de culicídeos infectados, a transmissão viral entre os hospedeiros vertebrados sem o envolvimento de artrópodes também vem sendo descrita por via oral (Komar *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2003; Austgen *et al.*, 2004), transfusão de sangue (CDC, 2002c; CDC, 2007c), transplante de órgãos (Iwamoto *et al.*, 2003; CDC, 2005), amamentação (CDC, 2002d) e embora menos comum a transmissão intra-uterina (CDC, 2002b; Skupski *et al.*, 2006; Paisley *et al.*, 2006).

É descrito que cerca de 70% dos casos de infecção humana por WNV são assintomáticos (Mostashari *et al.*, 2001). Quando sintomática, a infecção se caracteriza pelo início súbito de um quadro clínico inespecífico normalmente envolvendo febre, astenia, cefaléia, artralgia e mialgia (Nash *et al.*, 2001; Petersen, Rhoerig & Hughes, 2002; Julian *et al.*, 2003). Entre os casos de infecção sintomática, reporta-se o acometimento do sistema nervoso central (SNC) em menos de 1% dos casos (Mostashari *et al.*, 2001; Kramer, Li & Shi, 2007). Entretanto, recentes epidemias ocorridas a partir de 1996 na Romênia, EUA e Israel demonstraram predomínio de manifestações neurológicas, com ocorrência de meningite em 16% a 40% dos pacientes hospitalizados (Julian *et al.*, 2003). Atualmente, em virtude dos casos de debilidade neurológica aguda, a infecção por WNV é considerada como diagnóstico diferencial em casos de paralisia flácida aguda (CDC, 2002a; Sejvar *et al.*, 2003; Julian *et al.*, 2003; Holman, Monserrate, Czander & Rushing, 2004).

Apesar de *Enterovirus* constituírem os principais agentes etiológicos identificados em meningite asséptica (Meqdam, Khalousi & Al-Shurman, 2002; Julian *et al.*, 2003; Da Silva, Azevedo & Costa, 2005; Santos *et al.*, 2006b), elevado número de casos de meningite viral sem etiologia definida é comumente reportado. Em alguns estados dos EUA, a pesquisa sorológica para WNV foi instituída como conduta clínica prioritária em casos de meningite asséptica idiopática, em decorrência da inespecificidade das manifestações clínicas de casos de meningite por WNV associada a necessidade de uma rápida detecção da circulação ambiental deste vírus (Julian *et al.*, 2003).

Em virtude do neurotropismo viral, o acometimento do SNC por WNV tem sido alvo de diversos estudos, entretanto apesar da reconhecida afecção de outros sistemas do organismo, estudos da patogênese viral em outros órgãos tem sido menos reportados. A patologia viral em hospedeiros vertebrados tem demonstrado que o tecido renal é um dos sítios replicativos de WNV. Roedores adultos experimentalmente infectados por WNV desenvolveram persistente virúria com excreção de vírus infectantes por mais de 50 dias (Komar *et al.*, 2003; Buckweitz *et al.*, 2003; Tonry *et al.*, 2005b). A presença de ácido ribonucléico viral já foi detectada em amostra de urina humana de um caso de infecção sintomática nos EUA, oito dias após o fim das manifestações clínicas (Tonry *et al.*, 2005a). Além do sistema urinário, relatos de infecção sintomática por WNV com acometimento do sistema digestório e manifestações hemorrágicas também vêm sendo reportados (Georges *et al.*, 1987; Paddock *et al.*, 2006).

Ainda não existe tratamento antiviral estabelecido para a encefalite causada por infecção por WNV. A imunoglobulina de pacientes previamente infectados utilizadas como terapia é

promissora e está sendo considerada em estudos prospectivos (Zeinad, Novaretti & Chamone, 2004).

Entre os animais, infecções mórvidas ou não, vêm sendo comumente relatadas em aves, répteis e mamíferos (Allison *et al.*, 2004; Julian *et al.*, 2003; Steinman *et al.*, 2003; Lichtensteiger *et al.*, 2003; Ølberg *et al.*, 2004). Epizootias por WNV em aves têm sido descritas principalmente em membros da família Corvidae (Julian *et al.*, 2003).

Em mamíferos, as epizootias causadas pelo WNV têm se mostrado mais graves em eqüinos, com muitos casos clínicos e as 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 eqüinos 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 eqüinos infectados apresenta sintomas (Phalen & Dahlhausen, 2004). Os cavalos sintomáticos 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 eqüinos, a doença nestes animais é imunoprevenível nos EUA desde 2002, quando foi licenciada pelo departamento de agricultura daquele país, uma vacina inativada para eqüinos (Connell, 2003).

Com relação aos hospedeiros invertebrados, responsáveis através da hematofagia pela principal forma de transmissão viral entre os vertebrados susceptíveis, vírus identificados a WNV foram isolados em mais de 40 espécies de culicídeos e também em algumas espécies de ixodídeos e argasídeos (Lawrie *et al.*, 2004).

Os vetores de maior relevância no ciclo de transmissão de WNV são culicídeos identificados a *Culex* Linnaeus, 1758 (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 1850 grupos específicos de mais de 32000 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 300000 culicídeos divididos por espécie em aproximadamente 10000 grupos detectou a presença de ácido nucléico viral em 363 grupos identificados a *Psorophora*, *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus* e *Culex*. Entretanto, dos 5836 grupos identificados a *Culex* submetidos à PCR, a presença de ácido

nucléico viral foi detectada em aproximadamente 5,8%, enquanto dos 2345 grupos identificados aos outros gêneros, a positividade foi detectada em aproximadamente 0,9%. (White *et al.*, 2001). Entre as espécies de *Culex* mais frequentemente identificadas em presença de WNV, estão *Culex pipiens* Linnaeus, 1758, *Culex restuans* Theobald, 1901e *Culex salinarius* Coquillett, 1904 (Andreadis, Anderson & Vossbrinck, 2001; White *et al.*, 2001; Nasci *et al.*, 2001).

Até recentemente o vírus encontrava-se geograficamente distribuído pela África, região central e sudeste da Ásia, Oceania, sudeste europeu, América do Norte e Central (Garcia-Tapia *et al.*, 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.*, 2003; Quirin *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2005; Morales-Betoulle *et al.*, 2006; Pupo *et al.*, 2006; Komar & Clark, 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). No ano seguinte, partículas virais identificadas a WNV foram isoladas de equinos sintomáticos na Argentina (Morales *et al.*, 2006), sendo este o primeiro isolamento viral na América do Sul (Morales-Betoulle *et al.*, 2006). Ainda na Argentina, a análise de amostras de soro sanguíneo de aves capturadas em três províncias entre 2004 e 2006, detectou soropositividade para WNV através do teste de neutralização por redução de placas ou *Plaque Reduction Neutralization Assay* (PRNT) em 12 famílias desta classe de hospedeiro (Diaz *et al.*, 2008). Em 2007, a detecção de soropositividade para WNV em aves e equinos residentes na Venezuela, instila o estabelecimento do vírus na América do Sul (Bosch *et al.*, 2007).

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 no estado do Rio Grande do Sul (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 (RN) foram avaliados mais de 700 espécimes de aves identificadas a 23 espécies, sendo 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 invernada de aves migratórias no país, um segundo inquérito sorológico foi realizado em amostras de 172 espécimes de aves identificadas a 19 espécies (Brasil, 2004d). Até o momento, a presença ou vestígios da circulação

pregressa de WNV não foram detectados em mais de 1300 espécimes biológicos de aves analisados em território brasileiro.

1.1.3.2 *Togaviridae*

Os vírus taxonomicamente identificados à família *Togaviridae* e aos gêneros *Alphavirus* e *Rubivirus* são partículas esféricas envelopadas de 40 a 70 nm de diâmetro que apresentam genoma não segmentado contendo uma única molécula RNA de fita simples de polaridade positiva, envolvida por um único tipo de proteína de capsídeo (Ackermann & Bertheaume, 1995; O'guinn *et al.*, 2004; Fauquet *et al.*, 2005). Na arbovirologia, como não são conhecidos hospedeiros invertebrados para *Rubivirus*, o *Alphavirus* é considerado o gênero de maior relevância na família (Doanne, 1987; Manoth, 1988).

Na Amazônia brasileira, entre 1954 e 1994, foram isolados pelo IEC, vírus identificados à família *Togaviridae*, em amostras de culicídeos, mamíferos silvestres e domésticos, aves e homem (Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

Devido às características encefalitogênicas, os togavirídeos WEEV, EEEV, VEEV, MAYV, MUCV e vírus Pixuna ou *Pixuna virus* (PIXV) são os *Alphavirus* de maior interesse no estudo das arboviroses no Brasil e estão sorologicamente classificados ao grupo A (Vasconcelos *et al.*, 1991).

1.1.3.2.1 *Vírus Mayaro* (MAYV)

Desde que foi isolado em 1954 quase simultaneamente em Trinidad e Brasil, a infecção por MAYV tem se atribuído epidemias principalmente na região amazônica (Casals & Whitman, 1957; Anderson *et al.*, 1957; Causey & Maroja, 1957; Causey & Causey, 1962; Manoth, 1988; Talarmin *et al.*, 1998). Até o momento, não há registros de circulação de MAYV fora do continente americano (Vasconcelos *et al.*, 1991). Entre 1995 e 1998 na região de Iquitos na Amazônia peruana foram confirmados através de sorologia e isolamento viral, pela primeira vez naquele país, 27 casos de doença humana atribuída à infecção por MAYV (Tesh *et al.*, 1999).

Embora um maior número de casos seja reportado na região amazônica, a detecção de soropositividade autóctone nos estados brasileiros de Goiás (GO) e Mato Grosso (MT) propõe a circulação viral na Região Centro-Oeste do Brasil (Neel *et al.*, 1968; Vasconcelos *et al.*, 1998). Em 2000, foram detectados três casos de infecção humana sintomática por MAYV em SP.

Entretanto, o histórico comum aos três casos de viagem recente ao município de Camapuã em MS suscita as infecções e conseqüentemente circulação de MAYV àquele estado referindo os casos de SP como não autóctones (Coimbra *et al.*, 2007).

Quando sintomática, a infecção humana por MAYV se manifesta em quadro clínico composto principalmente por artralgia intensa, em especial das articulações radiocarpal, talocrural e interfalângicas. Em alguns casos, os sintomas podem persistir por dois ou mais meses com períodos alternados de maior ou menor intensidade. Além da artralgia, em muitos casos são reportados exantemas do tipo máculopapular, localizados mais freqüentemente no tronco, membros superiores e inferiores (Pinheiro, Travassos da Rosa & Travassos da Rosa, 1983; Travassos da Rosa, Travassos da Rosa, Pinheiro & Vasconcelos, 1997).

Entre os animais silvestres, a presença de imunoglobulinas anti-MAYV vem sendo detectada em espécimes de diversas ordens de mamíferos na Guiana Francesa, sendo a Primata, a que apresentou maior soroprevalência (Thoisy *et al.*, 2003). Em estudo realizado com primatas daquele país, a sorologia de 106 espécimes identificados a *Alouatta seniculus* (Linnaeus, 1766), popularmente conhecido como guariba detectou soropositividade em 70 indivíduos, o que corresponde a 66% das amostras avaliadas (Talarmin *et al.*, 1998). Além dos mamíferos, o isolamento de MAYV em ave migratória capturada no estado da Louisiana, nos EUA em 1967 confirma a circulação viral também nesta classe de vertebrados (Calisher *et al.*, 1974).

Entre os hospedeiros invertebrados, apesar de partículas virais identificadas a MAYV terem sido isoladas de culicídeos identificados a *Sabethes* sp. e *Mansonia venezuelensis* (Theobald, 1912) e que experimentalmente foi demonstrado que *Ae. aegypti* é capaz de transmitir o vírus (Aitken & Anderson, 1959; Aitken, 1960; Aitken *et al.*, 1960; Vasconcelos *et al.*, 1991), as espécies de *Haemagogus* são consideradas os principais vetores deste arbovírus (Causey, 1962). A capacidade de este *Alphavirus* infectar várias espécies de culicídeos, associada à diversa entomofauna da região amazônica, justificam uma preocupação quanto a uma possível circulação do vírus, em áreas urbanas daquela região (Tesh *et al.*, 1999).

1.1.3.2.2 *Vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV)*

A infecção sintomática por EEEV é reportada desde o século 19 (Hanson, 1957). Na década de 1930, à infecção pelo vírus foi atribuída a epizootia de encefalite eqüina no estado da Califórnia e a encefalite humana no estado de Massachusetts nos EUA (Meyer, Haring & Howitt, 1931; Meyer, 1932; Larcell, Hering & Meyer, 1934; Fothergill, Dingle, Farber & Connerley, 1938; Webster & Wright, 1938; Feemster, 1938). Desde então relatos de infecção eqüina e humana são reportados na América do Norte, Central e do Sul (Eklund, Bell & Brennan, 1951; Hanson, Scott, Ferris & Upton, 1954; Spence, Downs & Aitken, 1961). A epidemiologia do EEEV na América do Sul não é muito conhecida e casos clínicos em eqüinos e principalmente em humanos não são reportados com frequência. (Scott *et al.*, 1989).

No Brasil, uma avaliação sorológica realizada na década de 1960 com 194 moradores do então estado da Guanabara identificou soropositividade para EEEV em 5,6% dos indivíduos (Bruno-Lobo, Bruno-Lobo & Travassos, 1961). Em outro inquérito sorológico, desta vez realizado na Região Norte do país, anticorpos inibidores de hemaglutinação por EEEV foram identificados em 9% das pessoas analisadas (Causey, Shope, Suttmoller & Laemmert, 1962).

Em animais domésticos a detecção de anticorpos neutralizantes para EEEV tem sido relatada principalmente em eqüinos e suínos (Feemster *et al.*, 1958; Hetrick, Yancey, Hansen & Byrne, 1960; Scott, Olson, All, Gibs, 1988; Elvinger *et al.*, 1994; Elvinger *et al.*, 1996; Fernández, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol, 2000). No Brasil, relatos de soropositividade e isolamento viral em eqüinos acontecem desde a década de 1940 (Lennete & Fox, 1943; Carneiro, 1946; Cunha, Ribeiro & Passos, 1948) quando o então Instituto de Biologia Animal do Ministério da Saúde iniciou a distribuição e aconselhou o uso de uma vacina inativada monovalente (Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo, 1961).

Em 1943, foi reportado em diversos estados do nordeste brasileiro um alarmante número de casos de “mal de roda” em eqüinos da região. Assim denominada pela população local, em virtude dos sintomas neurológicos observados nos animais, a esta epizootia eqüina de grandes proporções foi atribuída à infecção por EEEV (Cunha, 1943). Na década de 1960, casos de eqüinos apresentando os mesmos sintomas foram reportados no município de Bragança no PA. O estudo desta epizootia detectou 69% de soropositividade e 5% de letalidade entre os eqüinos. Além da presença de anticorpos, foram isolados vírus a partir de grupos de artrópodes e de cavalos jovens (Causey, Shope, Suttmoller & Laemmert, 1962). Concomitantemente à detecção de EEEV na Região Norte, a presença de anticorpos anti-EEEV foi detectada em 10% dos eqüinos

assintomáticos avaliados no estado do Rio de Janeiro (RJ) (Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo, 1961).

Em 1993 e 2000, EEEV foi identificado como o agente etiológico de casos clínicos de encefalite eqüina em MS e PR respectivamente (Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros, 1993; Fernández, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol, 2000). Entre os hospedeiros vertebrados silvestres, a circulação de EEEV tem sido detectada principalmente em aves e mamíferos (Gottdenker, Howerth & Mead, 2003; Schmitt *et al.*, 2007). O estudo da dinâmica de transmissão de EEEV através da interação entre artrópodes vetores e populações de aves hospedeiras atribui às aves jovens, a deflagração e manutenção de surtos enzoóticos por EEEV (Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff, 2002; Unnasch *et al.*, 2006). Em sorologia realizada em aves aquáticas capturadas no estado da Florida nos EUA, a presença de imunoglobulinas anti-EEEV foi detectada principalmente em ciconiiformes, como *Casmerodius albus* (Linnaeus, 1758) e *Ajaia ajaia* (Linnaeus, 1758) (Spalding, McLean, Burgess & Kirk, 1994), respectivamente conhecidas como garça-branca e colhereiro.

No Brasil, durante a epizootia eqüina atribuída a EEEV ocorrida no PA na década de 1960, moradores da região relataram a morte de um grande número de espécimes identificados a *Crotophaga ani* Linnaeus, 1758, popularmente conhecido como anu-preto, inculindo a circulação do vírus também nesta espécie (Causey, Shope, Suttmoller & Laemmert, 1962). Na mesma década, a realização de estudos para o entendimento da relevância das aves silvestres na epidemiologia das arboviroses na Amazônia brasileira detectou através de isolamento viral, vírus identificados a EEEV em espécimes identificados a diversas espécies, entre elas *Ramphocelus carbo* (Pallas, 1764) e *Cacicus cela* (Linnaeus, 1758), respectivamente conhecidas como bico-de-prata e japim. Alguns anos mais tarde, a detecção da circulação viral em 4% dos espécimes identificados a *Thamnophilus aethiops* Sclater, 1858, sugere a espécie popularmente conhecida como choca, como hospedeiro de maior relevância no ciclo de manutenção e disseminação de EEEV na Amazônia brasileira (Shope, Causey, Andrade & Theiler, 1964; Vasconcelos *et al.*, 1998).

Na Região Sudeste, em um inquérito sorológico realizado em aves silvestres capturadas no sul de SP, a presença de imunoglobulinas anti-EEEV foi detectada em 14 espécies taxonomicamente distribuídas em dez famílias (Ferreira *et al.*, 1994). Além das aves a circulação viral também vem sendo detectada em mamíferos silvestres de médio e pequeno porte e em répteis (Vasconcelos *et al.*, 1991; Nolen-Walston *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2007). Em estudo realizado no estado da Florida nos EUA, a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação

por EEEV foi identificada em 9% destes animais estudados. À exceção do marsupial *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, popularmente conhecido como gambá, os animais sororreativos pertenciam à ordem Rodentia e foram identificados às espécies *Peromyscus gossypinus* (LeConte, 1853), *Sigmodon hispidus* Say & Ord, 1825 e *Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788 e (Day *et al.*, 1996), respectivamente conhecidas como camundongo e rato do algodão e esquilo. No Brasil, pesquisas realizadas em SP entre 1969 e 1971 detectaram através de isolamento viral a presença de EEEV também em marsupiais, roedores identificados a *Oryzomys spp.* e aves silvestres residentes (Lopes & Sacchetta, 1974).

Com relação aos hospedeiros invertebrados, algumas espécies de culicídeos têm sido reportadas em presença de EEEV. Na América do Norte, a transmissão do vírus entre aves em áreas alagadas vem sendo atribuída a espécimes identificados à espécie *Culiseta melanura* (Morris, 1988; Scott & Weaver, 1989). Estudos realizados na América Central e do Sul têm demonstrado que a presença viral em grupos de culicídeos têm sido detectada em poucas espécies de cada região. Em um trabalho realizado na Amazônia peruana onde se pesquisou presença do vírus em mais de 530000 espécimes de culicídeos, EEEV apresentou uma significativa associação com a espécie de culicídeo *Culex (Melanoconion) pedroi* Sirivanakarn & Belkin, 1980, sendo 87% dos isolamentos de EEEV ocorridos nesta única espécie (Turell *et al.*, 2005). Na ilha caribenha de Trinidad, o vírus foi isolado apenas em espécimes de *C. nigripalpus* (Downs, Aitken & Spence, 1959). Em território brasileiro, apesar do isolamento viral em espécimes identificados a *Aedes taeniorhynchus* Wiedemann, 1821, *Aedes fulvus* Wiedemann, 1828, *Culex (Melanoconion) spissipes* Theobald, 1903, *Culex (Melanoconion) sp.* e *Mansonia (Mansonia) sp.*, à semelhança do observado na Amazônia peruana, a espécie *C. (Melanoconion) pedroi* foi reconhecida como principal vetor enzoótico de EEEV no país. Mais de 50% dos isolamentos de EEEV realizados a partir de grupos de artrópodes na Amazônia brasileira ocorreram em espécimes identificados a esta espécie (Causey, Shope, Suttmoller & Laemmert, 1962; Vasconcelos *et al.*, 1991).

Em meados da década de 1990, o estudo evolutivo de EEEV revelou a presença de três principais grupos monofiléticos, sendo um norte-americano e dois sul-americanos (Weaver *et al.*, 1994). Em 1999, novas análises filogenéticas de seqüenciamentos nucleotídicos de amostras destas variedades identificaram um grupo norte-americano e três Centro/Sul-americanos, sendo um destes, isolado unicamente no estado do Ceará (CE), na costa brasileira. A infecção humana pelo grupo norte-americano apresenta altas taxas de mortalidade, o que não ocorre na América Central e do Sul (Brault *et al.*, 1999). Apesar dos ciclos de transmissão das variedades antigênicas

de EEEV da América do Norte e da América do Sul diferir consideravelmente, a variedade sul-americana já foi isolada de ave migratória na América do Norte (Calisher *et al.*, 1971).

1.1.3.2.3 *Vírus da encefalite eqüina venezuelana* (VEEV)

Desde que foi isolado por Kubés & Rios (1938), o VEEV tem sido relacionado a diversas epidemias e epizootias, principalmente em eqüinos, ocorridas na Colômbia, Venezuela, Trinidad, Equador, México, EUA e Peru (Rivas *et al.*, 1997; Aguilar *et al.*, 2004). O VEEV se caracteriza por apresentar populações enzoóticas alopátricas, onde não há sobreposição da ocorrência de genótipos distintos em uma mesma área geográfica. Contudo existem relatos de subtipos virais simpátricos, como a coexistência dos subtipos III e IV no nordeste brasileiro e os subtipos ID e III coexistindo em uma pequena área próxima a Iquitos no Peru (Young & Johnson, 1969; Scherer & Chin, 1983). Em 1982, na Região Sudeste do Brasil uma variante do subtipo I foi isolada em culicídeos identificados ao gênero *Culex* e em espécime de morcego frugívoro identificado a *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758). De acordo com as características biológicas, sorológicas e bioquímicas avaliadas, este isolado foi considerado uma nova variante enzoótica do VEEV subtipo I, sendo classificada como IF (Calisher *et al.*, 1982).

Na década de 1990 na região do Vale do Ribeira em SP no Brasil, epidemia de doença febril com cefaléia, fraqueza, diarreia e sonolência acometeu 25 soldados que haviam realizado treinamento na região, em seis deles foram identificados anticorpos contra o novo subtipo IF (Iversson *et al.*, 1990). Em um outro surto de doença febril ocorrido em 1994 em soldados das Forças Armadas Peruanas, localizados na região amazônica daquele país, foi isolado VEEV subtipo I variedade ID, sendo este o primeiro relato de doença humana causada por esta variedade de vírus no Peru (Watts *et al.*, 1997). No ano seguinte, o mesmo grupo de estudo identificou a mesma variedade viral através de isolamento e sorologia em 18 habitantes da cidade peruana de Iquitos, na Bacia Amazônica (Watts *et al.*, 1998). Em 1995 em uma região abrangendo território venezuelano e colombiano, estima-se que um dos maiores surtos epidêmicos causados por VEEV já descritos tenha envolvido aproximadamente 100 mil pessoas (Weaver *et al.*, 1996).

Entre os animais silvestres, a circulação viral tem sido reportada principalmente em pequenos mamíferos identificados às ordens Lagomorpha e Chiroptera (Aguirre, McLean, Cook & Quan, 1992; Ubico & McLean, 1995).

Os vírus MUCV e PIXV, apesar de intimamente relacionados antigenicamente com VEEV, podem ser diferenciados entre si por HI, CF e NT e por isso são taxonomicamente

reconhecidos como espécies virais (Shope, Causey, Andrade & Theiler, 1964; Fauquet *et al.*, 2005). Na natureza, MUCV é mantido em ciclo silvestre onde roedores, especialmente *Oryzomys capito* (Olfers, 1818), são os principais hospedeiros vertebrados. Apesar do pouco conhecimento a respeito dos hospedeiros envolvidos no ciclo enzoótico de PIXV na Amazônia brasileira, uma vez que não há relatos de atividade viral desde a década de 1960, vírus identificados a esta espécie viral foram isolados de grupos de culicídeos identificados a *Trichoprosopon digitatus* Rondani, 1848 e de roedores silvestres identificados a *Proechimys guyannensis* (Vasconcelos *et al.*, 1991).

Em relação aos hospedeiros invertebrados, VEEV foi descrito em espécimes identificados a várias espécies de culicídeos em diversos países, como *A. serratus* no Brasil (Causey, Causey, Maroja & Macedo, 1961), *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 na Colômbia (Sanmartin-Barberi, Groot & Osorno-Mesa, 1954), *P. ferox* em Trinidad (Downs, Spence & Aitken, 1962) e *Mansonia titillans* Walker, 1848 no Equador (Levi-Castillo, 1952). Na região amazônica, embora VEEV tenha sido isolado de quatro espécies de *Culex (Melanoconion)* Theobald, 1903, dos 25 isolados, 14 os foram na recém descoberta espécie *Culex (Melanoconion) gnomatos* Mureb Sallum, Sa Gomes Hutchings & Leila, 1997 sugerindo ser este o principal culicídeo vetor na região (Turell *et al.*, 2005).

1.1.3.2.4 Vírus da encefalite eqüina do oeste (WEEV)

Apesar de casos de infecção humana sintomática por WEEV no Velho Mundo, relatos de epidemias e epizootias, principalmente em eqüinos, são reportados nas Américas desde 1930 (Howitt, 1939; Danes & Kimerlingova, 1958; Dillenberg, 1965; Morgante, Vance, Shemanchuk & Windsor, 1968; Sabbatini *et al.*, 1985; Ayers, Lester & Angulo, 1994).

As aves silvestres são consideradas os principais hospedeiros de WEEV. Na Amazônia brasileira mais de 28 espécies apresentam taxa média de infecção pelo vírus acima de 5%, sugerindo relevante participação do grupo no ciclo enzoótico do vírus. Um estudo realizado em espécimes identificados a *Pithys albifrons* (Linnaeus, 1766), popularmente conhecidos como papa-formiga-de-topete, detectou soropositividade em 57% dos animais avaliados, sugerindo relevância epizootiológica da espécie na manutenção viral no ambiente (Vasconcelos *et al.*, 1991). Um programa de vigilância epidemiológica para a circulação de arbovírus realizado durante 12 anos em região de Mata Atlântica em SP identificou em mais de 39 mil espécimes de aves silvestres estudadas, anticorpos monotípicos para WEEV em apenas um único espécime de *Zonotrichia capensis* (Muller, 1776), fringilídeo não migratório popularmente conhecido como

tico-tico (Ferreira *et al.*, 1994). Além das aves, a soropositividade para WEEV já foi reportada em répteis, anfíbios e em mamíferos silvestres (Spalatin, Connell, Burton & Gollop, 1964; Trainer & Hoff, 1971; Aguirre, McLean, Cook & Quan, 1992).

Casos clínicos humanos associados à infecção por WEEV têm sido raros na América do Sul e Central, onde inquéritos sorológicos indicam também uma baixa prevalência de infecção (Vasconcelos *et al.*, 1991). Entretanto no início da década de 1960, um inquérito sorológico realizado com 194 moradores da cidade do Rio de Janeiro identificou soropositividade para WEEV em 22,6% das amostras analisadas (Bruno-Lobo, Bruno-Lobo & Travassos, 1961). No mesmo ano e cidade, a sorologia realizada em trabalhadores do Jockey Clube do Brasil, identificou soropositividade para WEEV em 15% das amostras (Bruno-Lobo *et al.*, 1961).

Em relação aos eqüinos, em outro estudo também realizado no Jockey Clube do Brasil, a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação por WEEV foi detectada em 11,4% dos animais avaliados, sendo este o primeiro registro de infecção por WEEV em cavalos realizado no país (Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo, 1961). No mesmo ano, o isolamento de WEEV em tecido celular de um eqüino que veio a óbito com sintomas de encefalomielite confirmou a circulação do vírus em eqüinos no Brasil (Bruno-Lobo *et al.*, 1961). No início da década de 1990, um trabalho realizado no Pantanal Sul Mato Grossense detectou a presença de anticorpos anti-WEEV em apenas 1,2% dos eqüinos estudados, a soroprevalência mais baixa entre os arbovírus pesquisados naquele estudo (Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros, 1993).

Entre os principais artrópodes vetores de WEEV, o culicíneo *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 é considerado a espécie de maior relevância na transmissão do vírus em território norte-americano (Forattini, 1965). Entretanto, outras espécies como *Aedes vexans* (Meigen, 1830), *Aedes infirmatus* Dyar & Knab, 1906, *A. taeniorhynchus*, *C. pipiens* e *C. restuans* também têm sido identificadas em presença de WEEV em continente americano (Norris, 1946; Burroughs & Burroughs, 1954; Kissling *et al.*, 1955; Chamberlain *et al.*, 1958; Henderson *et al.*, 1962). Na América do Sul, os artrópodes vetores de WEEV são desconhecidos (Vasconcelos *et al.*, 1991).

1.1.4 Estudos sobre arbovírus em eqüinos no Brasil

Assim como em humanos, casos de infecção sub-clínica por arbovírus são freqüentes em animais domésticos, contudo sua identificação normalmente só ocorre durante epizootias, casos isolados raramente são diagnosticados. Entre os animais domésticos, encefalites virais ocorrem principalmente em eqüinos e normalmente pelos mesmos agentes encefalitogênicos que causam a síndrome no homem, contudo a gravidade dos sintomas varia conforme a espécie hospedeira (Brés, 1988).

Em território brasileiro, entre as espécies virais de maior relevância em sanidade eqüina estão o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), causador da anemia infecciosa eqüina (AIE), (Silva, Abreu & Barros, 2001; Bicout *et al.*, 2006) e os vírus responsáveis pelas encefalomyelites virais. O primeiro inquérito sorológico realizado com eqüinos para pesquisa da circulação de vírus da encefalite eqüina realizado no Brasil foi feito por Lennete & Fox (1943), que detectaram, através de sorologia, a presença de anticorpos anti- EEEV em eqüinos do estado de Minas Gerais (MG) após uma epizootia de encefalite eqüina (Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo, 1961). Desde então diversas pesquisas para arbovírus em eqüinos foram desenvolvidas no Brasil, principalmente através de inquéritos sorológicos, como Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo (1961), Bruno-Lobo *et al.* (1961), Causey, Shope, Suttmoller & Laemmert (1962), Shope, Causey, Andrade & Theiler (1964), Lopes & Sacchetta (1974), Figueiredo, Travassos da Rosa & Fiorillo (1986) e Vaconcelos *et al.* (1991).

Entre os trabalhos mais recentes envolvendo arbovirologia em eqüinos brasileiros, estão Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros (1993) em inquérito sorológico realizado em animais do Pantanal Sul Mato Grossense e Fernández, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol (2000) durante epizootia de encefalite eqüina no PR.

1.2 PANTANAL BRASILEIRO

1.2.1 Aspectos gerais

Declarado pela Organização Educacional, Científica e Cultural das Nações Unidas (UNESCO) como Herança Natural Mundial, título consagrado às áreas de valor universal excepcional (UNESCO, 2000), o Pantanal é uma vasta planície sedimentar de aproximadamente 140 000 km² 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 (Bertelli, 1988; Ravazzani, 1990; Mazza *et al.*, 1994; 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, 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 em MT e 65,5% em MS (Figura 1.1) (Alho *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 2000).

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, fitofisionomias 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% (Foto 1.1 e 1.2), Aquidauana (MS) 3,62%, Miranda (MS) 3,17%, Abobral (MS) 2,05%, Porto Murtinho (MS) 2,78% e Nabileque (MS) 9,61% (Figura 1.2) (Adamoli, 1982; Pott & Pott, 1994; Silva & Abdon, 1998; Brasil, 2008b). 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 Köppen, 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 (Britski *et al.*, 1999; Soriano, 1999; Soriano & Galdino, 2002). A precipitação anual das chuvas chega a 1500 milímetros concentrados nos meses de verão, sobretudo janeiro e fevereiro (Ravazzani, 1990).

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, 1990). Diversos estudos têm demonstrado variações quantitativas e/ou qualitativas das populações de seres vivos que habitam o Pantanal de acordo com o ciclo das águas na região. Essas observações já foram feitas em animais invertebrados (Barros, 2001; Martins *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2006), vertebrados (Ragusa-Netto, 2004; Lopes, Brito, Henrique-Silva & Del Lama, 2006) e plantas (Haase, 1999).

Com relação à vegetação, a baixa declividade na região dificulta o escoamento das águas que em combinação com mesorelevo origina ambientes característicos, associados à vegetação em mosaico, como as “cordilheiras” com vegetação arbórea mais densa. A vegetação pantaneira incorpora também elementos das províncias fitogeográficas adjacentes, como o Cerrado a leste, florestas semidecíduas relacionadas com a Amazônia a nordeste e a floresta chaquenha seca a sudoeste da região. De acordo com os aspectos fitofisionômicos foram identificadas 16 classes de vegetação no Pantanal estando entre as principais o campo, cerradão, cerrado, brejo, mata semidecídua, mata de galeria e baceiro (Silva, Mauro, Mourão & Coutinho, 2000). As áreas permanentemente alagadas, periodicamente alagáveis e eventualmente alagáveis formam unidades ecológicas distintas na paisagem pantaneira (Nogueira, Couto & Bernardi, 2002). A essa pluralidade ecológica são atribuídas a grande diversidade e produtividade biológica da região (Saldanha & Werneck, 1998; Britski *et al.*, 1999).

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 a 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 1 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 extensivamente, em sistemas onde predominam as fases de cria e recria (Rosa & Melo, 1995). Atribui-se a isso a atual estrutura fundiária do Pantanal, caracterizada por grandes propriedades. Uma das maiores fazendas pantaneiras localizada na Sub-região do Nabileque no Pantanal Sul Mato Grossense possui uma área de 155000 hectares (Rosa & Melo, 1995). Embora apenas 12% das propriedades pantaneiras têm área igual ou superior a 10000 hectares, juntas abrangem 56% da área total do Pantanal. Propriedades com áreas de 1000 a 10000 hectares representam 69% das fazendas e abrangem 43% da área total (Cadavid Garcia, 1986).

1.2.2 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, Azevedo-Junior & Lyra-Neves, 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 no estado do Pernambuco (PE) e o Pantanal em MT e MS (Sick, 1983; Sick, 1997; Azevedo *et al.*, 2001; Brasil, 2003; Telino-Junior, Azevedo-Junior & Lyra-Neves, 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 (Secchin, 1985; Ravazzani *et al.*, 1990). Em recente revisão e atualização da listagem de espécies registradas na região foi reportada a ocorrência de espécimes identificados a 470 espécies sendo 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* Vieillot, 1816 e *Pandion haliaetus* (Linnaeus, 1758), respectivamente conhecidas como marreca-carijó e águia pesqueira, 24 migrantes de longa distância meridionais, oriundas do extremo sul da América

do Sul como *Anas versicolor* Vieillot, 1816 e *Callonetta leucophrys* (Vieillot, 1816), 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* (Linnaeus, 1758) e *Mycteria americana* Linnaeus, 1758, respectivamente conhecidas como garçavaqueira e cabeça-seca e 41 oriundas de deslocamentos regionais dentro do Brasil como *Myiozetetes cayanensis* (Linnaeus, 1766), *Rynchops niger* Linnaeus, 1758 e *Himantopus melanurus* Vieillot, 1817 (Nunes & Tomás, 2004), respectivamente conhecidas como bentevizinho, talha-mar e pernilongo (Foto 1.3 e 1.4).

1.2.3 Fauna culicidiana

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 *M. titillans*, *C. nigripalpus*, *Aedeomyia squamipennis* Lynch Arribalzaga, 1878 e *Psorophora albigena* Peryassu, 1908 foram respectivamente as mais frequentes e reagiram para todos os anti-soros utilizados, demonstrando ecletismo alimentar. Os anofelinos identificados neste estudo, *Anopheles albitarsis* Lynch Arribalzaga, 1878, *Anopheles mattogrossensis* Lutz & Neiva, 1911 e *Anopheles triannulatus* Neiva & Pinto, 1922 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 *A. squamipennis*, *C. nigripalpus*, *C. (Melanoconion) spp.* *Mansonia indubitans* Dyar & Shannon, 1925, *M. titillans* e *P. 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 *C. nigripalpus* favorece a veiculação de arbovírus entre aves silvestres, mamíferos domésticos e o homem (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). À exceção de

Aedeomyia Theobald, 1901, todos os outros gêneros supracitados já foram relacionados, mediante comprovação de infecção natural ou evidências epidemiológicas, à transmissão de arbovírus (Forattini, 1965).

1.2.4 **Cavalo Pantaneiro**

No Pantanal estima-se que convivam cerca de 120 mil eqüinos (Santos *et al.*, 1995) e mais três milhões de bovinos distribuídos em mais de mil fazendas que variam entre 1000 a 25000 hectares (Cadavid Garcia, 1986; Seidl *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2005).

O Cavalo Pantaneiro 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 (Foto 1.5) (Serenó, Santos, Zúccari & Mazza, 1996; Miserani *et al.*, 2002). Entretanto, em virtude de sua desvalorização e conseqüente miscigenação indiscriminada com outras raças a que foram submetidos nas últimas décadas, estima-se que atualmente apenas 2% da tropa pantaneira apresentem os padrões peculiares à raça e conseqüentemente registro à Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros (ABCCP) (Santos *et al.*, 2005).

As práticas de manejo do rebanho eqüino 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 bovinos em pastagens nativas (Foto 1.6) (Santos, Silva & Mauro, 1993). Devido à riqueza genética e risco iminente de diluição racial, o Centro de Pesquisas do Pantanal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pantanal) iniciou em 1988, trabalhos de conservação e melhoramento do Cavalo Pantaneiro, através de pesquisas em reprodução, nutrição, sanidade, genética, seleção e fisiologia de exercício (Serenó, Melo, Henry & Cassali, 1996).

O comprometimento muitas vezes irreversível ocasionado por doenças como a AIE em eqüinos pantaneiros apresenta relevância não só sanitária mas também econômica para a planície (Silva, Abreu & Barros, 2001). Atualmente, considera-se que cerca de 50% dos eqüinos de serviço do Pantanal são portadores do EIAV (Silva *et al.*, 2004). Até o momento não se conhece terapia efetiva para a doença e o tratamento de apoio tem sido considerado como única medida terapêutica em casos de infecção sintomática por EIAV (Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff,

2002). De acordo com a legislação brasileira aos animais comprovadamente soropositivos para AIE, preconiza-se o sacrifício ou isolamento em áreas de alto risco, a que se enquadra o Pantanal (Brasil, 2004a). A utilização do sacrifício como única medida sanitária para controle de AIE comprometeria significativamente ou mesmo inviabilizaria a pecuária extensiva, característica da região (Silva, Abreu & Barros, 2001).

Entre os sinais e sintomas clínicos da doença estão a desorientação, depressão, perda de peso, hipertermia e em alguns casos encefalite (McClure *et al.*, 1982; Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff, 2002). A inespecificidade dos sinais e sintomas clínicos dificulta um possível diagnóstico em ausência de complementação laboratorial, uma vez que estas manifestações podem ser observadas em diversas outras enfermidades de origem parasitária ou infecciosa, como a tripanossomíase equina (Dávila, Souza, Campos & Silva, 1999; Silva, Sanchez & D'avila, 2003), encefalites virais (Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff, 2002) e as intoxicações por micotoxinas, que apesar de incomum na maioria das fazendas pantaneiras devido a equinocultura extensiva em pasto nativo, pode acontecer através da suplementação com concentrados energéticos a base de milho, principalmente em fazendas localizadas nas Sub-regiões da Nhecolândia e Paiaguás, onde devido à característica mais arenosa do solo, o estresse nutricional durante a estação da seca é mais intenso (Santos, 1997).

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 MAGV e 15,7% para o TCMV (Iversson *et al.*, 1993). A circulação de outros vírus como herpesvírus equídeo 1 (EHR-1), adenovírus equino (EAdV) e rinovírus equino 1 (ERV-1) também já foi identificada em espécimes biológicos da tropa pantaneira (Soriano *et al.*, 1997). Quanto à vacinação dos animais pantaneiros, em estudo baseado em inquéritos com proprietários de cavalos, realizado entre 1989 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).

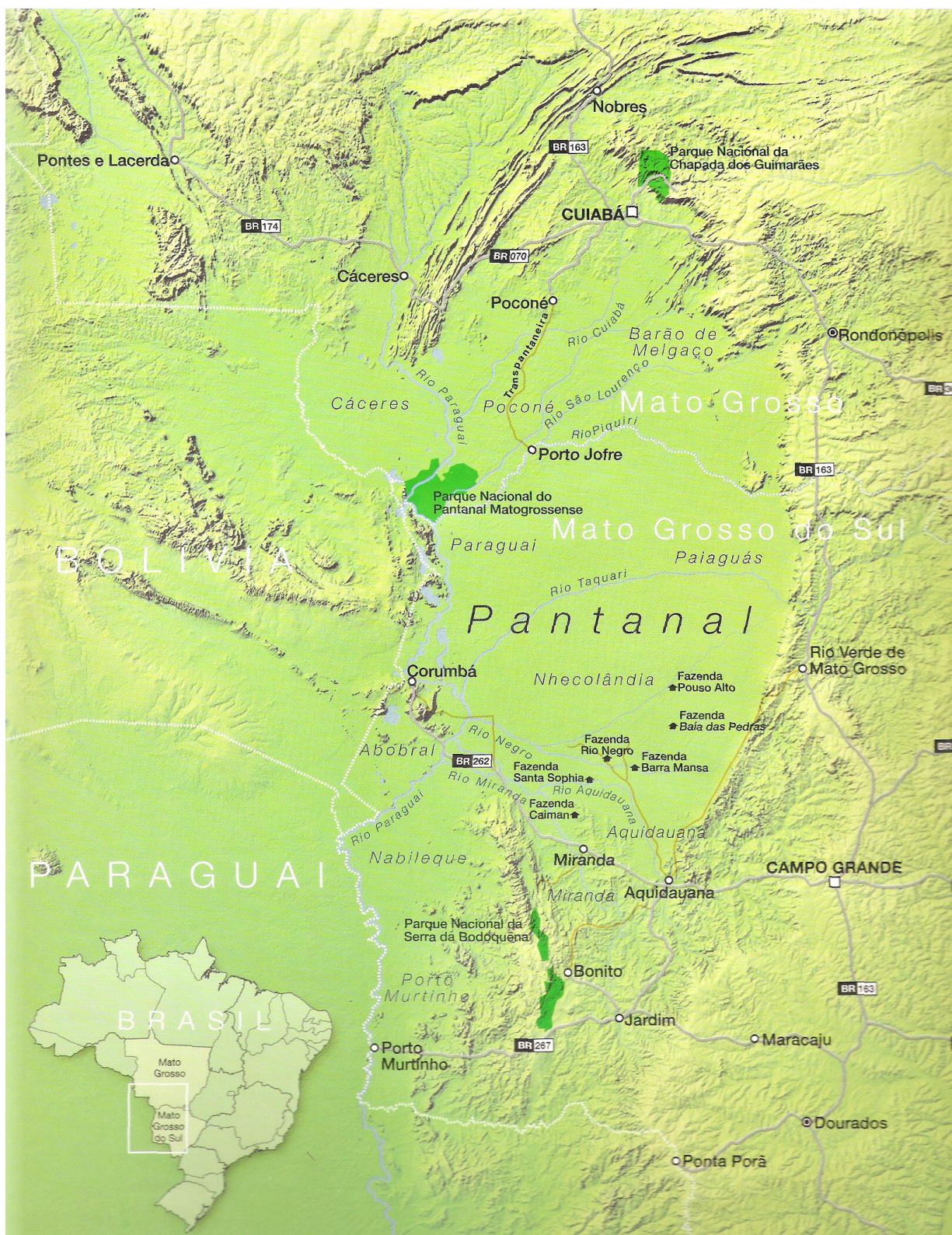


Figura 1.1 - Localização do Pantanal no território brasileiro. **Fonte:** Cunha (2007).

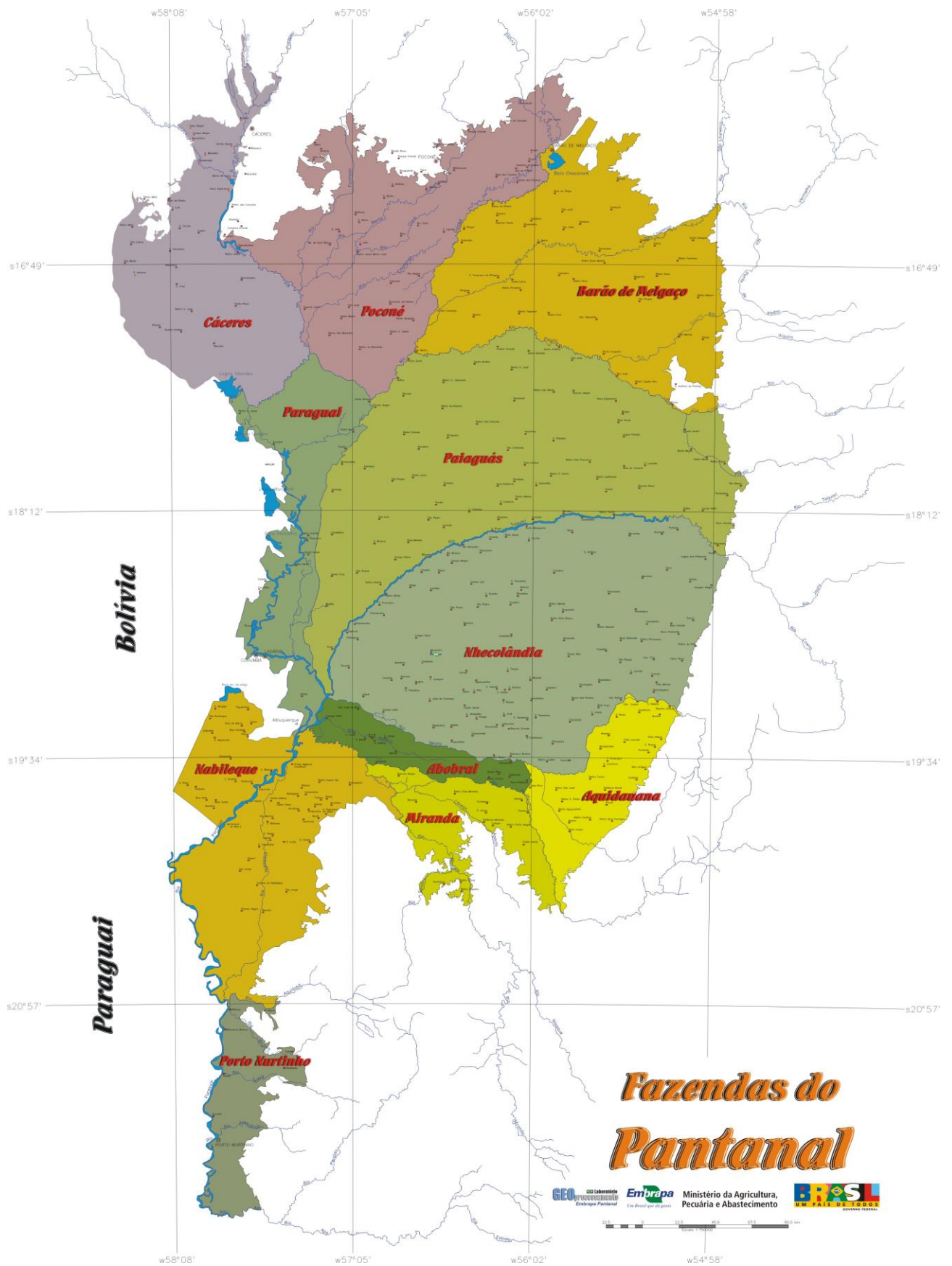


Figura 1.2 - Sub-regiões do Pantanal brasileiro. **Fonte:** Laboratório de Geoprocessamento da Embrapa Pantanal.



Foto 1.1 - Visão aérea da Sub-região da Nhecolândia. **Foto:** Laboratório de Geoprocessamento da Embrapa Pantanal.



Foto 1.2 - Visão aérea de uma das baías da Sub-região da Nhecolândia. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.



Foto 1.3 - *Mycteria americana* Linnaeus, 1758, popularmente conhecida como cabeça seca, em um ninhal na Sub-região da Nhecolândia. É uma espécie de ave migrante dentro do continente americano. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.



Foto 1.4 - *Himantopus melanurus* Vieillot, 1817, popularmente conhecida como Pernilongo, em uma salina na Sub-região da Nhecolândia. É uma espécie de ave migrante dentro do território nacional. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.



Foto 1.5 - Cavalos Pantaneiros se alimentando em uma baía na Sub-região da Nhecolândia. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.



Foto 1.6 - Equideocultura extensiva na Sub-região da Nhecolândia. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.

A escassez de dados recentes acerca da circulação de arbovírus na região do Pantanal de MS, associada a relatos de infecção arboviral sintomática em eqüinos em áreas próximas à planície (Fernandéz, Travassos da Rosa & Soccol, 2000; Morales *et al.*, 2006), uma pesquisa para detecção da circulação dos principais arbovírus de importância médica e veterinária no Brasil foi realizada pelo Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose do Instituto Oswaldo Cruz (LEV), referência para o estudo de agentes virais envolvidos em síndromes do SNC, com ênfase em paralisias flácidas agudas e meningites virais.

À semelhança de outras planícies periodicamente inundáveis, o Pantanal brasileiro apresenta um conjunto de fatores favoráveis a circulação e manutenção de ciclos arbovirais, como a presença de aves migratórias, alta densidade populacional eqüina e condições ambientais e climáticas favoráveis à proliferação de artrópodes hematófagos. Segundo Ward (2005), regiões que apresentam estes fatores estão susceptíveis a surtos de encefalomielite por arbovírus. Ainda segundo o autor, focos de infecção por WNV têm ocorrido principalmente em ecossistemas úmidos, como deltas de rios e planícies inundáveis.

Em virtude das evidências de circulação de WNV em países limítrofes ao Brasil, como Venezuela, Colômbia e Argentina, a pesquisa para a presença viral em território brasileiro contribui de forma significativa para o monitoramento da circulação viral no país. As características ecológicas e econômicas das fronteiras brasileiras com estes países serve como alerta, e reiteram a necessidade de um permanente sistema de vigilância para a circulação de WNV em território nacional. Embora infecção humana sintomática ainda não tenha sido detectada na América do Sul, a soropositividade e mais recentemente o isolamento viral em eqüinos clinicamente doentes no continente (Mattar *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2008), sugerem disseminação e manutenção silenciosa do vírus em território sul-americano.

Entendemos que o Pantanal apresenta algumas características ecológicas e geográficas que o sensibilizam à eventual circulação e manutenção deste arbovírus na região. Durante o estudo da evolução da primeira epidemia de encefalite causada por *Flavivirus* no Brasil em meados da década de 1970 na região da baixada santista e do Vale do Ribeira, verificou-se que alguns aspectos ecológicos são importantes para o deslocamento de uma epidemia ou epizootia, como a presença de um número elevado de indivíduos susceptíveis em uma determinada área, aumento da densidade populacional dos artrópodes vetores nessa área com possibilidade de contato com os

hospedeiros humanos e animais e deslocamento de vertebrados infectados ou de vetores por essa área (Iversson, 1977).

Entre as características ecológicas da planície pantaneira, alguns aspectos faunísticos previamente descritos apresentam grande relevância em ciclos arbovirais. A análise dos padrões alimentares de culicídeos capturados no Pantanal de MT realizada por Alencar *et al.* (2005) demonstrou que entre os reagentes ao teste de precipitina, cerca de 8% dos espécimes identificados a *Culex* sp., principal gênero envolvido na transmissão de WNV (Molaei *et al.*, 2006), apresentavam vestígios de sangue de aves simultaneamente ao de eqüinos e 12,7% apresentavam vestígios de sangue de aves simultaneamente ao humano.

Outro aspecto faunístico regional de relevância é a presença de aves de hábitos migratórios, que apesar de atualmente discutível, atribuiu-se como a principal forma de disseminação do vírus para o hemisfério oeste (Rappole, Derrickson & Hubálek, 2000; Rappole *et al.*, 2006). Em recente revisão e atualização da listagem de espécies registradas na região foi reportada a ocorrência de espécimes identificados a 470 espécies sendo 133 de hábitos migratórios (Tubelis & Tomás, 2002; Nunes & Tomás, 2004).

Além da preocupação acerca da detecção de eventual circulação de WNV no Pantanal de MS, o recente isolamento de SLEV de um paciente humano sintomático em território brasileiro (Rocco *et al.*, 2005) associado a proximidade da região pantaneira à áreas endêmicas para SLEV, como Argentina, reiteram a necessidade e importância de medidas de vigilância epidemiológica, como inquéritos sorológicos em populações humana e animal, no monitoramento da circulação deste *Flavivirus* na planície pantaneira.

Além de *Flavivirus*, relatos de infecção eqüina sintomática pelo *Alphavirus* EEEV, no PR e no Pantanal de MS, apontam para a necessidade de implantação e manutenção de um sistema de vigilância para circulação deste arbovírus na região pantaneira (Fernandéz, Travassos da Rosa & Soccol, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Pesquisar a circulação arboviral na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de MS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar através de inquérito sorológico a presença de anticorpos para WEEV, EEEV, MAYV e SLEV em população eqüina.
- Detecção através de isolamento viral e RT-PCR de presença arboviral em amostras de soro sanguíneo em população eqüina.
- Identificar espécies de culicídeos e ixodídeos capturados e coletados na Sub-região da Nhecolândia.
- Detecção através de isolamento viral e RT-PCR de presença arboviral em amostras de culicídeos e ixodídeos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE ESTUDO

Um modelo de estudo transversal foi realizado em fevereiro e novembro de 2007, através de amostragens de artrópodes hematófagos e soro sanguíneo equino na Sub-região da Nhecolândia, município de Corumbá, no Pantanal de MS. As capturas e coletas foram realizadas nos dois períodos ecologicamente distintos da região, no inverno, período entre junho e novembro, caracterizado por grandes áreas secas e baixo índice pluviométrico (Foto 4.2) e no verão, período entre dezembro e maio caracterizado por presença de grandes áreas alagadas e índice pluviométrico elevado (Foto 4.3).

As amostragens foram realizadas em áreas pertencentes às propriedades Fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal (Foto 4.1) e Fazenda Santa Maria de propriedade particular da empresa Agropecuária Curvo Ltda. Por estarem localizadas na mesma sub-região a uma distância de aproximadamente 15 km, as duas fazendas apresentam características geográficas e ecológicas semelhantes diferindo entretanto nas práticas de manejo aos equinos.

A escolha das áreas ocorreu em virtude da facilidade de acesso através da disponibilidade de uso de animais e instalações gentilmente cedidas pela Embrapa Pantanal e Fazenda Santa Maria e em virtude da reconhecida circulação arboviral na sub-região.

A Fazenda Santa Maria, uma das mais tradicionais da Sub-região da Nhecolândia, apresenta em uma área de 24000 hectares um rebanho bovino de 6000 animais e 150 equinos. Assim como a maioria das fazendas locais tem como principal atividade econômica a bovinocultura extensiva e institui a seus cavalos práticas de manejo sanitário consideradas muitas vezes aquém das tecnicamente recomendáveis, atribuídas às características ecológicas da região.

A Fazenda Nhumirim embora apresente características comuns às fazendas tradicionais da região, em virtude de seu propósito científico através do programa de conservação da raça cavalo pantaneiro, institui a seus animais um manejo sanitário mais apurado em relação aos padrões regionais. Na fazenda, embora manejados extensivamente como em propriedades vizinhas, os animais são avaliados regularmente acerca de AIE, desempenho e comportamento reprodutivo, dieta e nutrição, crescimento corporal e fisiologia do exercício (Brasil, 2008b). A fazenda foi utilizada como base de pesquisa provendo todo o suporte técnico necessário a realização das coletas de soro sanguíneo equino e capturas e coletas de artrópodes. Localizada a 160 km da cidade de Corumbá e com área de 4390,6 hectares, a Fazenda Nhumirim apresenta clima tropical, megatérmico e regime de precipitação caracterizado por uma divisão nítida durante o ano, com

um período chuvoso que se inicia em novembro e se estende até março, correspondendo a 72% da precipitação total anual e outro de baixa intensidade constituindo um período seco de abril a outubro.



Foto 4.1 - Visão aérea da Fazenda Nhumirim. **Foto:** Laboratório de Geoprocessamento da Embrapa Pantanal.

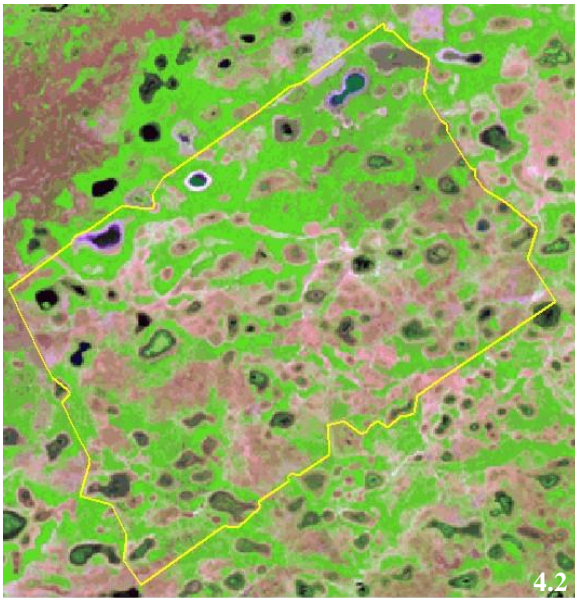


Foto 4.2 - Foto de satélite da Fazenda Nhumirim no inverno. Período de baixo índice pluviométrico, caracterizado por grandes áreas secas. Áreas escuras indicam coleções hídricas. **Foto:** Laboratório de Geoprocessamento da Embrapa Pantanal.

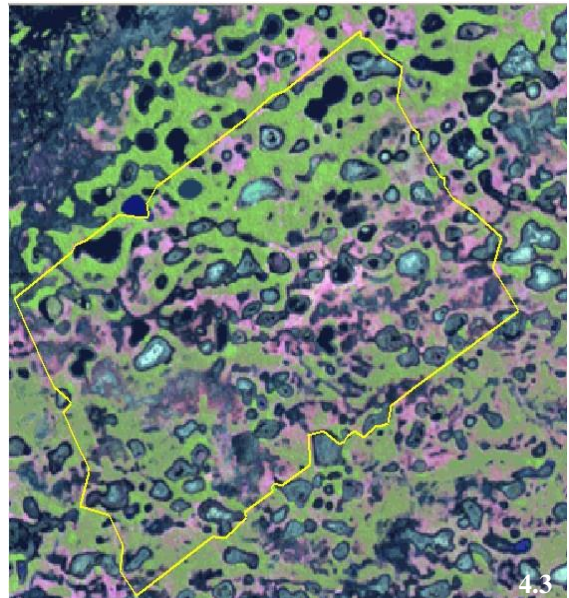


Foto 4.3 - Foto de satélite da Fazenda Nhumirim no verão. Período de elevado índice pluviométrico, caracterizado por grandes áreas alagadas. Áreas escuras indicam coleções hídricas. **Foto:** Laboratório de Geoprocessamento da Embrapa Pantanal.

4.2 METODOLOGIA DAS AMOSTRAGENS

4.2.1 **Eqüinos**

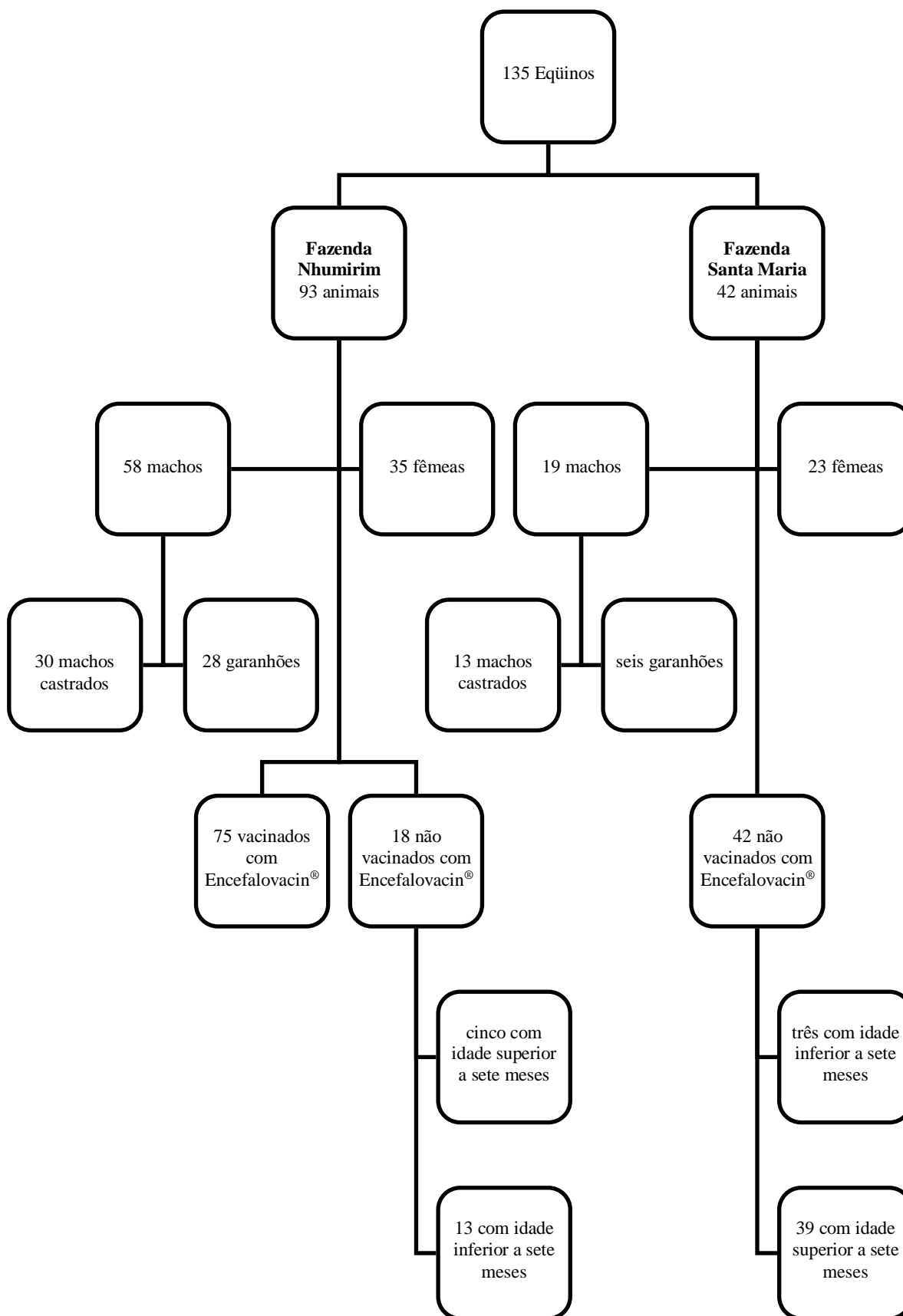
Em fevereiro de 2007 foram coletadas 135 amostras de soro sanguíneo eqüino, sendo 93 de animais gentilmente cedidos pela Fazenda Nhumirim e 42 de animais gentilmente cedidos pela Fazenda Santa Maria. A utilização dos animais foi devidamente autorizada pela Embrapa Pantanal, proprietária dos animais da Fazenda Nhumirim (ANEXO A) e Agropecuária Curvo LTDA., proprietária dos animais da Fazenda Santa Maria (ANEXO B). A coleta do material foi realizada nos dias 31 de janeiro, 01 e 05 de fevereiro de 2007, na Sub-região da Nhecolândia, município de Corumbá no Pantanal de MS. O período escolhido para coleta sanguínea é justificado em razão da necessidade de captura e coleta de culicídeos nos dois períodos ecologicamente distintos na região, sendo por isso simultaneamente realizada à primeira captura dos artrópodes. Dos 135 animais venopuncionados, 43 eram machos castrados, 34 garanhões e 58 fêmeas da raça cavalo pantaneiro, com idades que variavam entre 19 dias e 21 anos de vida.

Do plantel de eqüinos da Fazenda Nhumirim, 30 eram machos castrados, 28 garanhões e 35 fêmeas devidamente registradas na Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Pantaneiros (ABCCP). Entre os 93 animais venopuncionados, 75 haviam sido imunizados em maio de 2006 com a vacina bivalente inativada Encefalovacín[®], que segundo o fabricante é composta por isolados brasileiros de EEEV e WEEV inativados por formol em adjuvante oleoso, 13 apresentavam menos de sete meses de idade no momento da venopunção e cinco apresentavam histórico de viagens para MT (Organograma 4.1).

Dos 42 eqüinos pertencentes à Fazenda Santa Maria, 13 eram machos castrados, seis garanhões e 23 eram fêmeas sem registro genealógico na ABCCP e sem histórico de vacinação para encefalite eqüina (Foto 4.4). Os animais pertencentes à Fazenda Santa Maria não apresentavam registros de nascimento sendo atribuída idade inferior a sete meses a apenas três potros (Foto 4.5).

Foi coletado de cada animal, um volume de 10 ml de sangue total em tubo sem anticoagulante, através de punção da veia jugular esquerda. Após a coleta, as amostras de sangue foram mantidas em caixas térmicas com gelo reciclável até a chegada à base de pesquisa, localizada na Fazenda Nhumirim. Após a separação dos elementos figurados por centrifugação, as amostras de soro sanguíneo foram acondicionadas em criotubos de 5 ml e mantidas sob refrigeração até o transporte ao LEV. Cada amostra apresentava numeração de controle local, nome do animal, pelagem, raça, sexo, idade, vacinação, data da coleta, local de coleta,

informações quanto a possíveis viagens para fora do Pantanal e alterações comportamentais referidas ou não pelos trabalhadores rurais locais (ANEXO D).



Organograma 4.1 - Animais venopuncionados de acordo com a propriedade, idade e vacinação.



Foto 4.4 - Animais gentilmente cedidos pela Fazenda Santa Maria. Os animais desta propriedade não eram domados. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.



Foto 4.5 - Um dos Cavalos Pantaneiros gentilmente cedidos pela Fazenda Nhumirim. **Foto:** Alex Pauvolid Corrêa.

4.2.2 Artrópodes

Em fevereiro e novembro de 2007, foram capturados e coletados na Fazenda Nhumirim, 3684 exemplares de artrópodes identificados a Culicidae e 70 identificados a Ixodidae.

4.2.2.1 Culicídeos

4.2.2.1.1 *Capturas e coletas*

As capturas e coletas dos culicídeos foram realizadas sob licença n° 002/2007 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (ANEXO G) nos dias 06, 07 e 08 de fevereiro (ANEXO H) e nos dias 31 de outubro, 01, 02, 03, e 04 de novembro de 2007 (ANEXO I) em diversos pontos da Fazenda Nhumirim. Foram utilizadas as armadilhas CDC® (Foto 4.6 e 4.8), Shannon (Foto 4.7) e aspiração por tubo de sucção oral para a coleta de culicídeos durante hematofagia como previamente descrito por Alencar *et al.* (2005). As coletas de aspiração por sucção oral em humanos foram realizadas exclusivamente em membros da equipe do Laboratório de Diptera (Núcleo de Culicídeos) do Instituto Oswaldo Cruz (LabDip) e do LEV, sem qualquer participação de funcionários locais durante as coletas. Ao total foram realizadas 21 capturas e coletas, sendo 11 em fevereiro e dez em novembro em um total de oito dias. Das 21 amostragens realizadas, 14 foram feitas com tubo de sucção oral sendo cinco em eqüinos (Foto 4.9) e nove em membros da equipe (Foto 4.10), dois com armadilha de Shannon e cinco com armadilha CDC® (Foto 4.11). Após a captura e coleta, os espécimes eram levados à base onde eram submetidos por alguns segundos à imobilização criogênica e conseqüente identificação morfológica, através de estereomicroscopia em placa refrigerada adaptada, como previamente descrito por Huang *et al.* (2001) e O'guinn & Turell (2002).

4.2.2.1.2 *Identificação*

A identificação dos exemplares foi gentilmente realizada em campo pela equipe do LabDip, baseada nas chaves dicotômicas elaboradas por Lane & Cerqueira (1942), Lane (1953), Gorham, Stojanovich & Scott (1967), Faran & Linthicum (1981), Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini (2002). Durante a identificação, os exemplares foram separados de acordo com a espécie em grupos de até 100 indivíduos, em criotubos devidamente identificados. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até a chegada ao LEV, onde foram

acondicionadas a -70°C como previamente descrito por Vasconcelos *et al.* (1991) e Pecor *et al.* (2000). Os insetos capturados em novembro foram identificados à subfamília em campo, sendo a identificação específica realizada pela equipe do LabDip, na cidade do Rio de Janeiro. Estes espécimes não foram submetidos à tentativa de isolamento e detecção de ácido nucléico viral.

4.2.2.1.3 Trituração

Após chegada ao LEV, os espécimes foram processados de acordo com protocolo elaborado e gentilmente cedido por Dr. Roger Nasci do CDC (ANEXO J). Aos criotubos foram adicionadas quatro esferas de chumbo revestidas em cobre (Premium Grade BBs airgun shot steel BB cal. 4.5 mm COPPERHEAD[®]) e 2 ml de diluente BA-1 modificado filtrado, composto por albumina sérica bovina 5%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$, fungizona 1000 X, hidroximetilaminometano (TRIS) 0,5 M, meio de cultura 199 com glutamina e bicarbonato de sódio 7,5%. Após agitação em Vortex[®] por 6 minutos, o triturado de cada criotubo foi transferido para dois tubos eppendorff[®] de 1,5 ml, antes de serem submetidos à centrifugação a 6000 RPM por 15 minutos a 25°C como previamente descrito por Huang *et al.* (2001), Hadfield *et al.* (2001), Lourenço-de-Oliveira *et al.* (2002) e O'guinn *et al.* (2004).

4.2.2.2 Ixodídeos

4.2.2.2.1 Coletas

As coletas de carrapatos foram realizadas nos dias 31 de janeiro e 01 e 05 de fevereiro de 2007, durante inspeção para presença de ectoparasitos em pavilhão auricular, região periocular e narinas dos eqüinos utilizados para coleta sanguínea. Os carrapatos recolhidos foram separados por hospedeiro e acondicionados em criotubos de 5 ml devidamente identificados, antes de serem submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido até a chegada ao LEV, onde foram mantidos a -70°C até a identificação.

4.2.2.2.2 *Identificação*

Após a chegada ao LEV, os aracnídeos foram levados ao Laboratório de Ixodides do Instituto Oswaldo Cruz onde foram, em placa refrigerada adaptada, gentilmente identificados e separados em grupos de até dez exemplares de acordo com a espécie, sexo e hospedeiro. A identificação dos ixodídeos foi realizada com base em 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 levado ao LEV onde foi mantido a -70°C até o seu processamento.

4.2.2.2.3 *Trituração*

Em virtude das características anatômicas dos ixodídeos, a trituração foi realizada manualmente, através de maceração com pistilo e recipiente de louça estéreis em presença de 2 ml de diluente BA-1 modificado filtrado. As teleóginas tiveram o idiossoma previamente rompido com agulha estéril, antes da maceração. O produto triturado foi aspirado e mantido em tubos eppendorff® de 1,5 ml em congelador a -70°C , até o isolamento viral. Devido ao grande volume de material entérico encontrado, principalmente em teleóginas, cada grupo triturado continha até dez espécimes.



Foto 4.6 - Armadilha CDC® em árvore dentro de uma cordilheira na Fazenda Nhumirim, para captura de culicídeos acrodendrofilicos. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa



Foto 4.7 - Armadilha Shannon colocada entre uma cordilheira e uma baía na Fazenda Nhumirim, para captura de culicídeos. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa



Foto 4.8 - Armadilha CDC® colocada próxima ao solo à beira de uma cordilheira na Fazenda Nhumirim, para captura de culicídeos. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa



Foto 4.9 - Coleta por aspiração com tubo de sucção oral de culicídeos em hematofagia em equino da Fazenda Nhumirim. **Foto:** Embrapa Pantanal



Foto 4.10 - Coleta por aspiração com tubo de sucção oral de culicídeos em hematofagia em membro da equipe do Laboratório de Enterovírus, dentro de cordilheira na Fazenda Nhumirim. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa



Foto 4.11 - Residência do trabalhador rural Sr. Roberto Rondon da Embrapa Pantanal, gentilmente cedida para captura de culicídeos através da armadilha CDC® em ambiente intradomiciliar. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa



4.12

Foto 4.12 - Um dos espécimes de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) Koch, 1844 coletados durante hematofagia em eqüinos venopunciondaos. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa



4.13

Foto 4.13 - Um dos espécimes de Culicinae coletados, durante hematofagia em membros da equipe. **Foto:** Alex Pauvalid Corrêa

Todas as etapas laboratoriais envolvendo manipulação celular, viral e das amostras biológicas compostas por soro sanguíneo eqüino e 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-A2) de contenção secundária.

Para facilitar as descrições metodológicas utilizadas em ensaios de PCR realizados em amostras virais controle e em amostras de soro sanguíneo eqüino e artrópodes, os iniciadores utilizados e suas respectivas seqüências nucleotídicas estão descritos separadamente em quadro sequencial ao referido item.

4.3.1 **Cultivos celulares utilizados**

Para a propagação, titulação e isolamento viral foi utilizado um sistema hospedeiro vivo representado por cultura de células VERO de 181^o passagem, pertencentes ao lote 36745 gentilmente cedidas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) enviadas ao LEV em 28 de janeiro de 2005. Para manutenção das culturas celulares foram realizadas passagens semanais a fim de se manter condições bioquímicas ótimas para o desenvolvimento e manutenção da monocamada de células. Após a observação em microscopia de luz, o meio de manutenção era desprezado e à garrafa adicionada tripsina para desprendimento da monocamada celular. Após a tripsinização, adicionava-se meio de cultura 199 com 5% de soro fetal bovino (SFB) para homogeneização. As células então eram distribuídas em novas garrafas que eram complementadas com meio de cultura 199 a 5% de SFB e mantidas em estufa a 37°C.

4.3.2 **Amostras virais controle**

Os *Alphavirus* WEEV, MAYV e EEEV e o *Flavivirus* SLEV foram gentilmente cedidos pelo Dr. Maulori Curié Cabral e Dr. Davis Fernandes Ferreira do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para a propagação e padronização (titulação) dos arbovírus foram utilizadas culturas de clone celular VERO, como previamente descrito por Monath *et al.* (1985), McLean, Kirk,

Schriner & Townsend (1993), Ryan *et al.* (2003), Chiles *et al.* (2004) e Payne, Binduga-Gajewska, Kauffman & Kramer (2006) para SLEV, Aviles, Sabattini & Mitchell (1992), Bianchi, Aviles & Sabattini (1997), Lambert, Martin & Lanciotti (2003) e Nasci *et al.* (2003) para WEEV, Walder & Suarez (1976), Mitchell *et al.* (1993), Nasci *et al.* (2003), Tate *et al.* (2005) e Loftin *et al.* (2006) para EEEV e Ishimaru *et al.* (1998), Ferreira *et al.* (2000), Burlandy & Rebello (2001), Barroso, Lima, Silva-Neto & Da Poian (2002) e El-Bacha *et al.* (2004) para MAYV.

4.3.2.1 Propagação viral

As suspensões virais WEEV, MAYV, EEEV e SLEV foram mantidas em congelador a -70°C até o momento de sua propagação. Para a propagação, uma alíquota de $100\mu\text{l}$ de cada suspensão viral foi inoculada em tubos de cultura celular VERO em concentração de 5×10^5 células/mililitro. Os tubos incubados a 37°C foram observados diariamente, através de microscópio de luz invertido, para detecção de ECP. Após observação de ECP, os tubos foram mantidos em -70°C até a propagação viral em garrafas de 75 cm^2 . Para o cálculo da concentração e volume da suspensão viral a ser inoculado nas garrafas de cultura, um valor de multiplicidade de infecção ($\text{Moi} = \text{PFU}/\text{número de células}$) de 0,1 foi considerado. A utilização de 1 unidade formadora de placa (PFU) para cada dez células utilizadas objetivou a propagação viral com reduzida biossíntese de partículas virais defectivas. Antes da inoculação da suspensão viral, o meio de crescimento nas garrafas foi descartado e um volume de 5 ml de solução salina (PBS) aplicado. Após aplicação e antes do descarte da solução tampão, as garrafas foram levemente movimentadas objetivando-se o contato da solução tampão com toda a monocamada, configurando a primeira lavagem do tapete celular. Após descarte do sobrenadante, 4 ml da suspensão viral foram inoculados às garrafas, posteriormente incubadas a 37°C por uma hora. Durante este período, as garrafas foram levemente movimentadas a cada 15 minutos, otimizando adsorção viral. Após a incubação, o sobrenadante foi novamente descartado e a nova aplicação seguida de descarte de 5 ml de PBS configurou a segunda lavagem da monocamada celular. Como meio de manutenção, 6 ml de meio de cultura 199 suplementado e complementado com soro fetal bovino a 2% foram aplicados antes da segunda incubação a 37°C . Diariamente observadas em microscopia de luz, o sobrenadante das garrafas que apresentaram ECP na monocamada foi centrifugado a 10000 rpm a 4°C por 10 minutos em centrífuga (Sorvall RC5C), para separação de debris celulares antes do armazenamento em congelador a -70°C .

4.3.2.2 Titulação viral (padronização da concentração de antígenos virais)

Volumes de 50µl de cada diluição logarítmica de 10^{-1} a 10^{-12} realizadas em meio de cultura 199 foram aplicados a sete cavidades, em microplaca de 96 poços (96 Well Cell Culture Cluster, CORNING) (ANEXO C). Em seguida, às cavidades da microplaca foram adicionados 100µl de suspensão celular de VERO na concentração de $2,5 \times 10^5$ células por mililitro. Em virtude da utilização de estufa sem controle de CO_2 as placas eram vedadas com filme transparente de poliéster (Transparent polyester film, BECTON DICKINSON) para diminuir alterações de pH da suspensão, inerentes ao contato com o dióxido de carbono no interior da estufa. Vedadas, as microplacas eram incubadas a 37°C e observadas diariamente em microscópio de luz invertido durante dez dias. O título infeccioso de cada suspensão viral foi expresso pela recíproca da maior diluição viral capaz de impelir ECP em 50% das culturas celulares inoculadas. Esta diluição denominada dose infectante em cultivo celular (CCID_{50}), foi determinada de acordo com a Fórmula de Kärber, onde $\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$, sendo $L = \log$ da menor diluição usada no teste, $d =$ diferença entre logs das diluições e $S =$ soma das proporções de cavidades com ECP para cada diluição. Após as propagações, a CCID_{50} das suspensões virais de MAYV, WEEV, EEEV e SLEV utilizadas foram respectivamente calculadas a $10^{6,9}$, $10^{7,16}$, $10^{7,64}$ e $10^{4,93}$ para cada 50µl. Para o cálculo do título viral em PFU/ml foi considerado, $10^5 \text{CCID}_{50}/\text{ml} = 20 \times 10^5 \text{CCID}_{50}/50\mu\text{l}$ e que $10^5 \text{CCID}_{50}/\text{ml} = 0,7 \times 10^5 \text{PFU}/\text{ml}$, logo $\text{MAYV} = 1,4 \times 10^{7,9} \text{PFU}/\text{ml}$, $\text{WEEV} = 1,4 \times 10^{8,16} \text{PFU}/\text{ml}$, $\text{EEEV} = 1,4 \times 10^{8,64} \text{PFU}/\text{ml}$ e $\text{SLEV} = 1,4 \times 10^{5,93}$.

4.3.2.3 Extração do ácido nucléico viral

Após propagação e titulação, as suspensões virais foram submetidas a extração de ácido nucléico viral através de kit comercial (QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O ácido nucléico extraído, suspenso em 60µl, foi submetido à centrifugação refrigerada a vácuo (SpeedVac[®] SVC100 SAVANT) para concentração a 9µl.

4.3.2.4 Síntese do c-DNA

Após extração, o RNA viral de cada suspensão viral foi submetido à primeira etapa da síntese de c-DNA a 70°C por 10 minutos e a 4°C por igual período, utilizando-se para cada amostra, 1µl de iniciadores aleatórios [500µg/ml] (Random Primers PROMEGA). Na segunda etapa, ao produto da primeira foram acrescentados para cada amostra o volume de 4µl de solução tampão 5X (First Strand Buffer 5X INVITROGEN), 2µl de Dithiothreitol 0.1 M (Ultra Pure™ Dithiothreitol INVITROGEN), 3µl de Desoxinucleotídeos (100 mM dNTP INVITROGEN) e 0.5µl de inibidor de RNase [40U/µl] (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor INVITROGEN), antes da incubação a 42°C por 2 minutos em termociclador. Na terceira e última etapa, ao produto final da segunda, a adição de 0,5µl de transcriptase reversa [200U/µl] (SuperScript™ II Reverse Transcriptase INVITROGEN) foi seguida pela terceira e última incubação, à 42°C por 50 minutos. O processo de síntese de c-DNA gerou um produto final de aproximadamente 20µl de cada amostra. O material foi mantido em congelador a -70°C até a PCR. Todas as incubações da síntese de c-DNA foram feitas em termociclador (GeneAmp PCR System 2400 APPLIED BIOSYSTEMS).

4.3.2.5 PCR para *Alphavirus* ou *Flavivirus*

Em volume de 10µl, o c-DNA das suspensões virais WEEV, EEEV e MAYV foi submetido a PCR de gênero utilizando-se 50 pmoles (1µl) do iniciador antisense degenerado cM3W-R e 50 pmoles (1µl) do iniciador senso degenerado M2W-F, para amplificação de seqüência nucleotídica de 434 pares de bases da proteína não estrutural 1 dos *Alphavirus*, como descrito por Pfeffer, Proebster, Kinney & Kaaden (1997) (Quadro 4.1). Para amplificação de fragmento genérico de 958 pares de bases do gene NS5 do *Flavivirus* SLEV o mesmo volume de c-DNA foi utilizado com 50 pmoles (1µl) do iniciador senso FG1-F e 50 pmoles (1µl) do antisense FG2-R, como descrito por Bronzoni *et al.* (2005) (Quadro 4.2). Além dos iniciadores, para a realização da PCR de gênero foram utilizados 5µl de solução tampão 10X (10X PCR Buffer minus Mg INVITROGEN), 1,5µl de cloreto de magnésio (50 mM Magnesium Chloride INVITROGEN), 3µl de desoxinucleotídeos (100 mM dNTP INVITROGEN), 0,5µl de polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase INVITROGEN) e 28µl de H₂O (Ultrapure™ Distilled Water GIBCO). Em termociclador (GeneAmp PCR System 2400 APPLIED BIOSYSTEMS) a solução

final em volume de 50µl foi submetida em etapa preliminar a temperatura de 94°C por 2 minutos, para ativação da polimerase Platinum®, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final dos ciclos, o produto final foi submetido à extensão a 72°C por 7 minutos.

4.3.2.6 Semi-Nested PCR para *Flavivirus* ou *Alphavirus*

Após amplificação da sequência comum ao gênero, os produtos foram submetidos à outra PCR para amplificação de sequências específicas de cada vírus. Para a realização de Semi-Nested PCR foram utilizados, à exceção dos iniciadores senso de *Alphavirus* e antisenso de *Flavivirus*, os mesmos reagentes em mesmas concentrações e o mesmo número de ciclos e variações de temperatura e tempo utilizadas para amplificação de fragmento genérico. Para as amostras virais controle WEEV, EEEV e MAYV utilizou-se 50 pmoles (1µl) do mesmo iniciador antisenso degenerado utilizado na PCR de gênero cM3W-R e 50 pmoles (1µl) dos iniciadores senso específicos nEEEV-F, nWEEV-F ou nMAYV-F para amplificação de fragmentos genômicos específicos de 208 pb para WEEV, 124 pb para EEEV e 270 pb para MAYV, à semelhança do descrito por Bronzoni, Moreli, Cruz & Figueiredo (2004) (Quadro 4.1). Para o *Flavivirus* SLEV, a Semi-Nested PCR foi realizada utilizando-se 50 pmoles (1µl) do mesmo iniciador senso utilizado na PCR de gênero FG1-F e 50 pmoles (1µl) do iniciador antisenso específico nSLEV-R para amplificação de fragmento genômico específico de 232 pb (Quadro 4.2).

4.3.2.7 Eletroforese

Em virtude de todos os fragmentos genômicos específicos dos vírus estudados apresentarem sequência nucleotídica inferior a 300 pares de bases, o produto amplificado de cada suspensão viral foi submetido primeiramente à eletroforese em gel de acrilamida 10% corado com brometo de etídeo. Após confirmação da amplificação dos fragmentos genômicos esperados através da visualização em transiluminador ultravioleta, alíquotas do produto amplificado de cada suspensão viral foram submetidas à nova eletroforese, desta vez em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, objetivando-se posterior captura do fragmento específico para conseqüente seqüenciamento nucleotídico do oligonucleotídeo específico.

4.3.2.8 Eluição do gel para captura dos oligonucleotídeos e quantificação dos produtos

A captura do fragmento de DNA do gel foi realizada através de kit comercial de extração de DNA em gel (QIAquick[®] Gel Extraction Kit Protocol QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Em volume de 4 μ l, o eluído associado a 2 μ l de tampão carreador em gel (6X Gel Loading Buffer BIO-RAD) e 6 μ l de H₂O foi submetido à eletroforese a 80 v por 20 minutos em gel de agarose 2% com brometo de etídeo. O marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder GIBCO BRL[®]) foi utilizado com os mesmos diluentes e em mesma diluição.

4.3.2.9 Reações cíclicas de seqüenciamento nucleotídico

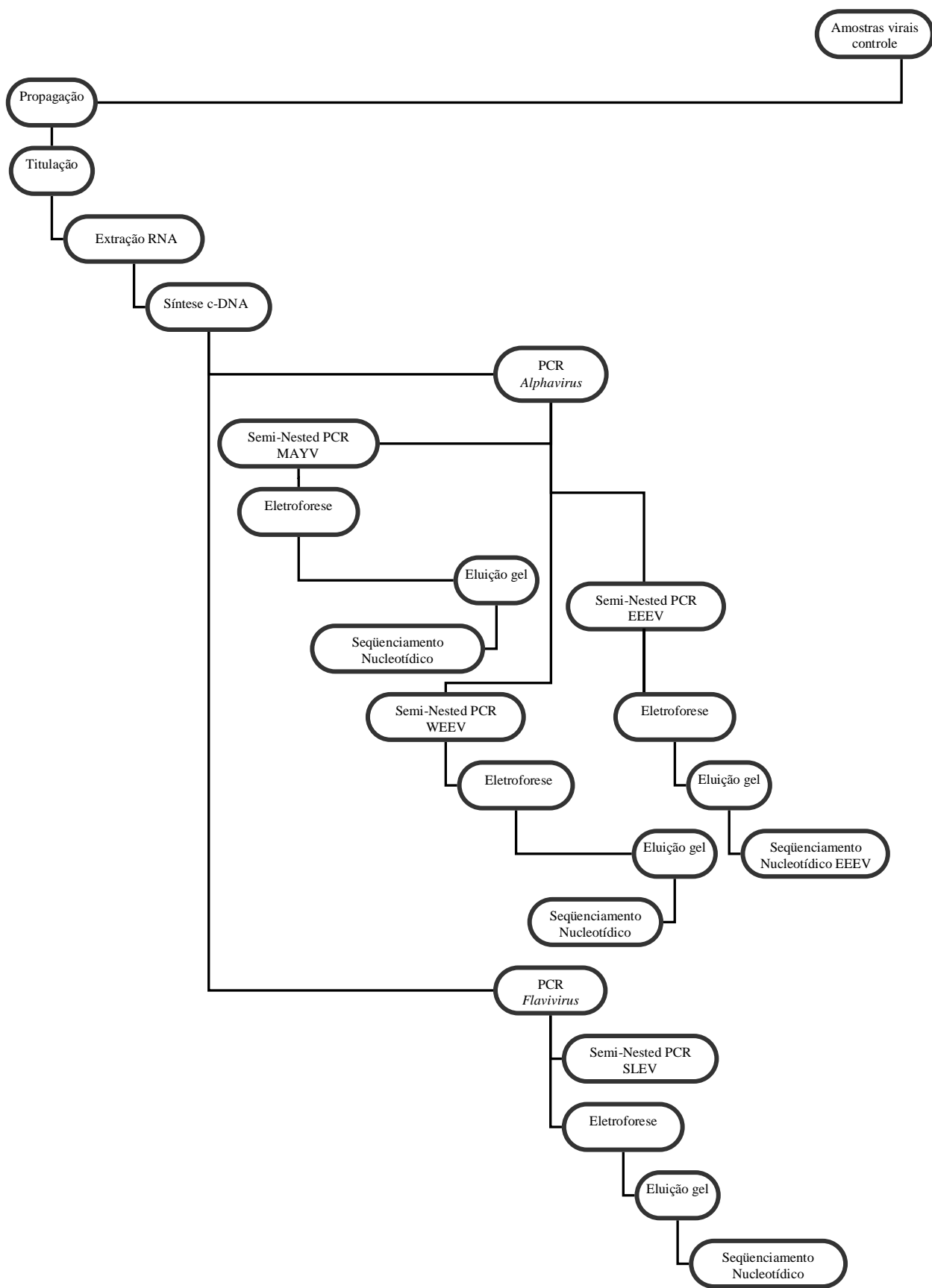
As concentrações de DNA utilizadas para as reações cíclicas de seqüenciamento foram padronizadas em função do tamanho do fragmento. Concentrações entre 100-120 ng/ μ l de DNA foram suficientes para produzir eletroferogramas que forneciam leituras confiáveis das seqüências. Para as reações foi utilizado kit comercial (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit APPLIED BIOSYSTEMS) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O fundamento do método de seqüenciamento do kit utilizado é baseado na marcação com fluorescência dos dideoxinucleotídeos incorporados às cadeias de DNA com tamanhos variáveis formadas durante a reação. Para cada reação foram utilizados 5 pmoles de cada iniciador senso ou antisenso, em cada um dos tubos, 4 μ l de solução tampão 5X (BigDye[®] Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer), 4 μ l de BigDye[®] (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100) e 120 ng de DNA. As reações foram realizadas em termociclador com 25 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 42°C e 3 minutos a 60°C em termociclador (GeneAmp[®] PCR System 9700, APPLIED BIOSYSTEMS) (Organograma 4.2).

Seqüências nucleotídicas de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR em amostras virais controle dos <i>Alphavirus</i> EEEV, WEEV e MAYV	Amplicon (pb)	Genoma alvo
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (M2W-F) 5`[y]ag agc dtt ttc gca [y]st rgc hw 3`	434	(PCR) <i>Alphavirus</i>
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (nEEEV-F) 5`cca cgg tac cgt tgc c 3`	124	(Semi-Nested PCR) EEEV
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (nWEEV-F) 5`ggc ggc aga cct gct gga a 3`	208	(Semi-Nested PCR) WEEV
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (nMAYV-F) 5`gga agt tgg cca agg c 3`	270	(Semi-Nested PCR) MAYV

Quadro 4.1 - Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* em amostras virais controle.

Seqüências nucleotídicas de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR em amostra viral controle do <i>Flavivirus</i> SLEV	Amplicon (pb)	Genoma alvo
(FG2-R) 5`gtg tcc cat cct gct gtg tca tca gca tac a 3` (FG1-F) 5` tca agg aac tcc aca cat gag atg tac t 3`	958	(PCR) <i>Flavivirus</i>
(nSLEV-R) 5`att ctt ctc tca atc tcc gt 3` (FG1-F) 5` tca agg aac tcc aca cat gag atg tac t 3`	232	(Semi-Nested PCR) SLEV

Quadro 4.2 - Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para SLEV em amostra viral controle.



Organograma 4.2 - Sequência dos eventos realizados em amostras virais controle.

4.3.3 **Amostras de soro sanguíneo equino**

4.3.3.1 Teste de Soroneutralização (NT)

As amostras foram submetidas ao NT, utilizando-se como antígenos WEEV, MAYV, EEEV e SLEV. Alíquotas de soro, após inativação a 56°C por 30 minutos, foram diluídas a 1:8 em meio de cultura 199, utilizando-se 40µl da alíquota e 280µl do meio de cultura 199. Em uma microplaca de 96 poços (96 Well Cell Culture Cluster, CORNING), 50µl de cada amostra diluída foram aplicados a dois poços consecutivos, totalizando para cada placa, 40 amostras além do controle negativo e positivo (ANEXO E). Em seguida, 50µl da suspensão viral contendo 100 CCID₅₀ foram aplicados a todos os orifícios da microplaca, à exceção do controle negativo, permitindo reação antígeno-anticorpo durante incubação por 1 hora em estufa a 37°C, como previamente descrito por Lindsey, Calisher & Mathews (1976) e Thoisy *et al* (2003).

Após este período, as microplacas foram retiradas da estufa e a cada poço foram adicionados 100µl de suspensão de células VERO na concentração de 2.5 x 10⁵ células/mililitro. Adicionadas as células, as placas foram vedadas com filme transparente de poliéster (Transparent polyester film, BECTON DICKINSON) e submetidas à incubação em mesma temperatura por cinco a dez dias, de acordo com a suspensão viral utilizada. Durante este período, as placas foram observadas diariamente por microscopia de luz para identificação de ECP. As unidades em que a monocamada celular não apresentou ECP ou aquelas em que se identificou toxicidade celular, foram submetidas a um segundo NT em mesma concentração viral, mas com a diluição das amostras em base 2 a partir de 2³ (1:8) até 2¹⁰ (1:1024) em duplicatas, como previamente descrito por Lennette (1995) (ANEXO F).

O título neutralizante de cada amostra foi expresso como a maior diluição do soro sanguíneo capaz de neutralizar 100 CCID₅₀ da suspensão viral. A triagem utilizando-se a diluição 1:8 de cada amostra objetivou a prévia detecção de animais soronegativos, metodologia previamente utilizada em outros inquéritos sorológicos para pesquisa de arbovírus, como por Fernández, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol (2000) e Thoisy *et al.* (2003).

4.3.3.2 Isolamento viral

Alíquotas de soro sanguíneo de 135 equinos foram submetidas ao isolamento viral através da inoculação em tubos de cultura de células VERO a 5×10^5 células/mililitro. Para a escolha da cultura celular foram levadas em consideração a susceptibilidade celular e conseqüente formação de ECP durante infecção por arbovírus, como previamente descrito por Lanciotti *et al.* (2000), Komar *et al.* (2001), Bunning *et al.* (2002) e Autorino *et al.* (2002) para WNV, Lopes, Coimbra, Sacchetta & Calisher (1978), Mitchell & Forattini (1984), Monath *et al.* (1985) e Mitchell, Forattini & Miller (1986) para ROCV, Monath *et al.* (1985), McLean, Kirk, Schriener & Townsend (1993), Ryan *et al.* (2003), Chiles *et al.* (2004) e Payne, Binduga-Gajewska, Kauffman & Kramer (2006) para SLEV, Monath *et al.* (1985), Cruz (1994), Nassar *et al.* (1997) e Turell *et al.* (2005) para ILHV, Aviles, Sabbatini & Mitchell (1992), Bianchi, Aviles & Sabbatini (1997), Lambert, Martin & Lanciotti (2003) e Nasci *et al.* (2003) para WEEV, Walder & Suarez (1976), Mitchell *et al.* (1993), Nasci *et al.* (2003), Tate *et al.* (2005) e Loftin *et al.* (2006) para EEEV, Erickson & Mare (1975), Scherer & Anderson (1975), Justines, Oro & Alvarez (1981), Watts *et al.* (1997) para VEEV e Ishimaru *et al.* (1998), Ferreira *et al.* (2000), Burlandy & Rebello (2001), Barroso, Lima, Silva-Neto & Da Poian (2002) e El-Bacha *et al.* (2004) para MAYV.

Após o desprezo do meio de crescimento por derramamento, aos tubos foram adicionadas alíquotas de 200µl de soro sanguíneo não inativado em diluição 1:10 em meio de cultura 199 sem soro fetal bovino. Após a inoculação os tubos foram levados à estufa e mantidos em 37°C por uma hora, sendo levemente movimentados a cada 15 minutos, a fim de se otimizar possível adsorção viral. Ao fim deste período, aos tubos foram adicionados 1800µl de meio de cultura 199 com 2% de soro fetal bovino antes da incubação em mesma temperatura por sete dias. Os tubos eram visualizados diariamente por microscopia de luz a fim de se detectar possível ECP na monocamada celular. Ao fim da primeira semana, 200µl do sobrenadante do tubo da primeira inoculação eram inoculados em novo tubo de cultura celular, caracterizando a segunda inoculação. A ausência de ECP ao final de três inoculações caracterizou ausência de vírus citopatogênicos na amostra.

4.3.3.3 PCR seguido de Semi-Nested PCR para *Alphavirus*

Após extração de RNA e construção de c-DNA das amostras de soro sanguíneo, como previamente descrito para amostras virais controle, a PCR de gênero para *Alphavirus* foi realizada nas amostras 94 a 135 à semelhança de metodologias anteriormente descritas por Pfeffer, Proebster, Kinney & Kaaden (1997), Sánchez-Seco *et al.* (2001) e Bronzoni, Moreli, Cruz & Figueiredo (2004). As amostras 01 a 93, pertencentes aos animais da Fazenda Nhumirim não foram submetidas a este ensaio molecular para a pesquisa de ácido ribonucleico viral. Em volume de 10µl, o c-DNA das amostras de soro sanguíneo equino foi submetido a PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* utilizando-se os mesmos reagentes em mesmas concentrações e o mesmo número de ciclos e variações de temperatura e tempo utilizadas para amplificação de seqüência nucleotídica comum ao gênero das amostras virais controle WEEV, EEEV e MAYV. Entretanto, para a Semi-Nested PCR das amostras de soro sanguíneo equino foram utilizados 100 pmoles (2µl) do iniciador reverso cM3W, simultaneamente a 50 pmoles (1µl) de cada um dos iniciadores específicos nWEEV-F, nMAYV-F e para nVEEV-F (Quadro 4.3). Após a realização da Semi-Nested PCR, os produtos amplificados das amostras foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e posteriormente visualizados em transiluminador ultravioleta. As amostras em que fragmentos genômicos de tamanho aproximado ao específico foram visualizados, foram submetidas à eluição de gel para captura dos oligonucleotídeos seguida por quantificação do produto e reação cíclica de seqüenciamento nucleotídico, como previamente descrito para as amostras virais controle.

4.3.3.4 PCR seguido de Nested PCR para *Flavivirus*

Em volume de 5µl, o c-DNA das 135 amostras foi submetido a PCR para detecção de ácido nucléico de *Flavivirus*, utilizando-se o iniciador externo degenerado senso FlagF1 e antisenso FlagR2 para amplificação de seqüência nucleotídica de 453 pares de bases. Os iniciadores foram construídos com base em multi-alinhamento de seqüências genômicas na região NS5 de JEV, SLEV, YFV, DENV e WNV (Manuscrito em preparação). Para a realização da PCR foram utilizados 5µl de solução tampão 10X (10X PCR Buffer minus Mg INVITROGEN), 1,5µl de cloreto de magnésio (50mM Magnesium Chloride INVITROGEN), 2µl de desoxinucleotídeos (100mM dNTP INVITROGEN), 0,5µl de polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase INVITROGEN), 50 pmoles (1µl) de cada iniciador e 34µl de H₂O (Ultrapure™ Distilled Water

GIBCO). Em termociclador (GeneAmp PCR System 2400 APPLIED BIOSYSTEMS) a solução final em volume de 50µl de cada amostra foi submetida a 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto.

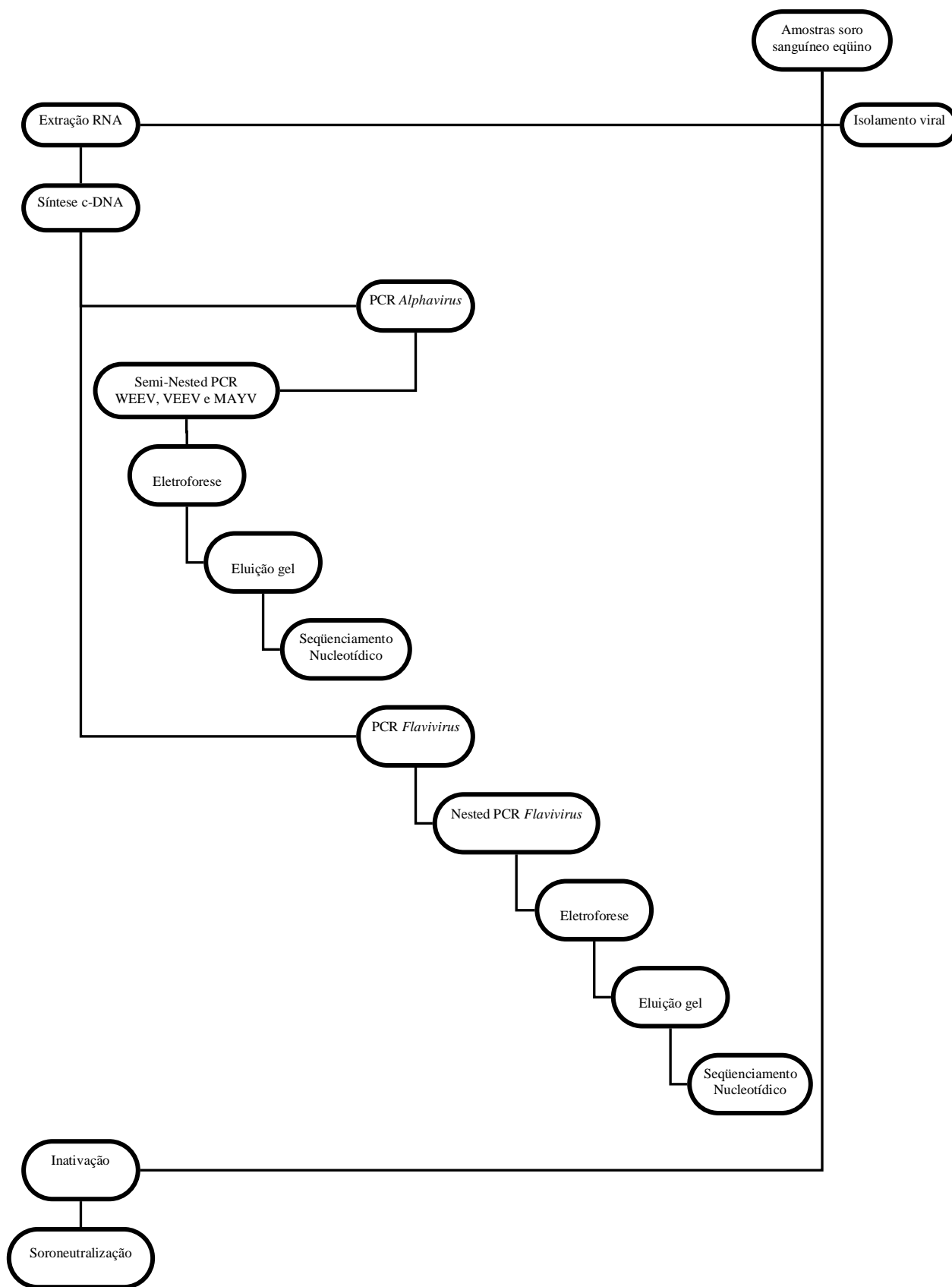
Após a primeira reação de amplificação, 5µl do produto de cada amostra foram submetidos a Nested PCR utilizando-se o iniciador interno degenerado senso FlagR1 e antisenso FlagF2 para amplificação de seqüência nucleotídica de 199 pares de bases (manuscrito em preparação) (Quadro 4.4). Para esta reação, foram utilizados os mesmos reagentes em mesmas concentrações e o mesmo número de ciclos e variações de temperatura e tempo, utilizadas para a primeira amplificação. Em virtude do fragmento específico esperado de 199 pb, o produto amplificado de cada suspensão viral foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida 10% corado com brometo de etídeo e posteriormente visualizados em transiluminador ultravioleta. Assim como previamente descrito para amostras virais controle e produtos da PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* das amostras de soro sanguíneo eqüino, as amostras em que seqüências nucleotídicas de tamanho aproximado ao específico foram visualizados, foram submetidas à eluição de gel para captura dos oligonucleotídeos seguida por quantificação do produto e reação cíclica de seqüenciamento nucleotídico (Organograma 4.3).

Seqüências nucleotídicas de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> em amostras de soro sangüíneo eqüino	Amplicon (pb)	Genoma alvo
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (M2W-F) 5`[y]ag agc dtt ttc gca [y]st rgc hw 3`	434	(PCR) <i>Alphavirus</i>
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (nWEEV-F) 5`ggc ggc aga cct gct gga a 3` (nMAYV-F) 5`gga agt tgg cca agg c 3` (nVEEV-F) 5`acg gag gta gac cca tcc ga 3`	208 270 400	(Semi-Nested PCR) WEEV MAYV VEEV

Quadro 4.3 - Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* em amostras de soro sangüíneo eqüino.

Seqüências nucleotídicas de iniciadores utilizados para PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i> em amostras de soro sangüíneo eqüino	Amplicon (pb)	Genoma alvo
(FlagR2) 5`tgt cca cts ccc ctt tgr tct 3` (FlagF1) 5`aca tga tgg gra aam gwg aga 3`	453	(PCR) <i>Flavivirus</i>
(FlagR1) 5`tcc cai ccg gck gtg tca tc 3` (FlagF2) 5`gcc atw tgg twc atg tgg 3`	199	(Nested PCR) <i>Flavivirus</i>

Quadro 4.4 - Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus* em amostras de soro sangüíneo eqüino.



Organograma 4.3 - Seqüência dos eventos realizados em amostras de soro sanguíneo eqüino.

4.3.4 **Amostras de artrópodes**

4.3.4.1 Isolamento viral das amostras de artrópodes

Os artrópodes capturados e coletados foram separados em grupos específicos de até 50 espécimes de culicídeos e dez espécimes de ixodídeos e submetidos a isolamento viral através de inoculação em tubos de cultura de células VERO, em mesmas condições utilizadas para isolamento viral a partir de amostra de soro sanguíneo equino. Após o desprezo do meio de crescimento por derramamento, aos tubos foram adicionados 200µl da suspensão em BA-1 modificado dos grupos triturados. Após a inoculação os tubos foram submetidos à metodologia utilizada para isolamento viral a partir de amostra de soro sanguíneo equino. A ausência de ECP ao final de três inoculações foi considerada ausência de vírus citopatogênicos na amostra.

4.3.4.2 Duplex PCR

Após extração de RNA e construção de c-DNA realizadas como previamente descrito para amostras virais controle, as amostras de artrópodes compostas por 75 grupos de culicídeos e 18 de ixodídeos foram submetidas à PCR de gênero utilizando-se simultaneamente os iniciadores cM3W, M2W, FG1 e FG2 com o objetivo de se amplificar um fragmento conservado em *Alphavirus* e *Flavivirus*, como previamente descrito por Bronzoni *et al.* (2005). À exceção dos iniciadores, nesta reação foram utilizados os mesmos reagentes em mesmas concentrações e o mesmo número de ciclos e variações de temperatura e tempo utilizadas para amplificação de fragmento genérico das amostras virais controle.

4.3.4.3 Semi-Nested PCR para *Alphavirus* e *Flavivirus*

O produto da Duplex PCR de cada amostra foi submetido a Semi-Nested PCR para os dois gêneros virais em reações separadas. Na reação de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* foram utilizados 100 pmoles (2µl) do iniciador degenerado antisense cM3W-R simultaneamente a 50 pmoles (1µl) de cada iniciador senso nWEEV-F, nMAYV-F e nVEEV-F. Na reação de Semi-Nested PCR para *Flavivirus* foram utilizados 100 pmoles (2µl) do iniciador senso de *Flavivirus* FG1-F e 50 pmoles (1µl) dos iniciadores antisense nILHV-R, nROCV-F, nYFV-R e nSLEV-R. À exceção dos iniciadores, nestas reações foram utilizados os mesmos reagentes em mesmas

concentrações e o mesmo número de ciclos e variações de temperatura e tempo, utilizadas na Duplex PCR. Após a realização das reações de Semi-Nested PCR, os produtos amplificados das amostras foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Como previamente descrito para seqüenciamento de amostras virais controle, as amostras suspeitas neste ensaio foram submetidas à eluição do gel, quantificação de produtos e reação de seqüenciamento (Quadro 4.5).

4.3.4.4 PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus*

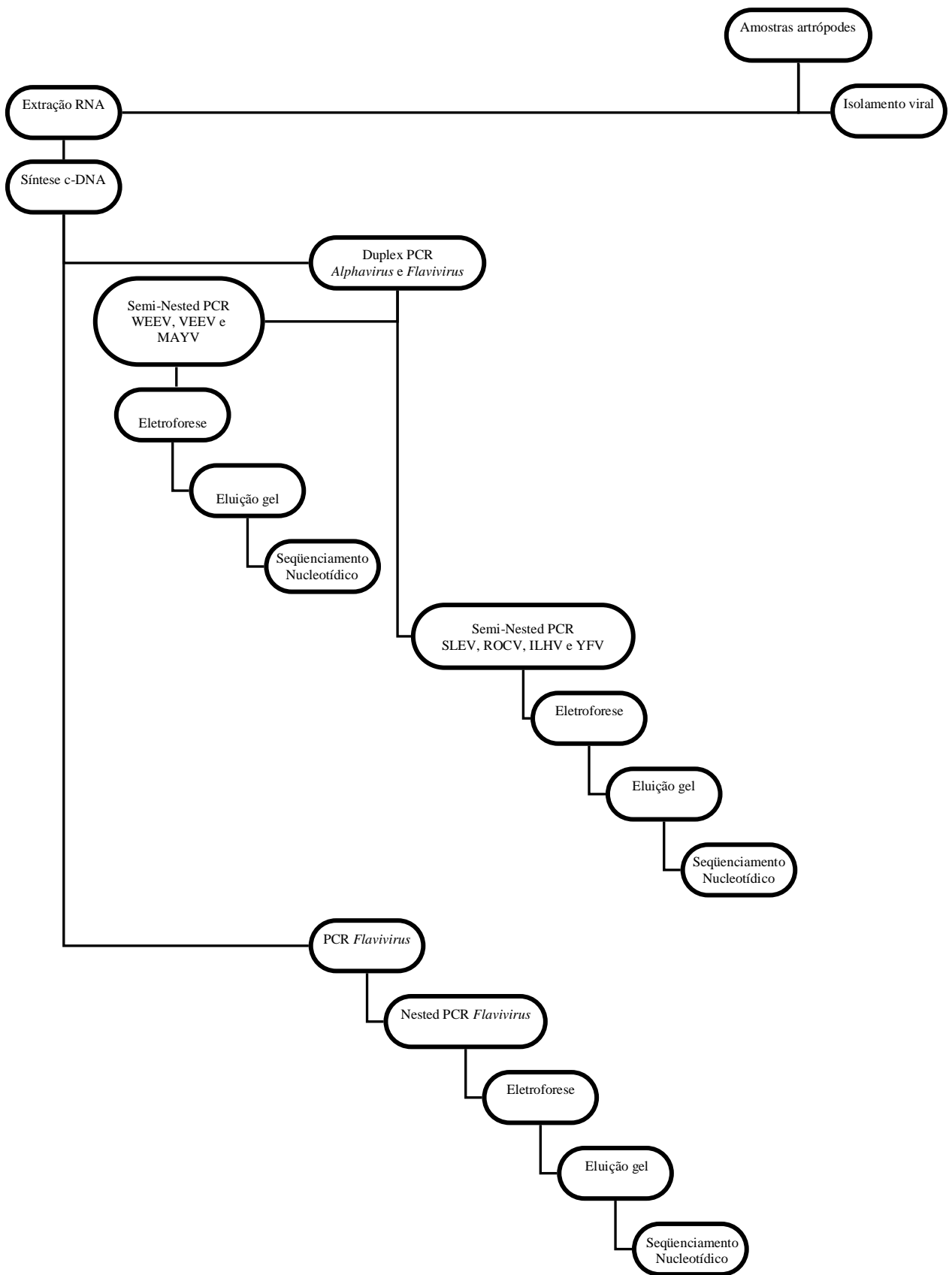
Após extração de RNA e síntese de c-DNA como previamente descrito para as amostras virais, o c-DNA de 75 grupos de culicídeos e 18 de ixodídeos foi submetido a PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus*, utilizando-se os mesmos iniciadores, ciclos e reagentes previamente descritos para pesquisa de *Flavivirus* em amostras de soro sanguíneo eqüino (Quadro 4.6). As amostras de artrópodes em que sequências nucleotídicas de tamanho aproximado ao específico foram visualizados após eletroforese, foram submetidas à eluição de gel para captura dos oligonucleotídeos seguida por quantificação do produto e reação cíclica de seqüenciamento nucleotídico, como descrito para as amostras de soro sanguíneo eqüino (Organograma 4.4) (Quadro 4.7).

Seqüências nucleotídicas de iniciadores utilizados para Duplex PCR seguida de Semi-Nested PCR para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i> em amostras de artrópodes	Amplicon (pb)	Genoma alvo
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (M2W-F) 5`[y]ag agc dtt ttc gca [y]st rgc hw 3` (FG2-R) 5`gtg tcc cat cct gct gtg tca tca gca tac a 3` (FG1-F) 5` tca agg aac tcc aca cat gag atg tac t 3`	434	(Duplex PCR) <i>Alphavirus</i> <i>Flavivirus</i>
(cM3W-R) 5`aca tra ank gng tng trt cra anc cda [y]cc 3` (nWEEV-F) 5`ggc ggc aga cct gct gga a 3` (nMAYV-F) 5`gga agt tgg cca agg c 3` (nVEEV-F) 5`acg gag gta gac cca tcc ga 3`	208 270 400	(Semi-Nested PCR) WEEV MAYV VEEV
(FG1-F) 5` tca agg aac tcc aca cat gag atg tac t 3` (nILHV-R) 5` tcc acc gct gat ctg agc ccg tga 3` (nROCV-R) 5` tca ctc ttc agc ctt tgc 3` (nYFV-R) 5` tca gaa gac caa gag gtc atg t 3` (nSLEV-R) 5`att ctt ctc tca atc tcc gt 3`	474 230 253 232	(Semi-Nested PCR) ILHV ROCV YFV SLEV

Quadro 4.5 - Lista de iniciadores utilizados para Duplex PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* e *Flavivirus* em amostras de artrópodes.

Seqüências nucleotídicas de iniciadores utilizados para PCR seguida de Nested PCR para <i>Flavivirus</i> em amostras de artrópodes	Amplicon (pb)	Genoma alvo
(FlagR2) 5`tgt cca cts ccc ctt tgr tct 3` (FlagF1) 5`aca tga tgg gra aam gwg aga 3`	453	(PCR) <i>Flavivirus</i>
(FlagR1) 5`tcc cai ccg gck gtg tca tc 3` (FlagF2) 5`gcc atw tgg twc atg tgg 3`	199	(Nested PCR) <i>Flavivirus</i>

Quadro 4.6 - Lista de iniciadores utilizados para PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus* em amostras de artrópodes.



Organograma 4.4 - Seqüência de eventos nas análises realizadas em amostras de artrópodes.

	Amostras virais controle	Amostra de soro sanguíneo equino	Amostra de culicídeos	Amostra de ixodídeos
Extração de RNA por kit comercial	●	●	●	●
Síntese de c-DNA com iniciadores aleatórios	●	●	●	●
Duplex PCR para <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i> (FG1 e FG2 e cM3W e M2W)			●	●
PCR para <i>Flavivirus</i> (FG1 e FG2)	●			
PCR para <i>Alphavirus</i> (M2W e cM3W)	●	●		
Semi-Nested para <i>Alphavirus</i> (cM3W e nWEEV, nVEEV, nMAYV)	●	●	●	●
Semi-Nested PCR para <i>Flavivirus</i> (FG1 e nROCV, nILHV, nYFV e nSLEV)	●		●	●
PCR para <i>Flavivirus</i> (F1 e R2)	●	●	●	●
Nested PCR para <i>Flavivirus</i> (F2 e R1)	●	●	●	●
Isolamento viral		●	●	●
Soroneutralização		●		

Quadro 4.7 - Sumário das análises realizadas. As áreas marcadas referem-se a realização da referida análise.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS VIRAIS CONTROLE

5.1.1 **Confirmação da identidade por seqüenciamento nucleotídico**

5.1.1.1 Vírus da encefalite eqüina do oeste (WEEV)

A seqüência nucleotídica do gene de proteína não estrutural 1 da amostra de WEEV utilizada no presente estudo como controle, apresentou 95% de homologia a WEEV 71V-1658 (Acesso AF214040.1) (Netolitzky *et al.*, 2000).

5.1.1.2 Vírus Mayaro (MAYV)

A seqüência nucleotídica do gene de proteína não estrutural 1 da amostra MAYV utilizada no presente estudo como controle, apresentou 95% de homologia a MAYV MAYLC da Guiana Francesa (Acesso DQ001069.1) (Lavergne *et al.*, 2006).

5.1.1.3 Vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV)

A seqüência nucleotídica do gene de proteína não estrutural 1 da amostra de EEEV utilizada no presente estudo como controle, apresentou homologia de 99% a EEEV (Acesso X63135.1) (Volchkov, Volchkova & Netesov, 1991).

5.1.1.4 Vírus da encefalite de St Louis (SLEV)

A seqüência nucleotídica do gene NS5 da amostra de SLEV utilizada no presente estudo como controle, apresentou homologia de 98% a SLEV Kern 217 (Acesso EU099354.1) (Hull & Tavakoli, 2007).

5.2 AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO EQUÍNO

5.2.1 Soroneutralização (NT)

Foram considerados soropositivos os animais em que uma alíquota de 50µl do soro sanguíneo inativado em diluição maior ou igual a 1:8 preservou a integridade da monocamada celular em presença de 50µl da suspensão viral a 100 CCID₅₀.

Para facilitar a compreensão dos resultados de NT das amostras de soro sanguíneo equíno, o perfil de soropositividade dos animais avaliados está descrito em sequência.

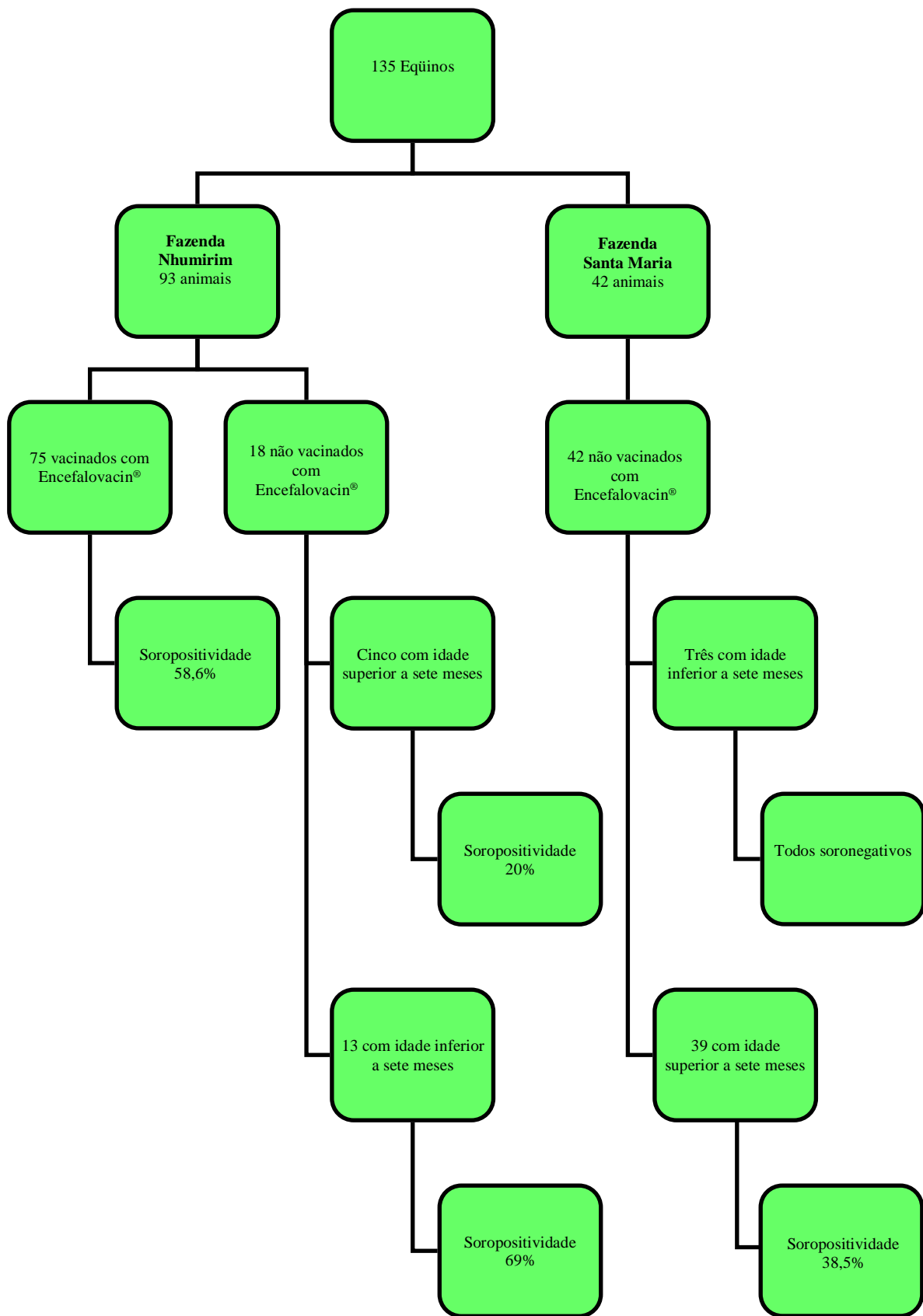
5.2.1.1 Vírus da encefalite eqüina do oeste (WEEV)

Dos 135 cavalos pertencentes às duas fazendas avaliadas, o NT com WEEV detectou soropositividade em 69, correspondendo a 51% dos animais. Dos 93 animais pertencentes à Fazenda Nhumirim, 54 (58,1%) apresentaram soropositividade para WEEV. Entretanto entre os animais pertencentes a esta propriedade, 75 haviam sido imunizados em maio de 2006 com a vacina bivalente Encefalovacín[®], que segundo o fabricante é composta por isolados brasileiros de WEEV e EEEV inativados. Entre estes animais, todos apresentavam idade acima de sete meses no momento da coleta sanguínea e 44 (58,6%) apresentaram soropositividade para WEEV (Gráfico 5.5).

Dos 18 animais pertencentes à Fazenda Nhumirim que não receberam a vacina em maio de 2006 porque ainda não haviam nascido ou porque apresentavam menos de um mês de vida no dia da imunização, dez (55,5%) apresentaram soropositividade para WEEV. Contudo, destes 18 animais não imunizados, 13 apresentavam menos de sete meses de idade no momento da coleta sanguínea e destes, nove (69%) apresentaram soropositividade para WEEV. Dos cinco animais não imunizados e com idade superior a sete meses no momento da coleta, apenas um apresentou anticorpos anti-WEEV, correspondendo a 20% deste grupo de animais.

Com relação aos animais da Fazenda Santa Maria, foram venopuncionados 42 animais sem histórico de vacinação contra encefalite eqüina, sendo três com idade inferior a sete meses de idade no momento da venopunção. Destes 42 animais, 15 apresentaram soropositividade para WEEV, o que corresponde a 35,7% do total de animais venopuncionados e 38,5% destes animais com idade superior a sete meses no momento da venopunção. Nenhum dos três animais com idade inferior a sete meses apresentou soropositividade para WEEV (Organograma 5.1).

Do total de 60 animais não vacinados pertencentes às duas propriedades, 25 (41,7%) foram sororreativos. Entretanto, se considerarmos entre os animais não vacinados pertencentes às duas fazendas apenas aqueles com idade superior a sete meses no momento da venopunção, descontando assim os animais de eventual soropositividade passiva de origem materna, seriam 16 soropositivos entre 44 animais não vacinados pertencentes às duas propriedades, correspondendo a soropositividade de 36,4% (Gráfico 5.6). Entre estes 16 soropositivos, oito (50%) apresentaram título 1:8, dois (12,5%) 1:16, cinco (31,3%) 1:32, nenhum para 1:64, um (6,25%) 1:128 e nenhum para 1:256, 1:512, 1:1024 (Gráfico 5.4).



Organograma 5.1 - Animais soropositivos para WEEV de acordo com a propriedade, idade e vacinação.

5.2.1.2 Vírus Mayaro (MAYV)

Em todo o ensaio de soroneutralização utilizando-se alíquotas de soro sanguíneo equino inativadas em diluição 1:8 e suspensão MAYV em 100 CCID₅₀ foi observado a presença de ECP em cultura celular em até cinco dias de incubação. As 135 amostras foram consideradas soronegativas para MAYV.

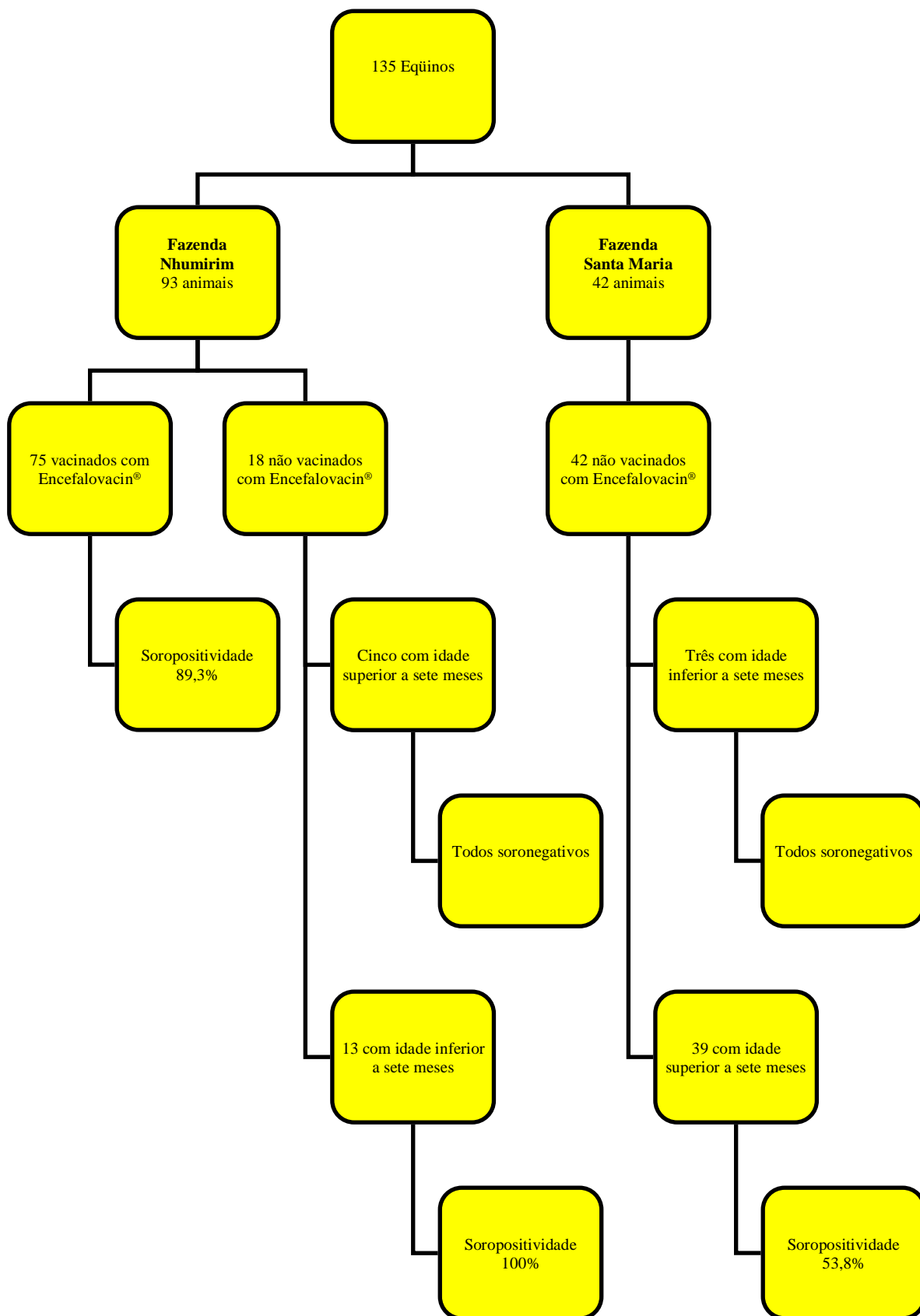
5.2.1.3 Vírus da encefalite eqüina do leste (EEEV)

Através do NT foi detectada soropositividade para EEEV em 101 cavalos, o que corresponde a 74,8% dos 135 animais estudados. Entre os 93 animais pertencentes à Fazenda Nhumirim, 79 (84,95%) apresentaram sororeatividade a EEEV. Entretanto, entre os animais desta propriedade, 75 haviam sido imunizados com Encefalovacín® e destes, 67 (89,3%) apresentaram soropositividade (Gráfico 5.5). Dos 18 animais pertencentes à Fazenda Nhumirim que não receberam a vacina em maio de 2006 porque ainda não haviam nascido ou porque apresentavam menos de um mês de vida no dia da imunização, a soropositividade para EEEV foi detectada em 13 animais, correspondendo a 72,2% deste grupo. Entre os animais não imunizados, 13 apresentavam menos de sete meses de idade no momento da venopunção e todos apresentaram soropositividade para EEEV. Dos cinco animais não imunizados e com mais de sete meses de idade no momento da venopunção, nenhum apresentou anticorpos anti-EEEV.

Com relação aos animais da Fazenda Santa Maria, foram venopuncionados 42 animais sem histórico de vacinação contra encefalite eqüina, sendo três com idade inferior a sete meses de idade no momento da venopunção. Destes 42 animais, 21 apresentaram soropositividade para EEEV, o que corresponde a 50% do total de animais venopuncionados e 53,8% destes animais com idade acima de sete meses no momento da venopunção. Nenhum dos três animais com idade inferior a sete meses apresentou soropositividade para EEEV (Organograma 5.2).

Do total de 60 animais não vacinados pertencentes às duas propriedades, 34 (56,6%) foram sororreativos. Entretanto, se considerarmos entre os animais não vacinados pertencentes às duas fazendas apenas aqueles com idade superior a sete meses no momento da venopunção, descontando assim os animais de eventual soropositividade passiva de origem maternal, seriam 21 soropositivos entre 44 animais não vacinados pertencentes às duas propriedades, correspondendo a soropositividade de 47,7% (Gráfico 5.6). Entre os soropositivos deste grupo, sete (33,2%)

apresentaram título de 1:8, um (4,8%) 1:16, um (4,8%) 1:32, dois (9,5%) 1:64, três (14,3%) 1:128, um (4,8%) 1:256, três (14,3%) 1:512 e três (14,3%) 1:1024 (Gráfico 5.4).



Organograma 5.2 - Animais soropositivos para EEEV de acordo com a propriedade, idade e vacinação.

5.2.1.4 Vírus da encefalite de St Louis (SLEV)

A soropositividade para SLEV foi detectada em 58 animais, correspondendo a 42,9% dos 135 avaliados. Entre os soropositivos, 21 (36,2%) apresentaram título 1:8, 16 (27,6%) 1:16, 14 (24,2%) 1:32, cinco (8,6%) 1:64, um (1,7%) 1: 128, um (1,7%) 1: 256 e nenhum apresentou título acima de 1:512.

Os animais soropositivos da Fazenda Nhumirim, com idade acima de sete meses no momento da coleta sanguínea, apresentavam 21, 17, 15, 14, 12, 11, nove, oito, sete, quatro e três anos de idade (Gráfico 5.7). Apesar da vacina utilizada em parte dos animais ser constituída apenas por *Alphavirus*, serão descritos os resultados a título de informação, entre animais vacinados e não vacinados. Entendemos que desta forma pode-se fazer uma análise de forma mais clara a respeito de eventuais reações cruzadas.

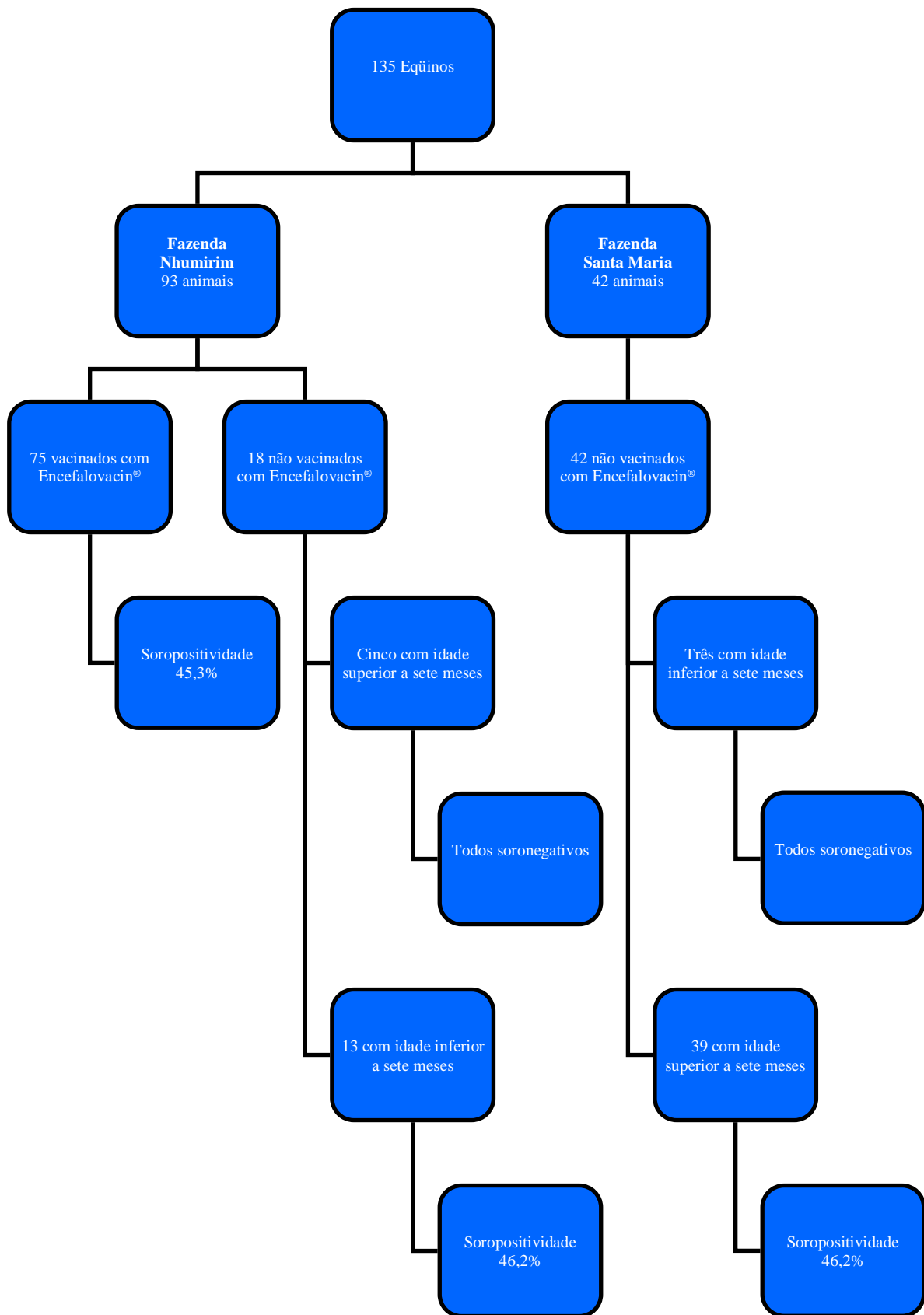
Dos 93 animais pertencentes à Fazenda Nhumirim, 40 (43%) apresentaram soropositividade para SLEV (Gráfico 5.8). Entre os animais pertencentes a esta propriedade, 75 haviam sido imunizados para *Alphavirus* e destes, 34 apresentaram soropositividade para SLEV, o que corresponde a 45,3% dos animais vacinados para o este outro gênero viral (Gráfico 5.5).

Dos 18 animais pertencentes à Fazenda Nhumirim não vacinados para *Alphavirus* em maio de 2006 porque ainda não haviam nascido ou porque apresentavam menos de um mês de vida no dia da imunização, seis apresentaram soropositividade para SLEV, correspondendo a 33,3% deste total. Todavia, destes 18 animais não imunizados, 13 apresentavam menos de sete meses de idade no momento da coleta sanguínea e seis apresentaram soropositividade correspondendo a 46,2% destes animais. Dos cinco animais não imunizados e com mais de sete meses de idade no momento da coleta, nenhum apresentou anticorpos anti-SLEV.

Com relação aos animais da Fazenda Santa Maria, foram venopuncionados 42 animais sem histórico de vacinação contra encefalite eqüina, sendo três com idade inferior a sete meses de idade no momento da venopunção. Destes 42 animais, 18 apresentaram soropositividade para SLEV, o que corresponde a 42,9% do total de animais venopuncionados (Gráfico 5.8) e 46,2% destes animais com idade superior a sete meses no momento da venopunção. Nenhum dos três animais com idade inferior a sete meses apresentou soropositividade para SLEV (Organograma 5.3).

Do total de 60 animais não imunizados para *Alphavirus* pertencentes às duas propriedades, 24 foram sororreativos, correspondendo a 40% deste total. Entretanto, se considerarmos entre os animais não vacinados para *Alphavirus* pertencentes às duas fazendas apenas aqueles com idade

superior a sete meses no momento da venopunção, descontando assim os animais de eventual soropositividade cruzada de origem maternal, seriam 18 soropositivos entre 44 animais não vacinados pertencentes às duas propriedades, correspondendo a soropositividade de 40,9% (Gráfico 5.6). Entre os 52 animais vacinados ou não com idade superior a sete meses, 19 (36,5%) apresentaram título de 1:8, 13 (25%) 1:16, 13 (25%) 1:32, cinco (9,6%) 1:64, um (1,9%) 1:128, um (1,9%) 1:256 e nenhum para 1:512 e 1:1024.



Organograma 5.3 - Animais soropositivos para SLEV de acordo com a propriedade, idade e vacinação.

5.2.1.5 Soropositividade para mais de um vírus

Dos 135 animais avaliados, 113 (84%) apresentaram soropositividade para ao menos um dos três vírus utilizados (Gráfico 5.1). Entre estes, 64 (56,6%) apresentaram soropositividade simultaneamente para WEEV e EEEV, 36 (31,8%) para WEEV e SLEV, 51 (45,1%) para EEEV e SLEV e 33 (29,2%) para EEEV, SLEV e WEEV. A presença de anticorpos exclusivamente para um vírus foi detectada em quatro animais para WEEV, 21 para EEEV e sete para SLEV (Gráfico 5.2).

Entre os 60 animais não vacinados, 45 (75%) apresentaram soropositividade. Entre os soropositivos, 21 (46,6%) apresentaram soropositividade simultaneamente para WEEV e EEEV, dez (22,2%) para WEEV e SLEV, 16 (35,5%) para EEEV e SLEV e oito (17,8%) para os três vírus.

Com relação aos 16 animais não vacinados com idade inferior a sete meses no momento da coleta, 13 (81,25%) apresentaram soropositividade. Entre estes, nove (69,2%) simultaneamente para WEEV e EEEV, cinco (38,5%) para WEEV e SLEV, seis (46,1%) para EEEV e SLEV e cinco (38,5%) para os três vírus.

Entre os 44 animais não vacinados e com idade superior a sete meses no momento da coleta, 32 (72,7%) apresentaram soropositividade. Entre estes, 12 (37,5%) simultaneamente para WEEV e EEEV, cinco (15,6%) para WEEV e SLEV, dez (31,6%) para EEEV e SLEV e quatro (12,5%) para os três vírus. A presença neste grupo, de anticorpos exclusivamente para um vírus foi detectada em dois animais para WEEV, três para EEEV e sete para SLEV (Gráfico 5.3).

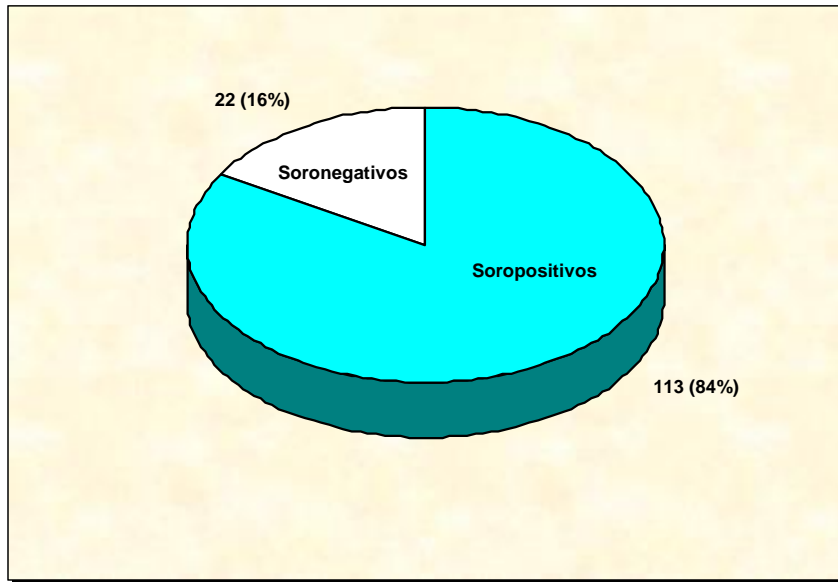


Gráfico 5.1 - Soropositividade das amostras de soro sanguíneo equino.

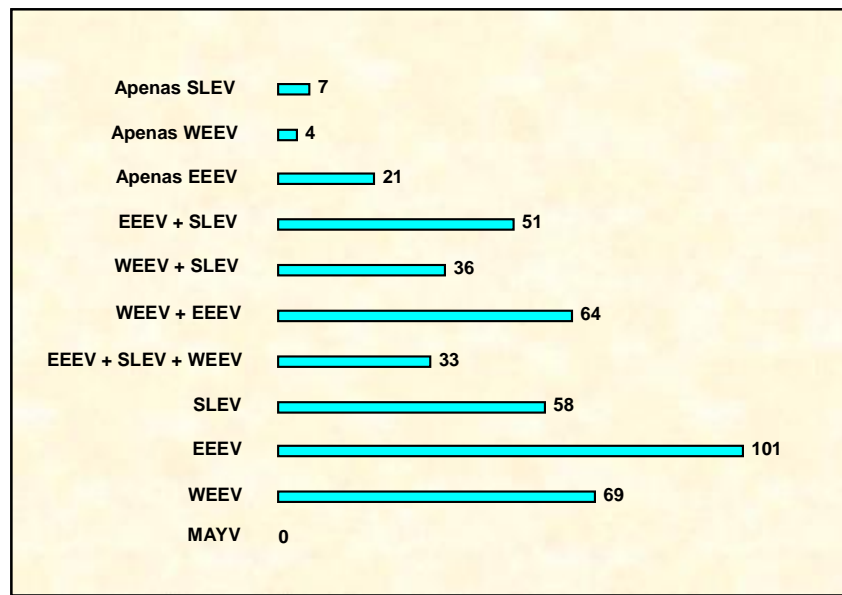


Gráfico 5.2 - Número absoluto de equinos soropositivos.

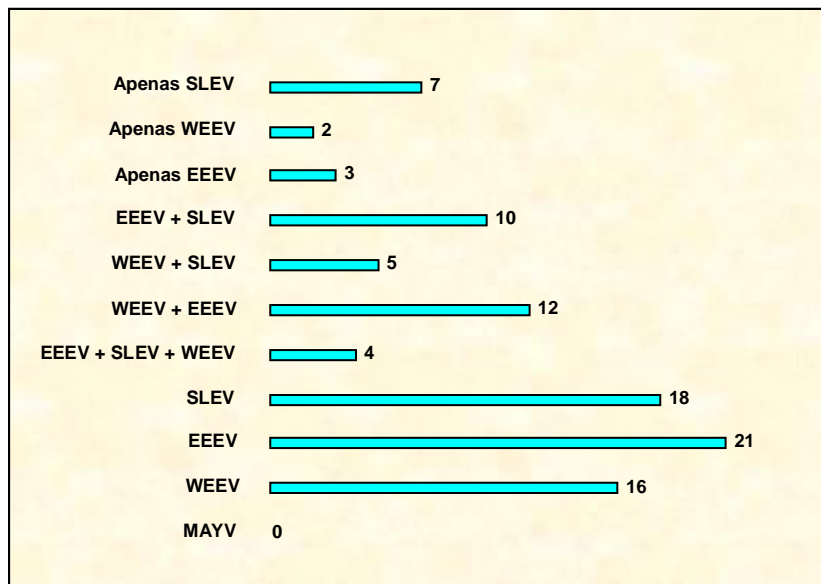


Gráfico 5.3 - Número absoluto de equinos soropositivos com idade superior a sete meses e não vacinados com Encefalovacín®.

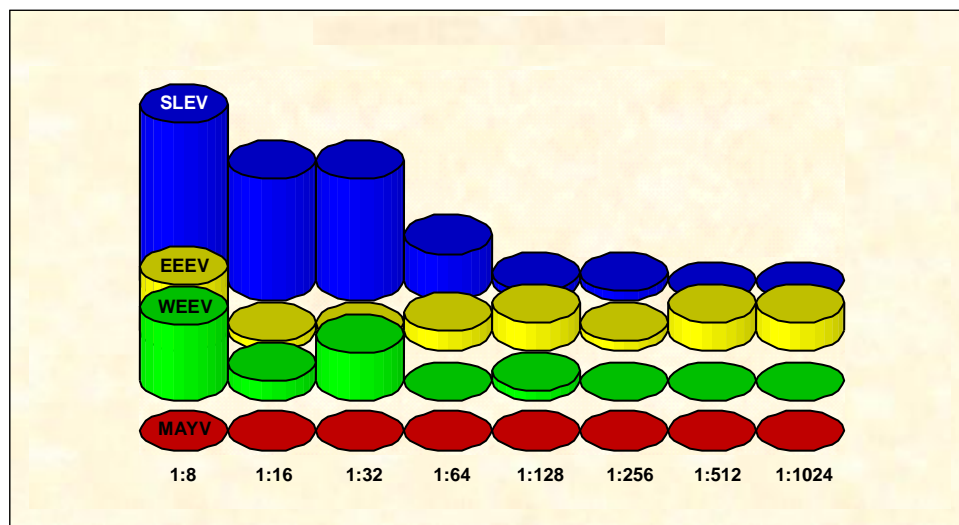


Gráfico 5.4 - Distribuição por título de anticorpos do número absoluto de equinos soropositivos com idade superior a sete meses e não vacinados com Encefalovacín®.

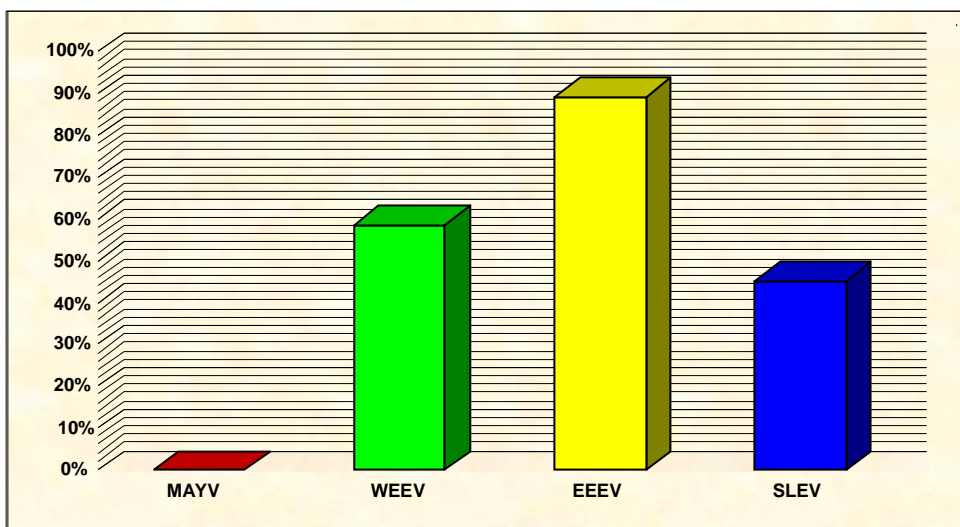


Gráfico 5.5 - Percentuais de soropositividade em equinos vacinados com Encefalovacín®.

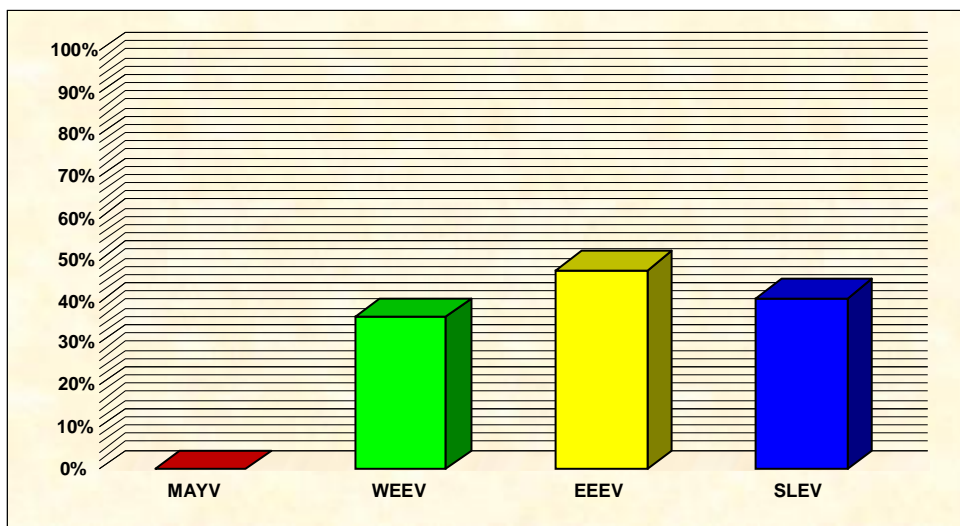


Gráfico 5.6 - Percentuais de soropositividade em equinos com idade superior a sete meses de idade e não vacinados com Encefalovacín®.

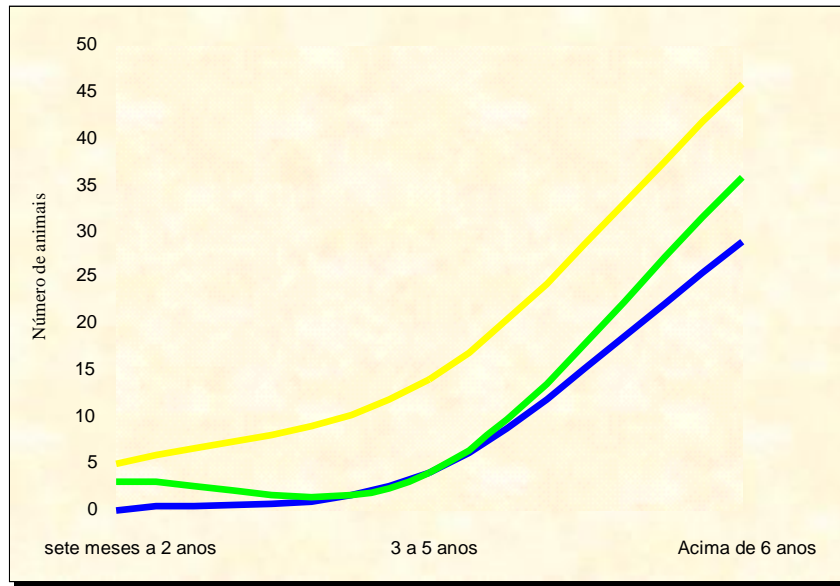


Gráfico 5.7 - Distribuição por idade de eqüinos soropositivos para EEEV (amarelo), WEEV (verde) e SLEV (azul) e vacinados com Encefalovacín®

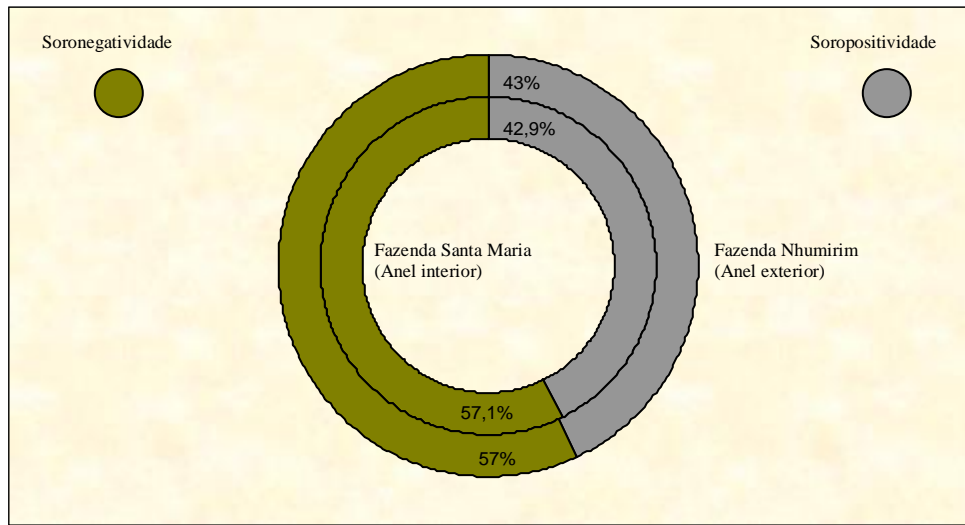


Gráfico 5.8 - Percentual de soropositividade para SLEV em eqüinos de acordo com a propriedade amostrada. Anel exterior Fazenda Nhumirim e anel interior Fazenda Santa Maria.

5.2.2 **Isolamento viral**

Não foram observados ECP ao final de três inoculações em tubos de cultura celular, de alíquotas de soro sanguíneo em diluição 1:10 de 135 eqüinos avaliados, as amostras foram consideradas em ausência de vírus citopatogênicos.

5.2.3 **PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus***

Foram realizadas PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* em um total de 41 (94 a 135) eqüinos analisados. Não houve amplificação das seqüências nucleotídicas específicas esperadas de 270 pb (MAYV), 208 pb (WEEV) e 400 pb (VEEV) com os iniciadores utilizados, nas amostras avaliadas (Foto 5.1 e 5.2).

5.2.4 **PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus***

Foram realizadas PCR seguidas de Nested PCR para *Flavivirus* em um total de 135 eqüinos analisados. Não houve amplificação da seqüência nucleotídica específica esperada de 199 pb (WNV, JEV, SLEV, YFV, DENV) com os iniciadores utilizados, nas amostras avaliadas (Foto 5.3 e 5.4).

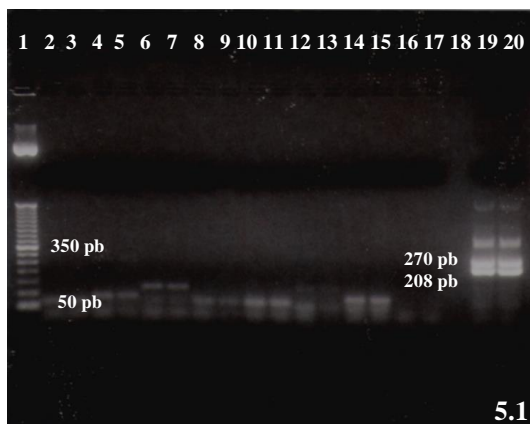


Foto 5.1 - Foto de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb, coluna 02 a 18 amostras negativas e colunas 19 e 20, controles positivos compostos por MAYV (270 pb) e WEEV (208 pb) juntos no mesmo poço.

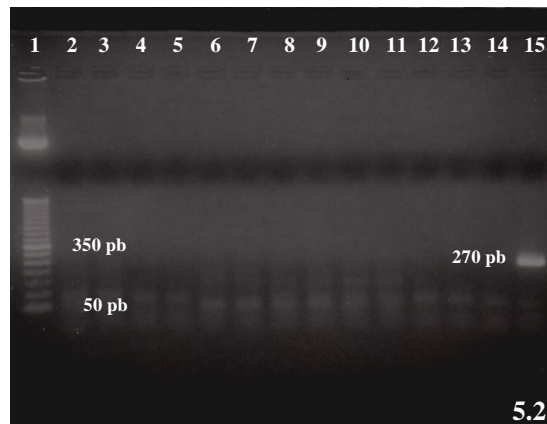


Foto 5.2 Foto de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb coluna 02 a 14 amostras negativas e coluna 15 controle positivo MAYV (270 pb).

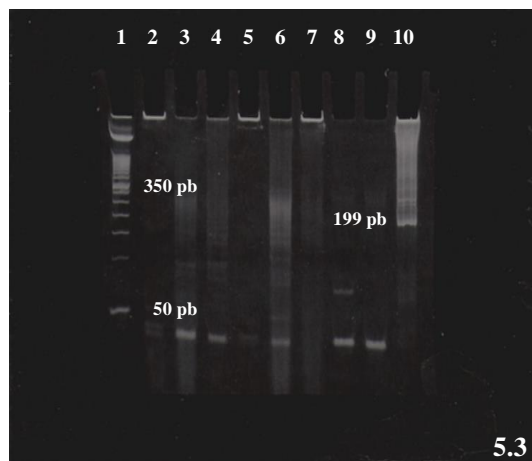


Foto 5.3 - Foto de gel de acrilamida a 10% corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb, coluna 02 a 09 amostras negativas e colunas 10, controle positivo SLEV (199 pb).

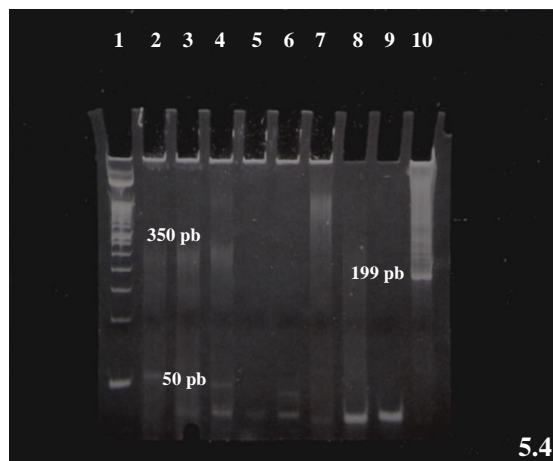


Foto 5.4 - Foto de gel de acrilamida a 10% corado com brometo de etídeo, na coluna 01 marcador molecular de 50 pb, coluna 02 a 09 amostras negativas e colunas 10, controle positivo SLEV (199 pb).

5.3 AMOSTRAS DE ARTRÓPODES

5.3.1 **Espécies de culicídeos identificadas em espécimes capturados**

Em fevereiro de 2007 foram capturados e coletados 2139 espécimes identificados a 17 espécies e três sub-gêneros (Gráfico 5.9 e 5.10). As identificações foram realizadas em campo, salvo para os espécimes de *Culex* identificados a *Culex (Culex)* Linnaeus, 1758, *Culex (Melanoconion)* Theobald, 1903 e *Culex (Microculex)* Theobald, 1907 realizadas no LabDip na cidade do Rio de Janeiro. Em novembro de 2007 foram capturados e coletados 1545 espécimes identificados a nove espécies e um sub-gênero (Gráfico 5.9 e 5.11). As identificações destes espécimes foram realizadas em campo até sub-família, sendo a classificação específica realizada no LabDip na cidade do Rio de Janeiro.

No total foram identificadas 22 espécies e três subgêneros, sendo 17 espécies e três subgêneros em espécimes capturados em fevereiro e nove espécies e um subgênero em novembro. As espécies *P. ferox*, *M. titillans*, *A. triannulatus* “sensu latu” e *A. albitarsis* “sensu latu” e o subgênero *C. (Melanoconion)* foram identificadas em amostragens realizadas nos dois períodos em que foram realizadas. Espécimes identificados a *P. albigenu* e *M. titillans* foram os mais identificados em fevereiro e novembro respectivamente, sendo *M. titillans* a espécie com o maior número de espécimes nos dois meses de coleta. Apesar da espécie *P. albigenu* ter sido identificada em mais de 50% dos exemplares capturados no mês de fevereiro, sendo a espécie de maior prevalência durante este período, a espécie não foi detectada em novembro do mesmo ano.

Fevereiro de 2007	Espécimes (%)	Novembro de 2007	Espécimes (%)
<i>Psorophora albigena</i> Peryassu, 1908	1196 (55,91)	<i>Mansonia titillans</i> Walker, 1848	1205 (78)
<i>Mansonia titillans</i> Walker, 1848	0514 (24,04)	<i>Anopheles triannulatus</i> Neiva & Pinto, 1922	0151 (9,77)
<i>Anopheles albitarsis</i> Lynch Arribalzaga, 1878	0137 (6,40)	<i>Psorophora ferox</i> Humboldt, 1819	0082 (5,31)
<i>Mansonia humeralis</i> Dyar & Knab, 1916	0074 (3,45)	<i>Psorophora discrucians</i> Walker, 1856	0043 (2,78)
<i>Culex</i> Linnaeus, 1758	0072 (3,37)	<i>Anopheles albitarsis</i> Lynch Arribalzaga, 1878	0030 (1,94)
<i>Coquillettidia juxtamansonia</i> Chagas, 1907	0034 (1,59)	<i>Culex declarator</i> Dyar & Knab, 1906	0022 (1,42)
<i>Culex (Culex)</i> Linnaeus, 1758	0030 (1,40)	<i>Mansonia amazonensis</i> Theobald, 1901	0005 (0,32)
<i>Anopheles</i> Meigen, 1818	0020 (0,93)	<i>Ochlerotatus stigmaticus</i> Edwards, 1922	0004 (0,26)
<i>Culex (Microculex)</i> Theobald, 1907	0014 (0,65)	<i>Culex chidesteri</i> Dyar, 1921	0002 (0,13)
<i>Anopheles triannulatus</i> Neiva & Pinto, 1922	0011 (0,51)	<i>Culex (Melanoconion)</i> Theobald, 1903	0001 (0,07)
<i>Culex (Melanoconion)</i> Theobald, 1903 spp.	0008 (0,37)		
<i>Culex quinquefasciatus</i> Say, 1823	0007 (0,33)		
<i>Ochlerotatus scapularis</i> (Rondani, 1848)	0006 (0,28)		
<i>Ochlerotatus argyrothorax</i> Bonne-Wepster & Bonne, 1919	0004 (0,19)		
<i>Psorophora ciliata</i> (Fabricius, 1794)	0003 (0,14)		
<i>Sabethes chloropterus</i> Humboldt, 1819	0002 (0,09)		
<i>Anopheles rondoni</i> Neiva & Pinto, 1922	0001 (0,05)		
<i>Psorophora ferox</i> Humboldt, 1819	0001(0,05)		
<i>Aedeomyia squamipennis</i> Lynch Arribalzaga, 1878	0001(0,05)		
<i>Sabethes albiprivus</i> Theobald, 1903	0001(0,05)		
<i>Sabethes purpureus</i> Theobald, 1907	0001(0,05)		
<i>Mansonia</i> Blanchard, 1901	0001(0,05)		
<i>Coquillettidia fasciolata</i> Lynch Arribalzaga, 1891	0001(0,05)		
Total	2139 (100)		1545 (100)

Quadro 5.1 - Espécies de Culicidae identificadas em espécimes capturados e coletados na Sub-região da Nhecolândia, no Pantanal de Mato Grosso do Sul em fevereiro e novembro de 2007.

5.3.1.1 Coleta durante hematofagia em eqüinos

Em fevereiro de 2007 em três coletas realizadas por uma hora em dias diferentes às 17:00h, 19:00h e 20:00h foram coletados através de aspiração por tubo de sucção oral para a coleta de culicídeos durante a hematofagia em eqüinos, espécimes identificados a *P. albigenu*, *M. humeralis*, *M. titillans*, *A. triannulatus*, *A. albitarsis* e *Culex* spp. Em novembro do mesmo ano, foram realizadas em mesmas condições duas coletas por uma hora em dias diferentes às 18:00h e foram coletados espécimes identificados unicamente a *M. titillans*.

5.3.1.2 Coleta durante hematofagia em membros da equipe

Em fevereiro de 2007 em seis coletas realizadas por uma hora em dias diferentes às 10:00h, 15:00h, 19:00h e 20:00h através da utilização de tubo de sucção oral para coleta de culicídeos durante hematofagia em membros da equipe, composta exclusivamente por membros do LabDip e LEV, foram coletados espécimes identificados a *P. albigenu*, *P. ferox*, *P. ciliata*, *S. chloropterus*, *S. albiprivus*, *S. purpureus*, *M. titillans*, *M. humeralis*, *O. scapularis*, *O. argyrothorax*, *A. triannulatus*, *A. albitarsis*, *C. juxtamansonia*, *C. fasciolata*, *C. quinquefasciatus* e *Culex* spp.. Em novembro do mesmo ano, em três coletas realizadas por uma hora em dias diferentes às 08:00h, 09:00h e 13:00h, em mesmas condições foram coletados espécimes identificados a *M. titillans*, *O. stigmaticus*, *P. ferox*, *P. discruciens* e *M. amazonensis*. Todas as coletas realizadas através da utilização de tubo de sucção oral para coleta de culicídeos em hematofagia em humanos foram realizadas em membros do LabDip e LEV, não tendo sido permitida a participação de nenhum trabalhador rural local.

5.3.1.3 Captura com a utilização da armadilha CDC®

Em fevereiro de 2007 em uma captura realizada com esta armadilha de 18:00h às 06:00h foram capturados espécimes identificados a *M. humeralis*, *M. titillans*, *Culex* sp. e *A. albitarsis*. Em novembro do mesmo ano foram realizadas com esta armadilha quatro capturas em dias diferentes de 18:00h às 06:00h e capturados espécimes identificados a *A. triannulatus*, *A. albitarsis*, *M. titillans*, *C. declarator*, *P. ferox* e *C. chidestri*.

5.3.1.3.1 *Captura de culicídeos acrodendrofílicos com armadilha CDC®*

Em novembro de 2007 foi realizada com esta armadilha a aproximadamente seis metros de altura em uma árvore em área de mata fechada, uma captura de 18:00h às 06:00h e capturados espécimes identificados a *A. triannulatus*, *M. titillans*, *C. declarator*. Espécimes identificados a *M. titillans* foram os mais capturados.

5.3.1.3.2 *Captura com armadilha CDC® no interior da residência de um trabalhador rural*

Em novembro de 2007 foi realizada uma captura com esta armadilha no interior da residência de um trabalhador rural, de 18:00h às 06:00h e capturados espécimes identificados a *A. triannulatus*, *M. titillans*, *C. declarator*. Espécimes identificados a *C. declarator* foram os mais capturados.

5.3.1.4 *Captura com armadilha Shannon*

Em fevereiro de 2007, em uma captura realizada de 19:00h às 20:30h com esta armadilha foram capturados espécimes identificados a *M. humeralis*, *P. ciliata*, *C. juxtamansonia*, *M. titillans*, *P. albigenu*, *A. squamipennis*, *Culex* sp., *A. rondoni*, *A. triannulatus* e *A. albitarsis*. Em novembro, em uma captura de 19:00h às 20:30h em mesmas condições, foram capturados espécimes identificados a *A. triannulatus*, *A. albitarsis*, *M. titillans*, *M. amazonensis*, *C. declarator*, *C. (Melanoconion)* sp..

5.3.1.5 Eficiência das técnicas utilizadas para captura e coleta de culicídeos

5.3.1.5.1 *Fevereiro de 2007*

Com relação às técnicas utilizadas para coleta e captura em fevereiro, a utilização de tubo de sucção oral para coleta de culicídeos durante hematofagia, apresentou o maior número de espécimes e a maior diversidade específica entre as técnicas utilizadas. Foram coletados espécimes identificados a 16 espécies em uma média de aproximadamente 262 exemplares por coleta quando utilizado em membros da equipe. A utilização da armadilha de Shannon foi a técnica onde se identificou o segundo maior número de espécies, foram identificadas dez espécies em média de captura de aproximadamente 95 exemplares por captura. Através da utilização de tubo de sucção oral para coleta de culicídeos durante hematofagia em equinos foram coletados 116 exemplares por coleta, identificados a seis espécies. A armadilha CDC® foi a técnica onde se identificou a menor diversidade específica entre as utilizadas, 100 exemplares por captura, identificados a quatro espécies.

5.3.1.5.2 *Novembro de 2007*

Com relação as técnicas utilizadas em novembro, a utilização da armadilha CDC® foi a técnica onde se identificou o maior número de espécimes e maior diversidade específica entre as utilizadas. Neste período foram identificadas seis espécies em uma média de 218 exemplares por captura. A armadilha de Shannon foi a técnica de segunda maior produtividade neste período, foram identificadas seis espécies em aproximadamente 159 exemplares por captura. A utilização de tubo de sucção oral durante hematofagia foi a técnica onde se coletou o menor número de espécimes e com menor diversidade específica. Os 26 exemplares por coleta foram identificados a apenas uma espécie, entretanto a utilização da técnica em membros da equipe demonstrou relativa diversidade específica, foram identificadas cinco espécies em 55 exemplares por coleta.

5.3.1.5.3 *Fevereiro e Novembro de 2007*

Com relação às técnicas utilizadas nos dois períodos, a utilização de tubo de sucção oral para coleta de culicídeos durante hematofagia em membros da equipe demonstrou ser a técnica de maior produtividade. Foram coletados espécimes identificados a 21 espécies em uma média de aproximadamente 193 exemplares por coleta. A utilização da armadilha de Shannon foi a técnica onde se identificou o segundo maior número de espécies nos exemplares capturados, foram identificadas 16 espécies em uma média de aproximadamente 127 exemplares por captura. A utilização da armadilha CDC® foi a técnica onde se identificou a terceira maior diversidade específica entre as utilizadas, em 195 exemplares por captura foi detectada a presença de espécimes identificados a dez espécies. A utilização de tubo de sucção oral para coleta de culicídeos durante hematofagia em equinos foi a técnica de menor produtividade, foram identificadas sete espécies em uma média de aproximadamente 76 exemplares por coleta.

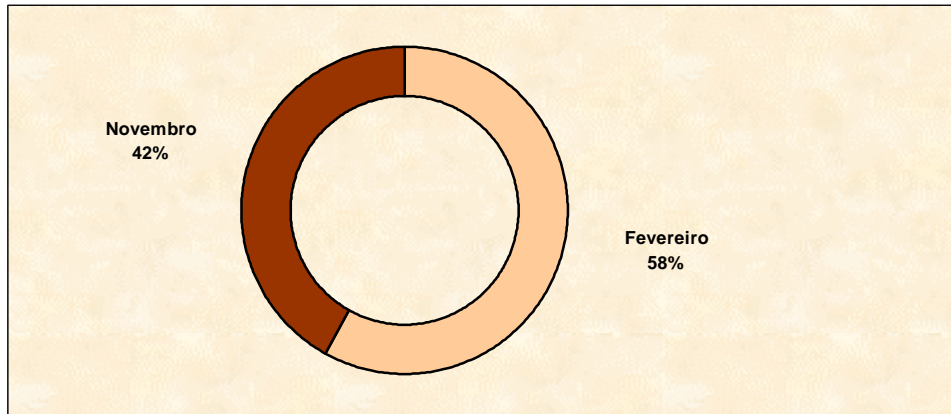


Gráfico 5.9 - Percentual de espécimes de culicídeos capturados e coletados nos dois períodos de amostragem.

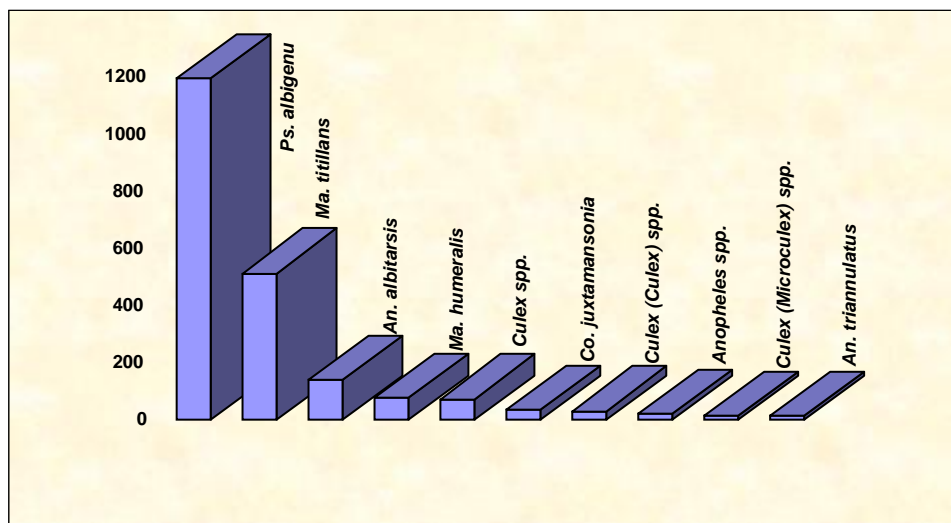


Gráfico 5.10 - Número de espécimes de culicídeos identificados às dez espécies de maior prevalência em fevereiro de 2007.

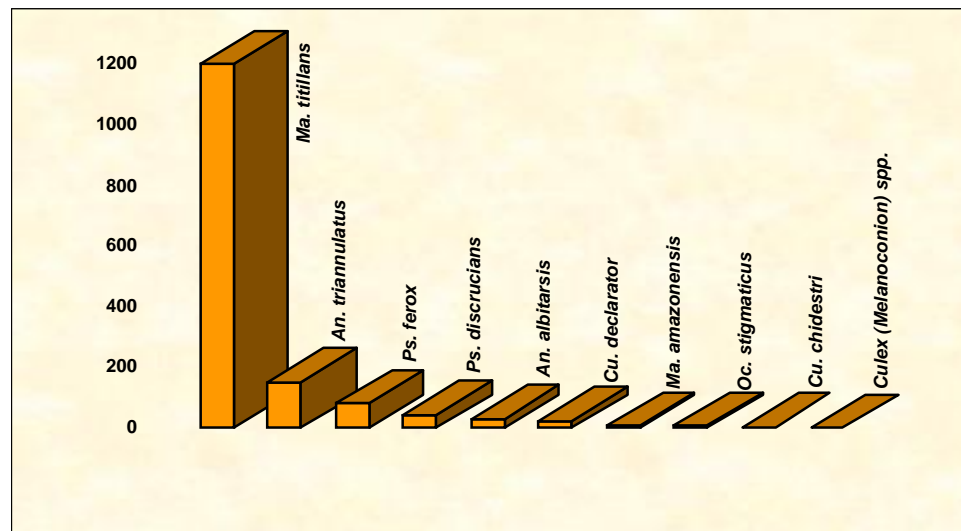


Gráfico 5.11 - Número de espécimes de culicídeos identificados às dez espécies de maior prevalência em novembro de 2007.

5.3.2 **Espécies de ixodídeos identificadas em espécimes capturados**

Em fevereiro de 2007 foram coletados 70 espécimes, sendo 15 machos e 15 fêmeas identificados à espécie *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) Koch, 1844 e 11 machos e 29 fêmeas identificadas à espécie *Anocentor nitens* (Neuman, 1897) Schulze, 1937. Os artrópodes estavam presentes em seis equinos fêmeas e dez machos dos 135 animais venopuncionados, correspondendo aproximadamente a 12% de parasitismo nos equinos avaliados

5.3.3 **Isolamento viral das amostras de artrópodes**

Foram submetidos ao isolamento viral, 1759 espécimes de artrópodes em 96 grupos. Deste total, 1689 espécimes em 78 grupos de culicídeos e 70 espécimes em 18 grupos de ixodídeos. Ao final de três inoculações em tubos de cultura celular, não foram observados ECP e as amostras foram consideradas em ausência de vírus citopatogênicos.

5.3.4 **Duplex PCR seguida de Semi-Nested PCR para *Alphavirus* e *Flavivirus* em amostras de artrópodes**

Foram realizadas Duplex PCR seguida de Semi-Nested PCR em um total de 96 grupos de artrópodes analisados. Não houve amplificação nas amostras avaliadas, das seqüências nucleotídicas específicas esperadas de 270 pb (MAYV), 208 pb (WEEV), 230 pb (ROCV), 253 pb (YFV), 232 pb (SLEV) e 474 pb (ILHV) com os iniciadores utilizados.

5.3.5 **PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus* em amostras de artrópodes**

Foi realizada PCR seguida de Nested PCR para *Flavivirus* em um total de 93 grupos de artrópodes analisados. Não houve amplificação nas amostras avaliadas, da seqüência nucleotídica específica esperada de 199 pb (WNV, JEV, SLEV, YFV, DENV) com os iniciadores utilizados.

O Pantanal da Nhecolândia, assim como a Sub-região do Paiaguás, representa a área de maior expressão geográfica na planície pantaneira (Adamoli, 1987). A Fazenda Nhumirim, base da pesquisa, apresenta uma fisionomia dominada por um mosaico de lagoas cercadas por faixas de mata densa, característica desta sub-região do Pantanal. Espécies da fauna encontradas na fazenda são representativas do Pantanal da Nhecolândia (Hamilton *et al.*, 1996), deixando de ocorrer espécies típicas de outros pantanais, reiterando a necessidade de mais estudos acerca da fauna culicidiana regional. Entretanto, estudos em sanidade equina demonstraram que a maioria das doenças identificadas nesta fazenda, também foi reportada por pesquisadores da Embrapa Pantanal em outras sub-regiões pantaneiras. Estes achados sugerem que os resultados sorológicos encontrados na fazenda talvez possam ser extrapolados para outras fazendas e até mesmo outras sub-regiões da planície (Brasil, 2008b), incutindo a necessidade de novos inquéritos sorológicos em outras sub-regiões da planície.

- ***Isolamento viral e RT-PCR em amostras de soro sanguíneo equino***

Com relação à avaliação das amostras de soro sanguíneo equino, os resultados encontrados durante as tentativas de detecção viral através de isolamento e PCR são corroborados por algumas limitações inerentes a este grupo de vírus. SLEV por exemplo raramente é isolado mesmo de pacientes humanos durante epidemia, segundo Tsai & Mitchell (1988) apesar do grande número de casos de infecção sintomática por este arbovírus na América do Norte, o isolamento viral a partir de indivíduos em fase aguda da doença só ocorreu seis vezes até 1988.

De um modo geral, a infecção pelos arbovírus estudados no presente trabalho se caracteriza por breve viremia em equinos, hospedeiros acidentais nestes ciclos virais. Para detecção molecular ou isolamento viral, seria necessária a coleta sanguínea durante a fase aguda da infecção, difícil de ser detectada em virtude da equinocultura extensiva a que é submetida a maioria dos animais da região. À exceção de epizootias, escassas informações a respeito da sanidade equina local dificultam a identificação de eventuais infecções sintomáticas isoladas entre os equinos. Assim, embora reconhecêssemos a dificuldade em se isolar vírus ou se detectar ácido ribonucleico viral em amostras de soro destes animais, os ensaios foram realizados, visando a detecção de eventual infecção aguda assintomática nestes animais.

- ***Sorologia em amostras de soro sanguíneo eqüino***

Em relação à sorologia realizada nos eqüinos, foram considerados resultados finais de soropositividade para os vírus estudados, aqueles obtidos a partir de amostras de animais não vacinados com Encefalovacín® e com idade superior a sete meses de idade, excluindo assim eventual soropositividade passiva e natural a partir de progenitoras artificialmente ou naturalmente imunizadas, como previamente descrito por Reisen & Monath (1988) e Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff (2002).

- ***Soroneutralização para vírus Mayaro***

A soronegatividade para MAYV em todos os animais avaliados sugere ausência da circulação viral nos animais amostrados. Entretanto, a detecção de soropositividade humana autóctone nos estados brasileiros de GO e MT associada a relatos de infecção em MS propõe a circulação viral na Região Centro-Oeste do Brasil (Neel *et al.*, 1968; Vasconcelos *et al.*, 1998; Coimbra *et al.*, 2007). A detecção de soropositividade para MAYV em espécimes de aves identificadas a 12 espécies de hábitos migratórios no RS, associada à observação de seis destas espécies no Pantanal, suscita um programa de vigilância para este arbovírus em regiões do Centro-Oeste brasileiro como o Pantanal (Brasil, 2003; Nunes & Tomas, 2004).

- ***Soroneutralização para vírus da encefalite eqüina do oeste***

Em ensaio de NT com WEEV, foi detectada soropositividade em 36,4% dos animais não vacinados e com idade acima de sete meses no momento da venopunção. Entretanto, vale ressaltar que com o passar do tempo, os anticorpos neutralizantes para WEEV podem diminuir a títulos indetectáveis resultando em soronegatividade de animais previamente infectados (Reisen & Monath, 1988). A soroprevalência encontrada no presente trabalho apresenta significativa diferença quando comparada à maioria dos resultados descritos na literatura. Nos EUA, em inquérito sorológico realizado entre 1942 e 1952 no estado da Califórnia, a soropositividade para WEEV foi detectada em 72% dos eqüinos avaliados (Reeves & Hamon, 1958). No mesmo país durante as décadas de 1940 e 1950, a soropositividade para WEEV foi detectada aproximadamente entre 10 e 100% dos animais avaliados, de acordo o local amostrado (Reisen & Monath, 1988).

Na América do Sul, em sorologia realizada em cinco províncias argentinas entre 1977 e 1980, através de PRNT e onde se utilizou dois isolados distintos de WEEV, Cba-87, isolado em

1958 e AG80-646, isolado em 1980, a soropositividade para WEEV foi detectada em 2% dos animais utilizando-se Cba-87 e em 18% utilizando-se AG80-646 (Monath *et al.*, 1985). Além da diferença entre os isolados utilizados, o percentual de animais positivos variou consideravelmente em relação à província amostrada.

Utilizando-se AG80-646, isolado de culicídeos na província Chaco, foi detectada soropositividade em 18% dos animais das quatro províncias amostradas, no entanto se avaliarmos a soropositividade apenas em animais da província de Chaco, onde se isolou o vírus, a soropositividade detectada é de 30%. Cabe salientar que a província argentina de Chaco situa-se na grande Bacia Hidrográfica do Paraná na planície platina assim como Pantanal brasileiro.

Em inquérito sorológico realizado através de HI com 500 eqüinos no RJ por Bruno-Lobo *et al.* (1961) a soropositividade para WEEV foi detectada, pela primeira vez no país, em 22,2% dos animais avaliados.

Todavia, a maior diferença encontrada na literatura em relação à soropositividade no presente trabalho foi o com inquérito sorológico realizado na mesma Sub-região da Nhecolândia em 1992, por Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros (1993). O grupo detectou através de HI e NT a soropositividade para WEEV em apenas 1,2% dos animais avaliados.

Apesar da ausência de relatos de infecção sintomática por WEEV em eqüinos no Pantanal da Nhecolândia, a diferença de soroprevalência para este arbovírus detectada em 1,2% de um grupo de animais não vacinados venopuncionados em 1992 (Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros, 1993) e em 41,7% dos animais não vacinados venopuncionados no presente trabalho, sugere manutenção e relevante aumento da circulação arboviral entre eqüinos na Sub-região da Nhecolândia do Pantanal brasileiro indicando a necessidade de um sistema de vigilância epizootiológica para estes arbovírus em eqüinos da região.

Com relação aos animais vacinados, a soropositividade detectada no inquérito argentino e no presente estudo, variou consideravelmente. Dos 75 animais vacinados avaliados na Sub-região da Nhecolândia pelo presente estudo, 58,6% eram soropositivos, enquanto entre os 31 animais argentinos a soropositividade foi detectada por Monath *et al.* (1985) em apenas 9,6%. Todavia a ausência de informações a respeito da vacinação dos animais argentinos dificulta discussão mais aprofundada a respeito da diferença de resposta imunológica entre os animais.

Em estudo realizado por Waldridge *et al.* (2003) para se avaliar a resposta vacinal em eqüinos inoculados com vacina trivalente inativada Equiloid® (Fort Dodge Animal Health), composta por EEEV, WEEV e toxina tetânica, foi verificado através de ensaio de HI que após a vacinação, alguns animais apresentaram diminuição do nível sérico de anticorpos chegando até a

depleção total destas proteínas sete meses após a vacinação. Embora a vacina utilizada no estudo de Waldrige *et al.* (2003) não seja a mesma da utilizada pela Fazenda Nhumirim, proprietária dos animais vacinados avaliados, ambas são constituídas de WEEV e EEEV e o resultado descrito por seu grupo corrobora os resultados encontrados no Pantanal.

Em nosso estudo, realizado através de NT, 41,4% dos animais vacinados não apresentaram anticorpos neutralizantes para WEEV. O que pode ser explicado através dos resultados de Waldrige *et al.* (2003), uma vez que os animais por nós utilizados haviam sido vacinados em maio de 2006, nove meses antes da venopunção. Em outra observação interessante, o estudo conduzido pelo grupo reitera experimentalmente que animais previamente vacinados para EEEV e WEEV não se tornam soropositivos para SLEV indicando que a vacinação regular contra encefalite eqüina não interfere em futuros HI para *Flavivirus*. Entre nossos animais, os resultados da NT para SLEV, não revelam diferenças significativas entre soropositividade para o *Flavivirus* em animais vacinados e não vacinados para encefalite viral.

A detecção de soropositividade para WEEV associada ao significativo aumento da soroprevalência para o arbovírus em eqüinos da Sub-região da Nhecolândia, quando comparado ao inquérito sorológico realizado em 1993, indica a necessidade de implantação de um sistema de vigilância epizootiológica para estes arbovírus em eqüinos no Pantanal de MS.

- ***Soroneutralização para vírus da encefalite eqüina do leste***

De um total de 44 animais não vacinados e com mais de sete meses de idade no momento da coleta sanguínea, 21 foram sororeativos para EEEV o que corresponde a 47,7% dos animais não imunizados. Este resultado, à semelhança do observado para WEEV, demonstra soropositividade maior do que a maioria das descrições de inquéritos sorológicos realizados na América do Sul, por nós consultadas.

Na Argentina, em estudo sorológico realizado no final da década de 1970, a avaliação de 892 animais pertencentes a cinco províncias detectou a sororreatividade em 11,1% (Monath *et al.*, 1985).

No Brasil, Lennette & Fox (1943) no primeiro inquérito sorológico para encefalite eqüina em cavalos brasileiros identificaram soropositividade de 18,4% dos eqüinos avaliados em MG. Anos mais tarde no RJ, Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo (1961) detectaram a presença de anticorpos para EEEV através de HI, em 10% das amostras avaliadas. Em um inquérito sorológico realizado por Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros (1993) também na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal de MS no início da década de 1990, foi identificada

soropositividade em 6,7% dos 432 animais avaliados, um percentual de expressiva diferença com a soropositividade detectada no presente estudo em 2007.

Entretanto à semelhança do inquérito realizado na Argentina, os resultados variaram entre as fazendas utilizadas para as coletas. Entre os animais venopuncionados pertencentes à Fazenda Alegria, vizinha à Fazenda Nhumirim utilizada no presente trabalho, o percentual de soropositividade para EEEV foi de 11,2%.

Vale ressaltar também que em 1992 foi detectado e confirmado por Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros (1993) na Fazenda Nhumirim, um dos locais de coleta do presente estudo, um caso de infecção por EEEV em um animal com sinais e sintomas sugestivos de encefalite. Entre os animais avaliados por nosso grupo em 2007, três haviam nascido antes de 1990 e provavelmente estavam na fazenda durante o acometimento do equino. Em relação a estes animais, todos apresentaram soropositividade para EEEV.

Apesar da diferença de soropositividade entre alguns inquéritos sorológicos, a detecção de 47,7% de sororreatividade nas amostras de animais não imunizados e com idade acima de sete meses no momento da venopunção por nós avaliada no Pantanal é corroborada por recente inquérito sorológico realizado por Fernández, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol (2000) após epizootia de encefalite equina no PR, estado limítrofe à MS. O grupo detectou a presença de anticorpos inibidores de hemaglutinação e neutralizantes para EEEV em 54,5% dos animais avaliados.

Com relação aos equinos com histórico de vacinação, dos 75 animais que haviam sido imunizados, 67 apresentaram soropositividade para EEEV, o que corresponde a 89,3% dos animais vacinados. No inquérito realizado na província de Santa Fe na Argentina, 67,7% dos animais com histórico de vacinação apresentaram soropositividade.

Em ensaio de HI realizado por Travassos, Bruno-Lobo & Bruno-Lobo (1961) para avaliação da eficiência da vacina monovalente para EEEV utilizada pelo exército brasileiro no final da década de 1950, foi detectada soropositividade em 35,9% dos animais avaliados no 25º dia pós vacinal. Em nosso inquérito, foi detectada maior soropositividade para EEEV do que para WEEV entre os animais vacinados, nove meses após a última vacinação.

Em estudo realizado por Barber, Walton & Lewis (1978), a avaliação através de PRNT, da resposta imunológica à vacina trivalente inativada composta por WEEV, EEEV e VEEV demonstrou que nove meses após a vacinação a soropositividade para VEEV foi detectada em 100% dos animais, a soropositividade para EEEV em 53% e WEEV em apenas 6%. Entretanto, a

utilização de VEEV sugere interferência no perfil da resposta imunológica apresentado pelos animais, dificultando uma comparação com os resultados do presente estudo.

O prévio isolamento de EEEV em *Ps. albigenu* na Amazônia peruana (Turell *et al.*, 2005) associado a maior prevalência desta espécie de culicídeo entre os espécimes capturados em fevereiro no presente trabalho e a captura de espécimes identificados a esta espécie em hematofagia em eqüinos e a maior soroprevalência para este arbovírus entre os eqüinos avaliados, sugere esta espécie de hospedeiro invertebrado como potencial vetor deste arbovírus durante o verão, na Sub-região da Nhecolândia.

A detecção de soropositividade para EEEV associada a relatos de infecção sintomática por este arbovírus em MS e PR, indicam a necessidade de implantação de um sistema de vigilância epizootiológica para estes arbovírus em eqüinos em MS.

- **Soroneutralização para vírus da encefalite de St Louis**

Com relação ao ensaio de soroneutralização para SLEV, para o nosso conhecimento este é o primeiro relato de eqüinos soropositivos para SLEV no Pantanal Sul Mato Grossense. Dos 75 animais imunizados para os *Alphavirus* EEEV e WEEV com a vacina inativada Encefalovacín[®], 34 apresentaram soropositividade para o *Flavivirus*, correspondendo a 45,3% dos animais vacinados.

Enquanto entre os 60 animais não imunizados para os *Alphavirus*, 24 foram sororeativos para SLEV correspondendo a 40% deste total. De acordo com este resultado sugere-se que à semelhança do previamente descrito, por Waldrige *et al.* (2003) a vacinação para os *Alphavirus* EEEV e WEEV parece não ter interferido na resposta imunológica para o *Flavivirus* SLEV. Waldrige *et al.* (2003) demonstraram experimentalmente que animais previamente vacinados para EEEV e WEEV não se tornam soropositivos para SLEV indicando que a vacinação regular contra encefalite eqüina não interfere em futuros HI para *Flavivirus*. Entendemos que a diferença entre o ensaio utilizado por Waldrige *et al.* (2003) e no presente trabalho, não impede a inferência deste resultado aos animais avaliados no Pantanal.

Apesar dos animais da Fazenda Nhumirim serem submetidos a um manejo sanitário considerado acima dos padrões regionais, em virtude das análises periódicas em caráter científico. A soroprevalência para SLEV entre estes animais e os animais da Fazenda particular Santa Maria não apresentou diferença, sugerindo através destas evidências sorológicas, que o manejo sanitário mantido na Fazenda Nhumirim não interferiu na susceptibilidade dos animais avaliados à infecção por este arbovírus.

A detecção de soropositividade para SLEV em 42,9% dos 135 animais avaliados apresenta-se similar ao resultado descrito em outro inquérito sorológico realizado na Argentina, onde a soropositividade para SLEV foi detectada por Monath *et al.* (1985) em 57,9% dos eqüinos estudados, a maior prevalência entre os nove arbovírus pesquisados.

A detecção de animais soropositivos com idades de três a 21 anos sem histórico de viagens para fora da planície, incita a possível circulação viral entre 1988 e 2007. Todavia, a ausência de soropositividade para SLEV em inquérito sorológico realizado em 1992 por Iversson, Silva, Travassos da Rosa & Barros (1993) com 432 animais da mesma sub-região do presente estudo, sugere circulação viral após 1992. Associando estas informações às idades dos animais soropositivos para SLEV no presente estudo, sugere-se como provável circulação mais recente deste arbovírus na Sub-região da Nhecolândia, entre 2005 e 2007, uma vez que entre os animais soropositivos, haviam animais nascidos em novembro de 2004. A soropositividade para SLEV nos cinco animais com histórico de viagem à Poconé em MT, pode ser atribuída a infecção naquele estado, inferindo a necessidade de vigilância para este arbovírus, também em MT.

- ***Técnicas utilizadas para capturas e coletas de culicídeos***

Com relação às técnicas utilizadas para captura e coleta de culicídeos, a maior eficiência das técnicas de aspiração através de tubo de sucção oral durante hematofagia em membros da equipe e em armadilha de Shannon está de acordo com o observado por Alencar *et al.* (2005) e Gomes *et al.* (2007) em trabalhos realizados em MT e MS respectivamente.

Gomes *et al.* (2007) observaram durante o levantamento da fauna de culicídeos potencialmente vetores em área impactada no município de Bataguassu em MS, que em 86 espécies identificadas através de diversas técnicas utilizadas, a técnica de aspiração através de tubo de sucção oral durante hematofagia em membros da equipe e armadilha de Shannon foram responsáveis pela coleta e captura de espécimes identificados a 61 e 64 espécies respectivamente.

Assim como no presente trabalho, no estudo realizado por Alencar *et al.* (2005) para observação de padrões alimentares de culicídeos capturados no Pantanal de MT, a utilização da armadilha de Shannon demonstrou maior produtividade em relação a armadilha CDC[®], a outra técnica utilizada pelo grupo.

Em capturas realizadas em armadilha CDC[®] a uma altura de seis metros e em residência de um trabalhador rural na Fazenda Nhumirim, foram identificadas espécies de ocorrência em outros tipos de armadilha, não demonstrando relevante diferença específica entre estes locais de coleta e os demais utilizados.

- ***Períodos de capturas e coletas***

No presente trabalho foi observada maior diversidade específica e maior número de espécimes de culicídeos capturados e coletados no mês de fevereiro, provavelmente em virtude das condições climáticas mais favoráveis à proliferação de artrópodes durante este período. Durante o verão pantaneiro, caracterizado por altas temperaturas e elevados índices pluviométricos (Soriano, 1999), são reportados expressivos aumentos populacionais, principalmente de animais invertebrados (Barros, 2001; Martins *et al.*, 2004; Marques *et al.* 2006).

- ***Espécies de artrópodes capturadas e coletadas***

Entre as 22 espécies de culicídeos identificadas no presente trabalho, oito foram previamente reportadas por Alencar *et al.* (2005) em MT e 16 por Gomes *et al.*, (2007) em área impactada em MS. Entre os espécimes capturados e coletados nos dois períodos foi identificada a ocorrência de 13 espécies não previamente relatadas por Alencar *et al.* (2005) em MT e seis não previamente relatadas por Gomes *et al.* (2007) em Bataguassu.

A identificação à *P. albigenu* em mais de 50% dos espécimes capturados e coletados no mês de fevereiro e a sua ausência entre os exemplares identificados em novembro sugere complexidade ecológica da sub-região, inferindo a necessidade e importância da entomologia de culicídeos no estudo das arboviroses no Pantanal.

Assim como em nossas capturas e coletas realizadas nos dois períodos, *M. titillans* foi a espécie de maior incidência durante a identificação dos espécimes reportados por Alencar *et al.* (2005) no Pantanal de MT. Segundo os autores, espécimes identificados a espécie apresentaram acentuada característica ornitófila, porém não estrita, o que foi corroborado pelo presente estudo visto que espécimes a ela identificados foram coletados durante hematofagia em equinos e em seres humanos.

Entre as espécies *M. titillans*, *C. declarator* e *A. triannulatus* identificadas em capturas realizadas em armadilha CDC® a uma altura de seis metros e em residência de um trabalhador rural na Fazenda Nhumirim, a acrodendrofilia observada nos anofelinos corrobora achados de Deane *et al.* (1971).

As duas espécies de Ixodida identificadas no presente trabalho são comumente reportadas em hematofagia em equinos brasileiros (Freitas, Costa, Costa & Iide, 1984; Flechtann, 1985; Serra-Freire, 2001) e apesar de relatos experimentais acerca de eventual competência vetorial de

A. cajennense na transmissão de arbovírus no Brasil (Aragão, 1936), espécimes identificados às espécies não são reportados em ciclos arbovirais em território brasileiro (Vieira *et al.*, 2004).

- ***Relevância arboviral das espécies identificadas***

Com relação à relevância epidemiológica dos culicídeos capturados e coletados, dos oito gêneros identificados, pelo menos seis já foram reportados em transmissão de arbovírus. Entre as espécies, sete das 22 identificadas se atribui envolvimento em ciclos de arbovírus pesquisados no presente estudo.

Espécimes identificados à espécie *P. ferox* foram relacionados a transmissão de ROCV durante a grande epidemia pelo arbovírus em SP em 1975 (Lopes *et al.*, 1981), ILHV na Amazônia peruana e VEEV em Trinidad, na América Central (Downs, Spence & Aitken, 1962; Turell *et al.*, 2005).

À espécimes identificados a *S. chloropterus* foram atribuídas transmissão de ILHV e YFV na Guatemala e Panamá durante a década de 1950 (Rodaniche & Galindo, 1957; Rodaniche, Galindo & Johnson, 1957).

Foi reportada transmissão de VEEV no Equador e na Amazônia peruana (Levi-Castillo, 1952) por espécimes identificados à *M. titillans*.

Em espécimes identificados a *P. albigena* foi reportada presença de EEEV (Turell *et al.*, 2005).

Experimentalmente a espécie *O. scapularis* demonstrou capacidade de infecção e transmissão de ROCV e é considerada uma das principais espécies envolvidas neste ciclo viral (Mitchell & Forattini, 1984).

As espécies *C. quinquefasciatus* e *C. declarator* são descritas em transmissão de SLEV (Tsai & Mitchell, 1988; Goés & Bruno-Lobo, 1961; Vasconcelos *et al.*, 2001c).

Espécimes identificados a *C. quinquefasciatus* e *A. albitarsis* foram reportados em presença de WEEV nos EUA e Argentina respectivamente (Reisen & Monath, 1988).

- ***Isolamento viral em amostras de artrópodes***

Em relação à ausência de vírus citopatogênicos em culturas celulares inoculadas com as amostras de artrópodes, um conjunto de fatores envolvendo as amostras avaliadas e o ensaio utilizado deve ser analisado. Fatores como períodos inter-epizoóticos de coleta e captura, quantidade de amostras, modelo de observação de replicação viral *in vitro* e possível perda

iatrogênica de infectividade viral em decorrência das condições ambientais e técnicas desfavoráveis em campo, podem ou não ter influenciado o resultado encontrado.

Apesar de relatos de casos de encefalite eqüina na região pesquisada no início da década de 1990 (Iversson *et al.*, 1993), as coletas das amostras em fevereiro de 2007 foram conduzidas em ausência de relatos recentes de epidemias, epizootias ou mesmo casos isolados sugestivos de infecção sintomática por arbovírus.

Resultados de diversos trabalhos de vigilância epidemiológica envolvendo artrópodes, têm demonstrado que mesmo durante epidemias ou epizootias o isolamento viral em cultura celular a partir de amostras de artrópodes apresenta baixo percentual de positividade. Segundo Morris (1988), o isolamento de EEEV a partir de amostras de mosquitos coletados em períodos inter-epizoóticos é muito incomum.

Nos EUA entre 1969 e 1974, a tentativa de isolamento viral para WEEV em 7590 grupos de culicídeos identificados a diversas espécies, detectou a presença em 69, o que corresponde a 0,9% das amostras (Hardy, 1987).

Desde 1999, a vigilância epidemiológica para WNV nos EUA tem apresentado reduzidas taxas de isolamento viral a partir de culicídeos capturados em áreas epidêmicas. Através de isolamento viral em cultura celular, foram registradas durante epidemia por WNV, taxas de isolamento de 0,8% em New York e de 0,15% em Connecticut (Nasci *et al.*, 2001; Andreadis, Anderson & Vossbrinck, 2001).

Na Amazônia peruana, em um estudo realizado através do mesmo ensaio, a presença viral foi detectada em 1,09% dos 530000 espécimes avaliados (Turell *et al.*, 2005).

Entretanto, apesar do número de amostras de artrópodes coletados ser relativamente pequeno, quando comparado a investigações entomológicas durante epidemias, alguns trabalhos têm demonstrado que apesar de baixa taxa de isolamento viral, têm-se isolado vírus a partir de grupos de artrópodes com reduzido número de espécimes.

No estado de Connecticut nos EUA, durante o estudo de epizootia por WNV em espécimes identificados a *Corvus brachyrhynchos* Brehm, 1822, popularmente conhecido como corvo americano foram isolados em cultura celular a partir de 3398 exemplares de culicídeos capturados, amostras virais em grupos compostos por menos de 15 espécimes (Andreadis, Anderson & Vossbrinck, 2001).

Outro aspecto a ser considerado, refere-se ao ensaio de isolamento utilizado no presente estudo. Apesar de algumas desvantagens técnicas, o clássico ensaio de isolamento viral em

camundongos lactentes apresenta maiores taxas de isolamento quando realizado com amostras de artrópodes.

Em 1965 na Índia, em trabalho realizado com este tipo de ensaio foram isolados vírus identificados a WNV em dois dos 55 grupos de culicídeos avaliados, correspondendo a 3,6% de positividade (Pavri & Singh, 1965).

Na Amazônia, a tentativa de isolamento viral em 1827 grupos de culicídeos detectou através do mesmo ensaio a presença viral em 33, o que corresponde a 1,8% das amostras (Causey, Causey, Maroja & Macedo, 1961). De acordo com o autor a taxa de isolamento foi considerada satisfatória uma vez que em florestas tropicais a expectativa de vida dos culicídeos durante chuvas torrenciais pode ser muito reduzida.

Entretanto, o isolamento ou não de vírus a partir de amostras de artrópodes é multifatorial não devendo se atribuir o resultado a estes fatores isoladamente.

Em 2000, após relato de epizootia eqüina no PR, a tentativa de isolamento viral em camundongos lactentes a partir de amostra composta por aproximadamente 1800 culicídeos capturados em quatro municípios do estado foi negativa (Fernández, Richartz, Travassos da Rosa & Soccol, 2000).

Outro aspecto relevante a ser abordado consiste na identificação específica dos artrópodes. Embora realizada como descrito e preconizado, em exemplares vivos imobilizados por refrigeração e visualizados em placa refrigerada adaptada, entendemos que a otimização desta etapa poderia minimizar a suposta redução de carga viral inerente a variações bruscas de temperatura e umidade comuns em trabalhos de campo.

A utilização de trietilamina ao invés da refrigeração para imobilização dos culicídeos deve ser considerada. Em estudo de campo na Amazônia peruana, a utilização da trietilamina apresentou algumas vantagens como a imobilização em menor umidade sem alterações expressivas do título viral (O'Guinn & Turell, 2002; O'Guinn *et al.*, 2004).

- ***RT-PCR em amostras de artrópodes***

Como previamente descrito para o isolamento, a ausência de detecção de ácido ribonucleico viral nas amostras de artrópodes, pode ser atribuída a fatores associados. Em virtude de sua grande sensibilidade, a tentativa de detecção viral em amostras de artrópodes através de PCR vem sendo cada vez mais utilizada em programas de vigilância arboviral. Entretanto, assim como o isolamento viral os resultados têm demonstrado baixos níveis de positividade mesmo durante epidemias.

Em 2000, durante o programa de vigilância epidemiológica para WNV nos EUA, foi detectada através da PCR por White *et al.* (2001), a presença de ácido nucléico viral em 3,6% dos 9952 grupos de culicídeos avaliados.

Apesar de entendermos que o reduzido número de culicídeos submetidos à PCR diminui as chances de detecção de ácido nucléico viral, alguns trabalhos têm demonstrado resultados positivos em amostras reduzidas, corroborando a pluralidade da questão.

Na Amazônia peruana por exemplo, através da utilização de PCR para detecção de EEEV em 117 grupos de culicídeos identificados a *Culex (Melanoconion) pedroi* Sirivanakarn & Belkin, 1980, a presença de ácido nucléico viral foi detectada em cinco, correspondendo a 4,3% dos grupos avaliados (O'Guinn *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

- A detecção de soropositividade em eqüinos adultos sem histórico de vacinação contra encefalite eqüina ou viagens para fora da Sub-região da Nhecolândia evidenciam a circulação local dos *Alphavirus* WEEV e EEEV e do *Flavivirus* SLEV, considerados de importância médica e veterinária.
- A não detecção de evidência sorológica de infecção por MAYV nos eqüinos avaliados sugere a ausência da circulação deste arbovírus em eqüinos nesta sub-região.
- A ausência de arbovírus citopatogênicos e ácido ribonucleico arboviral em amostras de soro sanguíneo eqüino e artrópodes associada a soropositividade para *Alphavirus* e *Flavivirus* em eqüinos infunde a necessidade de futuras investigações, principalmente durante o inverno na sub-região.
- Foram identificadas 22 espécies de culicídeos e o maior número de espécies identificadas em fevereiro sugere o verão como o período de maior riqueza de fauna culicidiana na Sub-região da Nhecolândia.
- As evidências sorológicas da presença dos arbovírus EEEV, WEEV e SLEV na Sub-região da Nhecolândia, aliada às demais condições existentes no país para disseminação viral, constituem um problema de saúde pública que deve ser motivo de ações preventivas por parte das autoridades de saúde.
- A arbovirologia eqüina na região pantaneira contribui não só para a atualização do conhecimento científico sobre o perfil de arbovírus de importância médica e veterinária em território nacional, como também para a manutenção da sanidade eqüina no Pantanal, colaborando de forma direta para o desenvolvimento sustentável da região, naturalmente mantido pelo homem pantaneiro há mais de dois séculos.

- Abba AM, Sauthier DEU, Bender JB, Lareschi M. **Mites (Acari: Laelapidae) associated sigmodontinae rodents in Entre Ríos province, Argentina.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(8): 1171-1172.
- Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular.** Tradução Claudia Reali. 5. ed. 2 reimpressão. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda.; 2005.
- Ackermann H, Bertheaume L. **Atlas of virus diagrams.** Florida: CRC Press; 1995.
- Adamoli I. **O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados.** Discussão sobre o conceito "Complexo Pantanal". In: XXXII Congresso Nacional de Botânica; Teresina. 1982. pp 109-119.
- Adamoli, J. Fisiografia do Pantanal. In: Allem AC, Valls JFM. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense.** (Documentos, 8) Brasília: Embrapa Cenargen; 1987.
- Aguilar PV, Greene IP, Coffey LL, Medina G, Moncayo AC, Anishchenko M, Ludwig GV, Turell MJ, O'Guinn ML, Lee J, Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Hice C, Yanoviak S, Morrison AC, Klein TA, Dohm DJ, Guzman H, Rosa APAT, Guevara C, Kochel T, Olson J, Cabezas C, Weaver SC. **Endemic venezuelan equine encephalitis in northern Peru.** Emerg Infect Dis. 2004; 10(5): 880-888.
- Aguirre AA, McLean RG, Cook RS, Quan TJ. **Serologic survey for selected arboviruses and other potential pathogens in wildlife from Mexico.** J Wildl Dis. 1992; 28(3): 435-442.
- Aitken TH. **A survey of trinidadian arthropods for naturel virus infections (august, 1953 to december, 1958)** Mosq News. 1960; 20: 1-10.
- Aitken THG, Anderson CR. **Virus transmission studies with trinidadian mosquitos.** Am J Trop Med Hyg. 1959; 8: 41-45.
- Aitken THG, Downs WG, Spence L, Jonkers AH. **St. Louis encephalitis virus isolations in Trinidad, West Indies, 1953-1962.** Am J Trop Med Hyg. 1964; 13: 450-451.
- Aitken THG, Downs WG, Anderson CR, Spence L, Casals J. **Mayaro virus isolated from trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*.** Science. 1960; 131: 986.
- Alencar J, Lorosa ES, Silva JS, Lopes CM, Guimarães AE. **Observações sobre padrões alimentares de mosquitos (Diptera: Culicidae) no Pantanal Mato-Grossense.** Neotrop Entomol. 2005; 34(4): 681-687.
- Alho CJR, Lacher TE, Conçales HC. **Environmental degradation in the Pantanal ecosystem.** Bioscience. 1988; 38: 164-171.
- Allison AB, Mead DG, Gibbs SEJ, Hoffman DM, Stallknecht DE. **West Nile virus viremia in wild rock pigeons.** Emerg Infect Dis. 2004; 10(12): 2252-2255.

- Altman R, Goldfield M. **The 1964 outbreak of St. Louis encephalitis in the Delaware valley: Description of outbreak.** Am J Epidemiol. 1968; 87(2): 457-469.
- Anderson CR, Aitken THG, Downs WG, Spence L. **The isolation of St. Louis virus from Trinidad mosquitoes.** Am J Trop Med Hyg. 1957; 6: 688-692.
- Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, Garmendia AE, Van Kruiningen HJ. **Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut.** Science. 1999; 286(5448): 2331-2333.
- Anderson CR, Downs WG, Wattley GH, Ahin NW, Reese AA. **Mayaro virus: A new human disease agent: Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I.** Am J Trop Med Hyg. 1957; 6(6): 1012-1016.
- Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck CR. **Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: Isolation from Culex pipiens, Cx. restuans, Cx. salinarius, and Culiseta melanura.** Emerg Infect Dis. 2001; 7(4): 670-674.
- Antas PTZ. **Migration and other movements among the lower Paraná River valley wetlands, Argentina, and the south Brazil/Pantanal wetlands.** Bird Conserv Int. 1994; 4(2): 181-190, 1994.
- Aragão HB. **Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1936; 31(4): 759-845.
- Aragão HB, Fonseca F. **Notas de ixodologia. VIII: Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1961; 59(2): 115-151.
- ATCC - **The american type culture collection: Catalogue of strains II.** 2 ed. Rockville: Library of Congress; 1979.
- Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang GJ. **Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus.** Emerg Infect Dis. 2004; 10(1): 82-86.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. **West Nile virus epidemic in horses, Tuscany Region, Italy.** Emerg Infect Dis. 2002; 8(12): 1372-1378.
- Aviles G, Sabattini MS, Mitchell CJ. **Transmission of western equine encephalomyelitis virus by argentine Aedes albifasciatus (Diptera: Culicidae).** J Med Entomol. 1992; 29(5): 850-853.
- Ayers JR, Lester TL, Angulo AB. **An epizootic attributable to Western equine encephalitis virus infection in emus in Texas.** J Am Vet Med Assoc. 1994; 205(4): 600-601.
- Azevedo SM, Dias MM, Larrazábal ME, Telino WR, Lyra-neves RM, Fernandes CJG. **Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil.** Ararajuba. 2001; 9(1): 33-42.

Barber TL, Walton TE, Lewis KJ. **Efficacy of trivalent inactivated encephalomyelitis virus vaccine in horses.** Am J Vet Res. 1978; 39(4): 621-625.

Barcellos C, Pustai AK, Weber MA, Brito MRV. **Identification of places with potential transmission of dengue fever in Porto Alegre using geographical information systems.** Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(3): 246-250.

Barros, AL. **Gente pantaneira: Crônicas de sua história.** 1.ed., Rio de Janeiro: Editora Lacerda; 1998.

Barros ATM. **Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(7): 917-923.

Barroso MM, Lima CS, Silva-Neto MA, Da Poian AT. **Mayaro virus infection cycle relies on casein kinase 2 activity.** Biochem Biophys Res Commun. 2002; 296(5): 1334-1339.

Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE. Arboviruses. **In:** Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infectious.** 7 ed. Washington DC: American Public Health Association; 1995. pp 189-212.

Benchimol JL. **Febre amarela: A doença e a vacina, uma história inacabada.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001.

Ben-Nathan D, Porgador A, Yavelsky V, Rager-Zisman B. **Models of West Nile virus disease.** Drug Discovery Today: Disease Models, Infectious diseases. 2006; 3(1): 49-54.

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

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

Bertelli AP. **O Pantanal, mar dos xaraiés.** São Paulo: Siciliano; 1988.

Bianchi TI, Aviles G, Sabattini MS. **Biological characteristics of an enzootic subtype of western equine encephalomyelitis virus from Argentina.** Acta Virol. 1997; 41(1): 13-20.

Bicout DJ, Carvalho R, Chaulvet-Monfray K, Sabatier P. **Distribution of equine infectious anemia in horses in the north of Minas Gerais state, Brazil.** J Vet Diagn Invest. 2006; 18(5): 479-482.

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

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. **West Nile virus, Venezuela**. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(4): 651-653.

Brault AC, Powers AM, Chavez CLV, Lopez RN, Cachón MF, Gutierrez LFL, Kang W, Tesh RB, Shope RE, Weaver SC. **Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central and South América**. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(4): 579-586.

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

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

Brasil. Ministério da Saúde. Assessoria de Comunicação Social, Divisão de Imprensa. **Nota para a imprensa 13.1.2008**. 2008 (c).
Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/imprensa.php>

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. 1999.
Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/noticias.php>

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 45, de 15 de junho de 2004. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 jul. 2004. Seção 1, p. 7**. 2004 (a).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. 2004 (b).
Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/profissionais.php>

Brasil. 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*. 2004 (c); 4(2): 1-12.

Brasil. 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*. 2003; 3(1): 3-12.

Brasil. 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*. 2004 (d); 4(5): 1-8.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2007 e 2008**. 2008 (d).
Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/noticias.php>

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

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

Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS. **Peixes do Pantanal: Manual de identificação.** Brasília: Embrapa-SPI; 1999.

Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. **Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of brazilian alphaviruses and flaviviruses.** J Clin Microbiol. 2005; 43(2): 696-702.

Bronzoni RVM, Moreli ML, Cruz ACR, Figueiredo LTM. **Multiplex nested PCR for brazilian Alphavirus diagnosis.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004; 98: 456-461.

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

Bruno-Lobo M, Bruno-Lobo G, Travassos J. Estudos sobre Arbovírus II: Presença de anticorpos para certos vírus dos gupos A e B em soros de pessoas residentes no Rio de Janeiro. Anais de Microbiologia 1961; 9 (parte A). **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. p 62.

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

Buckweitz S, Kleiboeker S, Marioni K, Ramos-Vara J, Rottinghaus A, Schwabenton B, Johnson G. **Serological, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and immunohistochemical detection of West Nile virus in a clinically infected dog.** J Vet Diagn Invest. 2003; 15: 324-329.

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

Burke DS, Monath TP. Flaviviruses **In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Fields virology.** v 1-2. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp 1043-1125.

Burlandy FM, Rebello MA. **Inhibition of Mayaro virus replication by prostaglandin A(1) in Vero cells.** Intervirology. 2001; 44(6): 344-349.

Burroughs AL, Burroughs RN. **A study of the ecology of western equine encephalomyelitis virus in the upper Mississippi River valley.** Am J Hyg. 1954; 60: 27-36.

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

Calisher CH, Gutiérrez EV, Maness KSC, Lord RD. **Isolation of *Mayaro virus* from a migrating bird captured in Louisiana in 1967.** Paho Bulletin. 1974; 8(3): 243-248.

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

Calisher CH, Karabatsos N, Foster JP, Pallansch M, Roehrig JT. **Identification of an antigenic subtype of *Eastern equine encephalitis virus* isolated from a human.** J Clin Microbiol. 1990; 28(2): 373-374.

Calisher CH, Kinney RM, Lopes OS, Trente DW, Monath TP, Francly DB. **Identification of a new *Venezuelan equine encephalitis virus* from Brazil.** Am J Trop Med Hyg. 1982; 31(6): 1260-1272.

Calisher CH, Maness KS, Lord RD, Coleman PH. **Identification of two South American strains of *Eastern equine encephalomyelitis virus* from migrant birds captured on Mississippi delta.** Am J Epidemiol. 1971; 94: 172-178.

Carneiro V. **Encefalomiélites infecciosas dos eqüídeos.** Arch Inst Biol. 1946; 17: 269-330.

Casali CG, Pereira MRR, Santos LMJG, Passos MNP, Fortes BPMD, Valencia LIO, Alexandre AJ, Medronho RA. **The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002.** Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37(4): 296-299.

Casals J. **New developments in the classification of arthropod-borne viruses.** Ann Microbiol. 1963; 11: 1-34.

Casals J, Reeves WC. Arthropod-borne animal virus. **In:** Rivers TM, Horsfall FL. **Viral and rickettsial infections on man.** 3. ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1959. pp 967.

Casals J, Whitman L. ***Mayaro virus*: A new human disease agent: Relationship to other arbor viruses.** Am J Trop Med Hyg. 1957; 6(6): 1004-1011.

Causey OR. Reservatórios e transmissores. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1958; 10(1): 133-136. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 6. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 41-44.

Causey CE, Causey OR. The arthropod-borne viruses of Brazil in relation to world group. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1962; 12(1): 9-13. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 89-93.

Causey OR. The isolation of virus from natural and sentinel hosts in the Amazon valley. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1962; 12(1): 25-31. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 95-101.

Causey OR, Causey CE, Maroja OM, Macedo DG. **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. 1961; 10: 227-249.

Causey OR, Maroja OM. **Mayaro virus: A new human disease agent: Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent.** Am J Trop Med Hyg. 1957; 6(6): 1017-1023.

Causey OR, Shope RE, Suttmoller P, Laemmert H. Epizootic eastern equine encephalitis in the Bragança region of Pará, Brazil. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1962; 12(1): 39-45. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 107-113.

Causey OR, Shope RE, Theiler M. Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from arthropods in Pará, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1964; 13(3): 449. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 179-180.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Acute flaccid paralysis syndrome associated with West Nile virus infection: Mississippi and Louisiana july-august 2002.** Morb Mortal Wkly Rep. 2002 (a); 51: 823-827.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Intrauterine West Nile virus infection, New York, 2002.** Morb Mortal Wkly Rep. 2002 (b); 51(50): 1135-1136.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Investigations of West Nile virus infections in recipients of blood transfusions.** Morb Mortal Wkly Rep. 2002 (c); 51(43): 973-974.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding in Michigan.** Morb Mortal Wkly Rep. 2002 (d); 51(39): 877-878.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **St. Louis Encephalitis Surveillance & Control Activity Map.** Division of vector-borne infectious diseases. 2007 (a).
Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/sle/MapsActivity/Sle_SurvControl.html

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Yellow fever global distribution.** Division of vector-borne infectious diseases. 2007 (b).
Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/YF_GlobalMap.html

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **West Nile virus: statistics, surveillance, and control.** Division of vector-borne infectious diseases. 2008.
Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm#maps>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **West Nile virus transmission through blood transfusion, South Dakota, 2006.** Morb Mortal Wkly Rep. 2007 (c); 56(04): 76-79.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **West Nile virus infections in organ transplant recipients, New York and Pennsylvania, august/september, 2005.** Morb Mortal Wkly Rep. 2005; 54(40): 1021-1023.

Chadwick DR. **Viral meningitis.** Br Med Bull. 2005; 75 & 76: 1-14.

Chamberlain RW, Sudia WD, Burbutis PP, Bogue MD. **Recent isolations of arthropod-borne viruses from mosquitoes in eastern United States.** Mosq News. 1958; 18: 305-308.

Chesser RT. **Migration in South America, an overview of the austral system.** Bird Conserv Int. 1994; 4: 91-107.

Chiles RE, Green EN, Fang Y, Goddard L, Roth A, Reisen WK, Scott TW. **Blinded laboratory comparison of the in situ enzyme immunoassay, the VecTest wicking assay, and a reverse transcription-polymerase chain reaction assay to detect mosquitoes infected with West Nile and St. Louis encephalitis viruses.** J Med Entomol. 2004; 41(4): 539-544.

Coimbra TL, Santos CL, Suzuki A, Petrella SM, Bisordi I, Nagamori AH, Marti AT, Santos RN, Fialho DM, Lavigne S, Buzzar MR, Rocco IM. **Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007; 49(4): 221-224.

Connell SA. **WNV vaccine safety.** Fort Dodge Professional and Technical Services. 2003; 23(10): 425.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.

Corrêa PLR, França E, Bogutchi TF. **Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais.** Rev Saude Publica. 2005; 39(1): 33-40.

Cortés AG, Aquino MLZ, Bahena JG, Abella JM, Avila GC, Arrayo MA. **St. Louis encephalomyelitis in Hermosillo, Sonora, Mexico.** Bull Pan Am Health Organ. 1975; 9(4): 306-316.

Cruz ACR. **Caracterização molecular do vírus Ilhéus. Rio de Janeiro;** 1994. 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. **Short report: Serological evidence of West Nile virus activity in El Salvador.** Am J Trop Med Hyg. 2005; 72(5): 612-615.

Cunha R. **Verificação de anticorpos para o vírus "este" da encefalomyelite eqüina em sôro de cavalos no nordeste brasileiro.** Rev Bras Biol. 1943; 3: 425-430.

Cunha R, Ribeiro L, Passos W. **Ocorrência da encefalomyelite eqüina no município de Campos, com verificação de anticorpos neutralizantes para a amostra Este em sôro de eqüídeos.** Bol Soc Bras Med Vet. 1948; 17: 21-35.

Cunha V. **Pantanal: O último éden.** São Paulo: DBA Artes Gráficas; 2007.

Da Silva EE, Azevedo JPR, Costa EV. Enteroviroses de importância médica. **In:** Coura JC. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** v 2. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. pp 1681-1700.

Danielová V, Holubová J, Daniel M. **Tick-borne encephalitis virus prevalence in Ixodes ricinus ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic.** Exp Appl Acarol. 2002; 26(1-2): 145-151.

Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. **West Nile: Worldwide current situation in animals and humans.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004; 27: 343-355.

Dávila AMR, Souza SS, Campos C, Silva RAMS. **The seroprevalence of equine trypanosomosis in the Pantanal.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(2): 199-202.

Day JF, Stark LM, Zhang J, Ramsey AM, Scott TW. **Antibodies to arthropod-borne encephalitis viruses in small mammals from southern Florida.** J Wildl Dis. 1996; 32(3): 431-436.

Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto JA, Almeida FB. **On the transmission of simian malaria in Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1971; 13: 311-319.

Dégallier N, Travassos Da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa ES, Sá Filho GC, Travassos da Rosa JFS. **New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil.** Ciência e Cultura. 1992; 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. **West Nile Virus in birds, Argentina.** Emerg Infect Dis. 2008; 14(4): 689-691.

Dillenberg H. **Human western equine encephalomyelitis (wee) in Saskatchewan.** Can J Public Health. 1965; 56: 17-20.

Doanne FW, Andermos N. **Electron microscopy in diagnostic virology: A practical guide and atlas.** Londres: Cambridge University Press; 1987.

Downs WG, Aitken THG, Spence L. **Eastern equine encephalitis virus isolated from Culex nigripalpus in Trinidad.** Science. 1959; 130: 1471.

Downs WG, Spence L, Aitken THG. **Studies on the virus of Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Trinidad, BWI III, reisolation of virus.** Am J Trop Med Hyg. 1962; 11: 841-843.

Dupuis II AP, Marra PP, Kramer LD. **Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies.** Emerg Infect Dis. 2003; 7(9): 860-863.

Eidson M, Komar N, Sorhage F, Nelson R, Talbot T, Mostashari F, McLean R. **Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999.** Emerg Infect Dis. 2001; 7(4): 615-620.

- Eklund CM, Bell JF, Brennan JM. **Antibody survey following an outbreak of human and equine disease in the Dominican Republic, caused by the eastern strain of equine encephalomyelitis virus.** Am J Trop Med Hyg. 1951; 31(3): 312-328.
- El-Bacha T, Menezes MM, Azevedo e Silva MC, Sola-Penna M, Da Poian AT. **Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase.** Mol Cell Biochem. 2004; 266(1-2): 191-198.
- Elton NW. **Progress of sylvan yellow fever wave in Central America; Nicaragua and Honduras.** Am J Public Health Nations Health. 1952; 42(12): 1527-1534.
- Elvinger F, Liggett AD, Tang KN, Harrison LR, Cole JR Jr, Baldwin CA, Nessmith WB. **Eastern equine encephalomyelitis virus infection in swine.** J Am Vet Med Assoc. 1994; 205(7): 1014-1016.
- Elvinger F, Baldwin CA, Liggett AD, Tang KN, Stallknecht DE. **Prevalence of exposure to Eastern equine encephalomyelitis virus in domestic and feral swine in Georgia.** J Vet Diagn Invest. 1996; 8: 481-484.
- Erickson GA, Mare CJ. **Rapid diagnosis of Venezuelan equine encephalomyelitis by fluorescence microscopy.** Am J Vet Res. 1975; 36(2): 167-70.
- Ernk E, Kozuch O, Sekeyová, Hudec K, Folk C. **Antibodies to arboviruses in birds in Czechoslovakia.** Acta Virol. 1971; 15: 335.
- Faran ME, Linthicum KJ. **A handbook of the amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera, Culicidae).** Mosq System. 1981; 13(1): 1-81.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. **Virus Taxonomy: The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses.** Elsevier/Academic Press: 2005. pp 1259.
- Feemster RF. **Outbreak of encephalitis in man due to the eastern virus of equine encephalomyelitis.** Am J Public Health Nations Health. 1938; 28(12): 1403-1410.
- Feemster RF, Wheeler RE, Daniels JB, Rose HD, Schaeffer M, Kissling RE, Hayes RO, Alexander ER, Murray WA. **Field and laboratory studies on equine encephalitis.** N Engl J Med. 1958; 259: 107-113.
- 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. **Identificação do vírus causador da encefalomielite equina, Paraná, Brasil.** Rev Saude Publica. 2000; 34(3): 232-235.
- Ferreira DF, Santo MP, Rebello MA, Rebello MC. **Weak bases affect late stages of *Mayaro virus* replication cycle in vertebrate cells.** J Med Microbiol. 2000; 49(4): 313-318.

Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, Souza LTM, Iversson LB. **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. 1994; 36(3): 265-274.

Figueiredo LTM. **Arboviroses emergentes no Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(2): 224-229.

Figueiredo LTM, Batista WC, Kashima S, Nassar ES. **Identification of brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription–polymerase chain reaction method using *Flavivirus* universal primers.** Am J Trop Med Hyg. 1998; 59(3): 357-362.

Figueiredo LTM, Travassos da Rosa APA, Fiorillo AM. **Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil).** Rev Saude Publica. 1986; 20(3): 204-211.

Filipe AR. **Isolation in Portugal of *West Nile virus* from *Anopheles maculipennis* mosquitoes.** Acta Virol. 1972; 16: 361.

Filipe AR, Pinto MR. **Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal.** Am J Trop Med Hyg. 1969; 18(3): 423-426.

Filippis AM, Schatzmayr HG, Nicolai C, Baran M, Miagostovich MP, Sequeira PC, Nogueira RM. **Jungle yellow fever, Rio de Janeiro.** Emerg Infect Dis. 2001; 7: 484-485.

Flechtmann CHW. **Ácaros de importância médico-veterinária.** 3 ed. São Paulo: Nobel, 1985.

Forattini OP. **Culicidologia médica: Identificação, biologia, epidemiologia.** 2 v. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2002.

Forattini OP. **Entomologia médica.** 3 v. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1965.

Forattini OP, Gomes AC, Galati EAB, Rabello EX, Iversson LB. **Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no sistema da serra do mar, Brasil: Observações no ambiente extradomiciliar.** Rev Saude Publica. 1978; 12(3): 297-325.

Fossier AE. **Yellow fever and its influence on the development of New Orleans.** Bull Med Libr Assoc. 1942; 30(4): 316-326.

Fothergill LD, Dingle JH, Farber S, Connerley ML. **Human encephalitis caused by the virus of the eastern variety of equine encephalomyelitis.** New Eng J Med. 1938; 219: 411.

Freitas MG, Costa HMA, Costa JO, Iide P. **Entomologia e acarologia médica e veterinária.** 6 ed. Belo Horizonte: Precisa Ed.Gráfica; 1965.

Gaidamovich S YA, Sokhey J. **Studies on antigenic peculiarities of *West Nile virus* strains isolated in the U.S.S.R. by three serological tests.** Acta Virol. 1973; 17: 343-350.

Garcia-Tapia D, Loiacono CM, Kleiboeker SB. **Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells.** Vet Immunol Immunopathol. 2006; 110: 229-244.

Galindo P, Rodaniche E, Johnson CM. **St. Louis encephalitis in Panamá: Isolation of the virus from forest mosquitoes and human blood.** Am J Trop Med Hyg. 1959; 8: 557-560.

Galindo P. **Culex mosquitoes of the subgenus *Melanoconion* and allied subgenera as hosts of arboviroses.** VI Cong Inter Med Trop Mal Rio de Janeiro, Brasil, Setembro 1963: 284-285. An Microbiol. 1963; 11(parte A): 83-87.

Galindo P, Peralta PH, Mackenzie RB, Beye HK. **St. Louis encephalitis in Panamá: A review and a progress report.** Am J Trop Med Hyg. 1964; 13: 455.

Georges AJ, Lesbordes JL, Georges-Courbot MC, Eunier DMY, Gonzalez JP. **Fatal hepatitis from West Nile virus.** Ann Inst Pasteur Virol. 1987; 138: 237-244.

Germain M, Saluzzo JF, Cornet JP, Hervé JP, Sureau P, Camicas JL, Robin Y, Salatin JJ, Hème G. **Isolation of the yellow fever virus from an egg-cluster and the larvae of the tick *Amblyomma variegatum*.** C R Seances Acad Sci D. 1979 15; 289(8): 635-637.

Goés P, Bruno-Lobo M. **Estudos sobre arbovírus: Síntese do problema e plano inicial de trabalho: Epidemiologia.** An Microbiol. 1961; 9 (parte A): 79-111.

Gomes AC, Natal D, Paula MB, Urbinatti PR, Mucci LF, Bitencourt MD. **Riqueza e abundância de Culicidae (Diptera) em área impactada, Mato Grosso do Sul, Brasil.** Rev Saude Publica. 2007; 41(4): 661-664.

Gorham JR, Stojanovich CJ, Scott HG. **Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental.** U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public health service, Atlanta 1967.

Gottdenker NL, Howerth EW, Mead DG. **Natural infection of a great egret (*Casmerodius albus*) with Eastern equine encephalitis virus.** J Wildl Dis. 2003; 39(3): 702-706.

Haase R. **Seasonal growth of “algodão-bravo” (*Ipomoea carnea* spp. *fistulosa*).** Pesq Agropec Bras. 1999; 34(2): 159-163.

Hadfield TL, Turell M, Dempsey MP, David J, Park EJ. **Detection of West Nile virus in mosquitoes by RT-PCR.** Mol Cell Probes. 2001; 15: 147-150.

Hamilton SK, Sippel SJ, Melack JM. **Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing.** Arch Hydrobiol. 1996; 137: 1-23.

Hammon WMcD, Reeves WC. **California encephalitis virus, a newly described agent: evidence of natural infection in man and other animals.** Calif Med. 1952; 77(5): 303-309.

Hanson RP. **An epizootic of equine encephalomyelitis that occurred in Massachusetts in 1831.** Am J Trop Med Hyg. 1957; 6: 858.

Hanson RP, Scott GR, Ferris D, Upton E. **Eastern equine encephalomyelitis in Wisconsin.** Am J Trop Med Hyg. 1954; 3(1): 54-56.

Hardy JL. **The ecology of Western equine encephalomyelitis virus in the Central Valley of California, 1945-1985.** Am J Trop Med Hyg. 1987; 37(3): 18-32.

Heaton CE. **Yellow fever in New York City.** Bull Med Libr Assoc. 1946; 34(2): 67-78.

Henderson JR, Karabatsos N, Bourke ATC, Wallis RC, Taylor RM. **A survey of arthropod-borne viruses in south-central Florida.** Am J Trop Med Hyg. 1962; 11: 800-810.

Hetrick FM, Yancey FS, Hansen PA, Byrne RJ. **Hemagglutination-inhibition and serum neutralization response of horses to Eastern equine encephalomyelitis virus.** Proc Soc Exp Biol Med. 1960; 103: 549-551.

Holgado APR, Raya JM, Sabattini MS, Nader ORM, Castagnaro NL. **Encuesta serologica sobre arbovirus realizada en animales de la provincia de Tucuman, Argentina.** Bol of Sanit Panam. 1967; Outubro: 323-329.

Holman RP, Monserrate NM, Czander EW, Rushing EJ. **West Nile poliomyelitis.** Emerg Infect Dis. 2004; 10(3): 547-548.

Howitt B. **Recovery of the virus of equine encephalomyelitis (western type) from human blood serum.** Science. 1939; 89(2319): 541-542.

Huang C, Slater B, Campbell W, Howard J, White D. **Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription–polymerase chain reaction.** J Virol Methods. 2001; 94: 121–128.

Hubálek Z, Halouzka J. **West Nile fever: A reemerging mosquito-borne viral disease in Europe.** Emerg Infect Dis. 1999; 5(5): 643-650.

Hull RC, Tavakoli NP. ***St. Louis encephalitis virus* strain Kern 217 NS5 gene, partial cds.** Direct Submission NCBI Sequence viewer
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=156620349>

Ishimaru D, Marcicano FG, Rebello MA. **Inhibition of *Mayaro virus* replication by prostaglandin A1 and B2 in Vero cells.** Braz J Med Biol Res. 1998; 31(9): 1119-1123.

Iversson LB. **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. 1977; 11(3): 375-388.

Iversson LB. **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. 1994; 36(4): 343-353.

Iversson LB, Coimbra LT, Travassos APA, Monath TP. **Use of immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay in the surveillance of Rocio encephalitis.** *Cienc Cult.* 1992; 44(2/3): 164-166.

Iversson LB, Coimbra TLM. **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.* 1984; 18(4): 323-332.

Iversson LB, Silva RAMS, Travassos da Rosa APA, Barros VLRS. **Circulation of eastern equine encephalitis, western equine encephalitis, ilheus, maguari and tacaïuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993; 35(4): 355-359.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Rosa MDB. **Human disease caused by Venezuelan equine encephalitis subtype IF in Ribeira valley, São Paulo, Brazil.** In: Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. New Orleans, 1990. p 163.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Rosa MDB. **Ocorrência recente de infecção humana por arbovírus Rocio na região do Vale do Ribeira.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989; 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. **Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients.** *N Engl J Med.* 2003; 348(22): 2196-2203.

Jones SC, Morris J, Hill G, Alderman M, Ratard RC. **St. Louis encephalitis outbreak in Louisiana in 2001.** *J La State Med Soc.* 2002; 154(6): 303-306.

Julian KG, Mullins JA, Olin A, Peters H, Nix WA, Oberste MS, Lovchik JC, Bergmann A, Brechner RJ, Myers RA, Marfin AA, Campbell GL. **Aseptic meningitis epidemic during a West Nile virus avian epizootic.** *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(9): 1082-1088.

Junk WJ, Cunha CN. **Pantanal: A large South American wetland at a crossroads.** *Ecol Eng.* 2005; 24: 391-401.

Justines G, Oro G, Alvarez O. **Venezuelan equine encephalitis virus: horse virulence of P-676 and MF-8 small and minute plaques.** *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30(2): 444-448.

Kaplan AM, Longhurst WL, Randall DL. **St. Louis encephalitis in children.** *West J Med.* 1978; 128(4): 279-281.

Karabatsos N. **International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates.** 3 ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine & Hygiene, 1985. pp 1141.

- Kauffman EB, Jones SA, Dupuis II AP, Ngo KA, Bernard KA, Kramer LD. **Virus detection protocols for *West Nile virus* in vertebrate and mosquito specimens.** J Clin Microbiol. 2003; 41(8): 3661-3667.
- Kissling RE, Chamberlain RW, Nelson DB, Stamm DD. **Studies on the North American arthropod-borne encephalitides. VIII: Equine encephalitis in Louisiana.** Am J Hyg. 1955; 62: 233-254.
- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. **Fields virology.** v 1-2. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- Komar N, Clark GG. ***West Nile virus* activity in Latin America and Caribbean.** Rev Panam Salud Publica. 2006; 19(2): 112-117.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. **Experimental infection of north american birds with the New York 1999 strain of *West Nile virus*.** Emerg Infect Dis. 2003; 9: 311-322.
- Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. **Serologic evidence for *West Nile virus* infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999.** Emerg Infect Dis. 2001; 7(4): 621-625.
- Kramer LD, Li J, Shi P. ***West Nile virus*.** Lancet Neurol. 2007; 6: 171-181.
- Kubés V, Rios FA. **The causative agent of infectious encephalomyelitis in Venezuela.** Science. 1938; 90: 20-21.
- Laemmert HW, Causey OR. A febre amarela na região amazônica. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1962; 12(1): 51-54. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 121-124.
- Laemmert HW, Hughes TP. **The virus of Ilhéus encephalitis.** J Immunol. 1947; 55: 61-67.
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT. **Rapid detection of *West Nile virus* from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR assay.** J Clin Microbiol. 2000; 38(11): 4066-4071.
- Lambert AJ, Martin DA, Lanciotti RS. **Detection of north american eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays.** J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 379-385.
- Lane J. **Neotropical Culicidae.** v 1 e 2. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo; 1953.
- Lane J, Cerqueira NL. **Os sabetíneos da América.** Arch Zool Est São Paulo. 1942; 3(9): 473-849.
- Larcell O, Haring CM & Meyer KF. **Histologic changes in central nervous system following encephalomyelitis (in horses).** Am J Path. 1934; 10: 361-374.

Lavergne A, de Thoisy B, Lacoste V, Pascalis H, Pouliquen JF, Mercier V, Tolou H, Dussart P, Morvan J, Talarmin A, Kazanji M. **Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses.** Virus Res. 2006; 117(2): 283-290.

Lawrie CH, Uzcátegui NY, Gould EA, Nuttall PA. **Ixodid and argasid tick species and West Nile virus.** Emerg Infect Dis. 2004; 10(4): 653-657.

Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral, rickettsial and chlamydial infectious. **In:** Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infectious.** 7 ed. Washington DC: American Public Health Association; 1995. pp 3-26.

Lennette E, Fox J. **Anticorpos neutralizantes para a amostra leste de vírus de encefalomyelite equina no Brasil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1943; 38: 85-92.

Levi-Castillo R. **The problem of human and equine encephalomyelitis in Ecuador.** Acta Trop (Basel). 1952; 9: 77-80.

Liceaga E. **Annual report on yellow fever in the mexican republic.** Am J Public Health (NY). 1912; 2(3): 174-181.

Lichtensteiger CA, Heinz-Taheny K, Osborne TS, Novak RJ, Lewis BA, Firth ML. **West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog.** Emerg Infect Dis. 2003; 9(10): 1303-1306.

Lima VL, Figueiredo LT, Correa FHR, Leite OF, Rangel O, Vido AA, Oliveira SS, Owa MA, Carlucci RH. **Dengue fever: a post-epidemic sero-epidemiological survey in an urban area setting at a northwestern county of São Paulo State, Brazil.** Rev Saude Publica. 1999; 33(6): 566-574.

Lindsey HS, Calisher CH, Mathews JH. **Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology.** J Clin Microbiol. 1976; 4(6): 503-510.

Loftin KC, Diallo AA, Herbert MW, Phaltankar PG, Yuan C, Greife N, Flemming A, Foley K, Williams J, Fisher SL, Elberfeld M, Constantine J, Burcham M, Stallings V, Xia D. **Five-year surveillance of west Nile and eastern equine encephalitis viruses in southeastern Virginia.** J Environ Health. 2006; 68(9): 33-40.

Lopes IF, Brito RA, Henrique-Silva F, Del Lama SN. **Demographic history of wood stork (*Mycteria americana*) brazilian Pantanal colonies revealed by mitochondrial DNA analysis.** Genet Mol Biol. 2006; 29(2): 241-250.

Lopes OS, Coimbra TLM, Sacchetta LA, Calisher CH. **Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation and characterization of the etiologic agent, *Rocio virus*.** Am J Epidemiol. 1978; 107: 444-449.

Lopes OS, Sacchetta LA. **Epidemiological studies on Eastern equine encephalitis virus in São Paulo, Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1974; 16: 253-258.

Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pereira LE. **Isolation of *St. Louis encephalitis virus* in south Brazil.** Am J Trop Med Hyg. 1979; 28(3): 583-585.

Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pinto GH, Glasser CM. **Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Epidemiologic studies on 1975 epidemic.** Am J Epidemiol. 1978; 108(5): 394-401.

Lopes OS, Sacchetta LA, Francy DB, Jakob WL, Calisher CH. **Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: Isolation of *Rocio virus* from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819).** Am J Epidemiol. 1981; 113(2): 122-125.

Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RMR. **Dengue virus Type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(6): 799-800.

Madeley CR, Field AM. **Virus morphology.** 2. ed. Londres: Churchill Livingstone; 1988.

Marfin AA, Bleed DM, Lofgren JP, Olin AC, Savage HM, Smith GC, Moore PS, Karabatsos N, Tsai TF. **Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis epidemic in Jefferson County Arkansas, 1991.** Am J Trop Med Hyg. 1993; 49(1): 30-37.

Marques MI, Adis J, Santos GB, Battirola LD. **Terrestrial arthropods from tree canopies in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil.** Rev Bras Entomol. 2006; 50(2): 257-267.

Marr JS, Calisher CH. **Alexander the great and West Nile virus encephalitis.** Emerg Infect Dis. 2003; 9(12): 1599-1603.

Martins JR, Medri IM, Oliveira CM, Guglielmone A. **Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil.** Ciência Rural. 2004; 34(1): 293-295.

Mauro RA, Tomás WM. **Listagem preliminar da avifauna da Estação Ecológica Nhumirim e adjacências.** (Comunicado Técnico, 12) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1994.

Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N. **West Nile virus antibodies in colombian horses.** Emerg Infect Dis. 2005; 9(11): 1497-1498.

Mazza MCM, Mazza CAS, Sereno JRB, Santos SA, Pellegrin AO. **Etnobiologia e conservação do bovino pantaneiro.** Brasília: Embrapa-SPI; 1994.

McCaig LF, Janowski HT, Gunn RA, Tsai TF. **Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Fort Walton Beach, Florida in 1980.** Am J Trop Med Hyg. 1994; 50(3): 387-391.

McClure JJ, Lindsay WA, Taylor W, Ochoa R, Issel CJ, Coulter SJ. **Ataxia in four horses with equine infectious anemia.** J Am Vet Med Assoc. 1982; 180(3): 279-83.

- McLean RG, Francly DB, Monath TP, Calisher CH, Trent DW. **Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae).** J Med Entomol. 1985; 22(2): 232-233.
- McLean RG, Kirk LJ, Schriener RB, Townsend M. **Avian hosts of *St. Louis encephalitis virus* in Pine Bluff, Arkansas, 1991.** Am J Trop Med Hyg. 1993; 49(1): 46-52.
- Medeiros DB, Nunes MR, Vasconcelos PF, Chang GJ, Kuno G. **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. 2007; 88(8): 2237-2246.
- Meqdam MM, Khalousi MM, Al-Shurman A. **Enteroviral meningitis in northern Jordan: prevalence and association with clinical finding.** J Med Virol. 2002; 66(2): 224-228.
- Mettler NE, Casals J. **Isolation of *St. Louis encephalitis virus* from man in Argentina.** Acta Virol. 1971; 15(2): 148-154.
- Mettler NE, Fernández AS, Di Santo MI, Pardo DA. ***Flavivirus*: serological survey in horses from the Tandil area.** Rev Argent Microbiol. 1985; 17(1): 47-49.
- Meyer KF, Haring CM, Howitt B. **The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin valley.** Science. 1931; 74: 227-228.
- Meyer KF. **A summary of recent studies on equine encephalomyelitis.** Ann Int Med. 1932; 6: 644-654.
- Miller DL, Manuel MJ, Baldwin C, Burtle G, Ingram D, Hines II ME, Frazier, KS. ***West Nile virus* in farmed alligators.** Emerg Infect Dis. 2003; 9(7): 794-799.
- Miserani MG, McManus C, Santos SA, Silva JA, Mariante AS, Abreu UGP. **Avaliação dos fatores que influem nas medidas lineares do cavalo pantaneiro.** Rev Bras Zootec. 2002; 31(1): 335-341.
- Mitchell CJ, Forattini OP. **Experimental transmission of *Rocio encephalitis virus* by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil.** J Med Entomol. 1984; 21(1): 34-37.
- Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR. **Vector competence experiments with *Rocio virus* and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil.** Rev Saude Publica. 1986; 20: 171-177.
- Mitchell CJ, McLean RG, Nasci RS, Crans WJ, Smith GC, Caccamise DF. **Susceptibility parameters of *Aedes albopictus* to per oral infection with *Eastern equine encephalitis virus*.** J Med Entomol. 1993; 30(1): 233-235.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Anderson JF, Vossbrinck CR. **Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and *West Nile virus* transmission, northeastern United States.** Emerg Infect Dis. 2006; 12(3): 468-474.

Monath TP, Sabattini MS, Pauli R, Dafner JF, Mitchell CJ, Bowen GS, Cropp B. **Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980.** Am J Trop Med Hyg. 1985; 34(5): 966-975.

Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. **In:** Fields BN, Knipe DM, Howley PM. **Virology.** Philadelphia: Lippicott-Raven Publishers; 1996. pp 961-1034.

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. **Saint Louis encephalitis virus, Brazil.** Emerg Infect Dis. 2007; 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. **Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brasil.** J Clin Virol. 2007; 40: 84-86.

Montenegro D, Lacerda HR, Lira MT, Oliveira DSC, Lima AAF, Guimarães MJB, Vasconcelos PG. **Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002.** Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 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. **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, Corumbá: Embrapa Pantanal; 2000.

Morales MA, Barranteguy 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. **West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006.** Emerg Infect Dis. 2006; 12(10): 1559-1561.

Morales-Betoulle ME, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R, Cordón-Rosales C. **West Nile virus in horses, Guatemala.** Emerg Infect Dis. 2006; 6(12): 1038-1039.

Morgante O, Vance HN, Shemanchuk JA, Windsor R. **Epizootic of western encephalomyelitis virus infection in equines in Alberta in 1965.** Can J Comp Med. 1968; 32(2): 403-408.

Morrison RIG, Ross RK, Antas PTZ. Brazil. **In:** Morrison RIG, Ross RK. **Atlas of neartic shorebirds on the coast of South America.** v 2. Ottawa: Canadian Wildlife Service Special Publications; 1989.

Morris CD. Eastern equine encephalomyelitis. **In:** Monath TP. **The Arboviruses: epidemiology and ecology.** v 3. Florida: CRC Press Inc.; 1988. pp 1-20.

Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, Katz N, Liljebjelke KA, Biggerstaff BJ, Fine AD, Layton MC, Mullin SM, Johnson AJ, Martin DA, Hayes EB, Campbell GL. **Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: Results of a household-based seroepidemiological survey.** Lancet. 2001; 358: 261-264.

Nasci RS, Gottfried KL, Burkhalter KL, Ryan JR, Emmerich E, Dave K. **Sensitivity of the VecTest antigen assay for eastern equine encephalitis and western equine encephalitis viruses.** J Am Mosq Control Assoc. 2003; 19(4): 440-444.

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. **West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999.** Emerg Infect Dis. 2001; 7(4): 626-630.

Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Campbell GL, Roehrig JT, Gubler DJ, Shieh W, Zaki S, Smith P, Layton M. **The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999.** N Engl J Med. 2001; 344(24): 1807-1814.

Nassar ES, Coimbra TLM, Rocco IM, Pereira LE, Ferreira IB, Souza LTM, Souza DM, Ueda-Ito M, Bergo RCF. **Human disease caused by an arbovirus closely related to *Ilheus virus*: Report of five cases.** Intervirology. 1997; 40: 247-252.

Natal D, Urbinatti PR, Marucci D. Arbovírus vector ecology in the brazilian coastal range system. **In:** Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.** Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. pp 234-247.

Neel JV, Andrade AH, Brown GE, Eveland WE, Goobar J, Sodeman WA Jr, Stollerman GH, Weinstein ED, Wheeler AH. **Further studies of the Xavante Indians. IX: Immunologic status with respect to various diseases and organisms.** Am J Trop Med Hyg. 1968; 17(3): 486-498.

Netolitzky DJ, Schmaltz FL, Parker MD, Rayner GA, Fisher GR, Trent DW, Bader DE, Nagata LP. **Complete genomic RNA sequence of Western equine encephalitis virus and expression of the structural genes.** J Gen Virol. 2000; 81(Pt 1): 151-159.

Nogueira AX. **Pantanal: Homem e cultura.** 1.ed., Campo Grande: Editora Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2002.

Nogueira F, Couto EG, Bernardi CJ. **Geostatistics as a tool to improve sampling and statistical analysis in wetlands: A case study on dynamics of organic matter distribution in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil.** Braz J Biol. 2002; 62(4b): 861-870.

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. **Dengue virus Type 3, Brazil, 2002.** Emerg Infect Dis. 2005; 11(9): 1376-1381.

Nolen-Walston R, Bedenice D, Rodriguez C, Rushton S, Bright A, Fecteau ME, Short D, Majdalany R, Tewari D, Pedersen D, Kiupel M, Maes R, Del Piero F. **Eastern equine encephalitis in 9 south american camelids.** J Vet Intern Med. 2007; 21(4): 846-852.

Norris M. **Recovery of a strain of Western equine encephalitis virus from *Culex restuans* (Theo.) (Diptera: Culicidae).** Canad J Res Sect E. 1946; 24: 63-70.

Nunes AP, Tomás WM. **Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: Caracterização e conservação.** (Documentos, 62) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2004.

Nunes MRT, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Azevedo RSS, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC. **Oropouche virus isolation, southeast Brazil.** Emerg Infect Dis. 2005; 11(10): 1610-1613.

O'guinn ML, Lee JS, Kondig JP, ernandez R, Carbajal F. **Field detection of Eastern equine encephalitis virus in the Amazon basin region of Peru using reverse transcription-polymerase chain reaction adapted for field identification of arthropod-borne pathogens.** Am J Trop Med Hyg. 2004; 70(2): 164-171.

O'guinn ML, Turell MJ. **Effect of triethylamine on the recovery of selected South American alphaviruses, flaviviruses, and bunyaviruses from mosquito (Diptera: Culicidae) pools.** J Med Entomol. 2002; 39(5): 806-808.

Ølberg R, Barker IK, Crawshaw GJ, Bertelsen MF, Drebot MA, Andonova M. **West Nile virus encephalitis in a Barbary macaque (*Macaca sylvanus*).** Emerg Infect Dis. 2004; 10(4): 712-714.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Epidemiological trends and current situation of yellow fever.** Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). 2005.
Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/surveillance/en/index.html>

Organização Mundial da Saúde (OMS). **The yellow fever situation in Africa and South America in 2004.** Weekly Epidemiological Record. 2005 (b); 80(29): 249-256.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Virosis transmitidas por artrópodos y roedores.** Informes técnicos. 1985; 719: 126.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Yellow fever overview.** Regional Office for Africa. 2007. Disponível em: <http://www.afro.who.int/yellowfever>

Ostlund EN, Andresen JE, Andresen M. **West Nile encephalitis.** Vet Clin North Am Equine Pract. 2000; 16: 427-441.

Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ, **Equine West Nile encephalitis, United States.** Emerg Infect Dis. 2001; 4(7): 665-669.

Paddock CD, Nicholson WL, Bhatnagar J, Goldsmith CS, Greer PW, Hayes EB, Risko JA, Henderson C, Blackmore CG, Lanciotti RS, Campbell GL, Zaki SR. **Fatal hemorrhagic fever caused by West Nile virus in the United States.** Clin Infect Dis. 2006; 42(11): 1527-1535.

Paisley JE, Hinckley AF, O'Leary DR, Kramer WC, Lanciotti RS, Campbell GL, Hayes EB. **West Nile virus infection among pregnant women in a northern Colorado community, 2003 to 2004.** Pediatrics. 2006; 117: 814-820.

Pavri KM, Singh KRP. **Isolation of West Nile virus from Culex fatigans mosquitoes from western India.** Ind Jour Med Res. 1965; 53: 501-505.

Payne AF, Binduga-Gajewska I, Kauffman EB, Kramer LD. **Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay.** J Virol Methods. 2006; 134(1-2): 183-189.

Pecor JE, Jones J, Turell MJ, Fernandez R, Carbajal F, O'Guinn M, Sardalis M, Watts D, Zyzak M, Calampa C, Klein TA. **Annotated checklist of the mosquito species encountered during arboviral studies in Iquitos, Peru (Diptera: Culicidae).** J Am Mosq Control Assoc. 2000; 16(3): 210-218.

Pelegriño JL, Suarez M, Guzman MG, Vazquez S, Benitez NR. **Vigilancia de las encefalitis de san Luis, equina del este, equina del oeste en la provincia de Ciego de Avila.** Rev Cubana Med Trop. 1996; 48(2): 109-113.

Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TLM, Souza RP, Chamelet ELB. **Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*).** Rev Saude Publica. 2001; 35(2): 119-123.

Petersen LR, Roehrig JT, Hughes JM. **West Nile virus encephalitis.** N Engl J Med. 2002; 347(1): 225-226.

Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, Kaaden OR. **Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction.** Am J Trop Med Hyg. 1997; 57: 709-718.

Phalen DN, Dahlhausen B. **West Nile virus.** Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. 2004; 2(13): 67-78.

Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa APA, Leite OF. **Isolation of St. Louis Encephalitis Virus from a patient in Belém, Brazil.** Am J Trop Med Hyg. 1981; 30(1): 145-148.

Pinheiro FP, Schatzmayr H, Travassos da Rosa APA, Homma A, Bensabath G. **Arbovirus antibodies in children of rural Guanabara, Brazil.** Intervirology. 1975; 5(1-2): 93-96.

Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA, Travassos das Rosa JF. **Arboviroses.** In: Linhares, AC. **Saúde na Amazônia.** 2. ed. rev. amp., São Paulo: ANPES; 1983. pp 70-72.

Pott A, Pott VJ. **Plantas do Pantanal.** Corumbá: Embrapa-SPI; 1994.

Powell KE, Blakey DL. **St Louis encephalitis: The 1975 epidemic in Mississippi.** JAMA. 1977; 237(21): 2294-2298.

Price WH. **Studies on the immunological overlap among certain arthropod-borne viruses: the role of serologic relationships in experimental vaccination procedures.** Proc NAS. 1957; 47: 115-121.

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. **West Nile virus Infection in humans and horses, Cuba.** Emerg Infect Dis. 2006; 12(6): 1022-1024.

Quirin R, Salas M, Zientara S, Zeller H, Labie J, Murri S, Lefrançois T, Petitclerc M, Martinez D. **West Nile virus, Guadeloupe.** Emerg Infect Dis. 2004; 10(4): 706-708.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2002.

Ragusa-Netto J. **Flowers, fruits, and the abundance of the yellow-chevroned parakeet (*Brotogeris chiriri*) at a gallery forest in the south Pantanal (Brazil)**. Braz J Biol. 2004; 64(4): 867-877.

Rappole JH, Compton BW, Leimgruber P, Robertson J, King DI, Renner SC. **Modeling movement of *West Nile virus* in the Western hemisphere**. Vector Borne Zoonotic Dis. 2006; 6(2): 128-139.

Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. **Migratory birds and spread of *West Nile virus* in the Western Hemisphere**. Emerg Infect Dis. 2000; 6(4): 319-328.

Ravazzani C, Wiederkehr Filho H, Fagnani JP, Costa S. **Pantanal**. Curitiba: EDIBRAN; 1990.

Ré V, Spinsanti L, Farías A, Díaz A, Vázquez A, Aguilar J, Tenorio A, Contigiani M. **Reliable detection of *St. Louis encephalitis virus* by RT-nested PCR**. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; 26(1): 10-15.

Reed LJ, Muench H. **A simple method of estimating fifty percent endpoints**. Am J Hyg. 1938; 27: 493-497.

Reisen WK, Meyer RP, Milby MM, Presser SB, Emmons RW, Hardy JL, Reeves WC. **Ecological observations on the 1989 outbreak of *St. Louis encephalitis virus* in the southern San Joaquin valley of California**. J Med Entomol. 1992; 29(3): 472-482.

Reisen WK, Monath TP. Western equine encephalomyelitis. **In: Monath TP. The Arboviruses: epidemiology and ecology**. v 3. Florida: CRC Press Inc.; 1988. pp 89-130.

Rivas F, Diaz LA, Cardenas VM, Daza E, Bruzon L, Alcalá A, *et al.* **Epidemic venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colômbia, 1995**. J Infect Dis. 1997; 175: 828-832.

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. ***St. Louis encephalitis virus*: First isolation from a human in São Paulo state, Brazil**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005; 47(5): 281-285.

Rodaniche E, Galindo P. **Ecological observations on Ilhéus virus in the vicinity of Almirante, Republic of Panamá**. Am J Trop Med Hyg. 1963; 12: 924-928.

Rodaniche E, Galindo P. **Isolation of Ilhéus virus from *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala em 1956**. Am J Trop Med Hyg. 1957; 6: 686-687.

Rodaniche E, Galindo P. **Isolation of the virus of Ilhéus encephalitis from mosquitoes captured in Panamá**. Am J Trop Med Hyg. 1961; 10: 393-394.

Rodaniche E, Galindo P. **Isolation of Yellow fever virus from *Haemagogus mesodentatus*, *H. equinus* and *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala in 1956.** Am J Trop Med Hyg. 1957; 6(2): 232-237.

Rodaniche E, Galindo P, Johnson CM. **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. 1957; 6(4): 681-685.

Rodrigues JG. **Manual de elaboração de referências bibliográficas: Normas de Vancouver.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cict/estrutura/departamentos/bibmang/pvancouver.htm>

Romano-Lieber NS, Iversson LB. **Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica.** Rev Saude Publica. 2000; 34(3): 236-242.

Rosa AN, Melo J. **Levantamento da situação atual da produção de touros para o pantanal mato-grossense.** (Comunicado Técnico, 14) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1995.

Ryan J, Dave K, Emmerich E, Fernandez B, Turell M, Johnson J, Gottfried K, Burkhalter K, Kerst A, Hunt A, Wirtz R, Nasci R. **Wicking assays for the rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viral antigens in mosquitoes (Diptera: Culicidae).** J Med Entomol. 2003; 40(1): 95-99.

Sabattini MS, Monath TP, Mitchell CJ, Daffner JF, Bowen GS, Pauli R, Contigiani MS. **Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980: Historical aspects and description of study sites.** Am J Trop Med Hyg. 1985; 34(5): 937-944.

Saldanha P, Werneck P. **Expedições, terras e povos do Brasil, Pantanal.** Rio de Janeiro: Edições Del Prado; 1998.

Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, Tenorio A. **Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification.** J Virol Methods. 2005; 126: 101-109.

Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. **A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the *Alphavirus* genus.** J Virol Methods. 2001; 95: 153-161.

Sanmartin-Barberi C, Groot H, Osorno-Mesa E. **Human epidemic in Colômbia caused by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus.** Am J Trop Med Hyg. 1954; 3: 283-293.

Santos CLS, Sallum MAMS, Franco HM, Oshiro FM, Rocco IM. **Genetic characterization of *St. Louis encephalitis virus* isolated from human in São Paulo, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 (a); 101(1): 57-63.

Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, Melo MM, Kmetzsch CI, Costa EV, Silva EE. **Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003.** J Med Virol. 2006 (b); 78(1): 98-104.

Santos NSO. Diagnóstico laboratorial das viroses. **In:** Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. **Introdução a virologia humana.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2002. pp 24-46.

Santos SA. **Recomendações sobre manejo nutricional para equinos criados em pastagens nativas no Pantanal.** (Documentos, 22) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1997.

Santos SA, Mazza MCM, Sereno JRB, Abreu UGP, Silva JA. **Avaliação e conservação do cavalo Pantaneiro.** (Circular técnica, 21) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1995.

Santos SA, Mazza MCM, Sereno JRB, Mazza CAS, Pedreira ACMS, Mareante AS, Comastri Filho JA, Silva JA, Marques MCA. **Descrição do manejo geral de cavalos pantaneiros na região do Pantanal.** (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 63) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2005.

Santos SA, Silva MP, Mauro RA. **Preferência alimentar e uso do habitat do cavalo Pantaneiro na Nhecolândia, Pantanal.** (Comunicado Técnico, 11) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1993.

Schatzmayr HC, Barth OM. Características gerais dos vírus patogênicos para o homem. **In:** Coura JC. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** v 2. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. pp 1645-1660.

Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. **An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro, 1986.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81(2): 245-226.

Scherer WF, Anderson K. **Antigenic and biologic characteristics of Venezuelan encephalitis virus strains including a possible new subtype, isolated from the Amazon region of Peru in 1971.** Am J Epidemiol. 1975; 101(4): 356-361.

Scherer WF, Chin J. **An unusual strain of Venezuelan encephalitis virus existing simpatrically with subtype I-D strains in a peruvian rain Forest.** Am J Trop Hyg. 1983; 32(4): 871-876.

Schmidt JR, El Mansoury HK. **Natural and experimental infection of egyptian equines with West Nile virus.** Ann Trop Med Parasitol. 1963; 57: 415-427.

Schmitt SM, Cooley TM, Fitzgerald SD, Bolin SR, Lim A, Schaefer SM, Kiupel M, Maes RK, Hogle SA, O'Brien DJ. **An outbreak of Eastern equine encephalitis virus in free-ranging white-tailed deer in Michigan.** J Wildl Dis. 2007; 43(4): 635-644.

Scott TW, Olson JG, All BP 3rd, Gibbs EP. **Detection of Eastern equine encephalomyelitis virus antigen in equine brain tissue by enzyme-linked immunosorbent assay.** Am J Vet Res. 1988; 49(10): 1716-1718.

Scott TW, Weaver SC. **Eastern equine encephalomyelitis virus: Epidemiology and evolution of mosquito transmission.** Adv Virus Res. 1989; 37: 277-328.

Secchin C. **Pantanal Matogrossense/Carlos Secchin.** Rio de Janeiro: Cor Ação; 1985.

Seidl A, Moraes AS, Aguilar R, Silva MS. **A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal.** *Prev Vet Med.* 1998; 33(1): 219-234.

Sejvar JJ, Leis AA, Stokic DS, Van Gerpen JA, Marfin AA, Webb R, Haddad MB, Tierney BC, Slavinski SA, Polk JL, Dostrow V, Winkelmann M, Petersen LR. **Acute flaccid paralysis and *West Nile virus* Infection.** *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(7): 788-793.

Sereno JRB, Melo MIV, Henry MRJM, Cassali GD. **Estudo do comportamento sexual de equinos da raça pantaneira no período peripuberal.** (Comunicado Técnico, 18) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1996.

Sereno JRB, Santos SA, Zúccari CESZ, Mazza MCM. **Avaliação do desempenho reprodutivo e estabelecimento da estação de monta de equinos em regime de monta natural a campo no pantanal.** (Comunicado Técnico, 15) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1996.

Serra-Freire NM. Ácaros (carrapatos e outros). **In:** Marcondes CB. **Entomologia médica e veterinária.** São Paulo: Editora Atheneu; 2001.

Shope RE, Causey OR, Andrade AHP, Theiler M. The Venezuelan Equine Encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13(5): 723-727. **In: Memórias do Instituto Evandro Chagas.** Série: Produção Científica, v 7. Belém: Gráfica Rápida Ltda.; 2002. pp 191-202.

Sick H. **Migrações de aves na América do Sul continental.** (Publicação Técnica, 2) Brasília: Centro de Estudos de Migrações de Aves: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Ministério da Agricultura; 1983.

Sick H. **Ornitologia brasileira.** Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira; 1997.

Siirin M, Sargent C, Langer RC, Parsons R, Vanlandingham DL, Higgs S, Tesh RB. **Comparative sensitivity of the VecTest antigen-capture assay, reverse transcriptase-PCR, and cell culture for detection of *West Nile virus* in dead birds.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2004; 4(3): 204-209.

Silva JV, Abdon MM. **Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões.** *Pesq Agropec Bras.* 1998; 33: 1703-1711.

Silva MP, Mauro R, Mourão G, Coutinho EM. **Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo.** *Rev Bras Bot.* 2000; 23(2): 143-152.

Silva RAMS, Abreu UGP, Barros ATM. **Anemia infecciosa equina: Epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal.** (Circular Técnica, 29) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2001.

Silva RAMS, Barros ATM, Neto AAC, Lopes N, Cortada VMC, Matsuura TMSM, Feldens O, Mori AE, Madureira J, Santos SAAP, Bandini O. **Programa de prevenção e controle da Anemia infecciosa equina no Pantanal Sul-Mato-Grossense.** (Documento, 68) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2004.

Silva RAMS, Sanchez V, D'ávila AMR. **Metodologia do teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da tripanosomose equina.** (Circular Técnica, 39) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2003.

Skupski DW, Eglinton GS, Fine AD, Hayes EB, O'Leary DR. **West Nile virus during pregnancy: A case study of early second trimester maternal infection.** Fetal Diagn Ther. 2006; 21: 293-295.

Smithburn JS, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. **A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda.** Am J Trop Med Hyg. 1940; 20: 471-492.

Smithburn KC, Haddow AJ, Lumsden WH. **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. 1949; 43(1): 74-89.

Solorzano EG. **Yellow fever in Ecuador.** Rev Ecuat Hig Med Trop. 1953; 10(1-2): 1-6.

Soriano BMA. **Caracterização climática da Sub-região da Nhecolândia, Pantanal-MS.** In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, II, 1996, Corumbá: Embrapa Pantanal; 1999.

Soriano BMA, Galdino S. **Análise das condições climáticas em 2000 na Sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil.** (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 30) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2002.

Soriano BMA, Oliveira H, Catto JB, Filho JAC, Galdino S, Salis SM. **Plano de utilização da Fazenda Nhumirim.** (Documento, 21) Corumbá: Embrapa Pantanal; 1997.

Souza RV, Cunha RV, Miagostovich MP, Timbó MJ, Montenegro F, Pessoa ET, Nogueira RM, Schatzmayr HG. **An outbreak of dengue in the state of Ceará, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90(3): 345-346.

Spalatin J, Connell R, Burton AN, Gollop BJ. **Western equine encephalitis in Saskatchewan reptiles and amphibians, 1961-1963.** Can J Comp Med Vet Sci. 1964; 28: 131-142.

Spalding MG, McLean RG, Burgess JH, Kirk LJ. **Arboviruses in water birds (ciconiiformes, pelecaniformes) from Florida.** J Wildl Dis. 1994; 30(2): 216-221.

Spence L, Artsob H, Grant L, Th'ng C. **St. Louis encephalitis in southern Ontario: Laboratory studies for arboviruses.** Can Med Assoc J. 1977; 116(1): 35-37.

Spence L, Downs WG, Aitken TH. **Eastern equine encephalitis virus in the West Indies and British Guiana.** West Indian Med J. 1961; 10: 227-229.

Spinsanti L, Basquiera AL, Bulacio S, Somale V, Kim SCH, Ré V, Rabbat D, Zárate A, Zlocowski JC, QuirogaMayor C, Contigiani M, Palacio S. **St. Louis Encephalitis in Argentina: the first case reported in the last seventeen years.** Emerg Infect Dis. 2003; 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. **Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005.** J Clin Virol. 2008; 42(1): 27-33.

Steinman A, Banet-Noach C, Tal S, Levi O, Simanov L, Perk S, Malkinson M, Shpigel N. **West Nile virus infection in crocodiles.** Emerg Infect Dis. 2003; 9(7): 887-888.

Straatmann A, Santos-Torres S, Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Rodrigues SG, Tavares-Neto J. **Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia.** Rev Soc Bras Med Trop. 1997; 30: 511-515.

Talarmin A, Chandler LJ, Kazanji M, Thoisy B, Debon P, Lelarge J, Labeau B, Bourreau E, Vié JC, Shope RE, Sarthou J. **Mayaro virus fever in French Guiana: Isolation, identification and seroprevalence.** Am J Trop Med Hyg. 1998; 59(3): 452-456.

Tate CM, Howerth EW, Stallknecht DE, Allison AB, Fischer JR, Mead DG. **Eastern equine encephalitis in a free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*).** J Wildl Dis. 2005; 41(1): 241-245.

Tavares-Neto J, Rodrigues SG, Bastos C, Torres-Morales AE, Travassos da Rosa A. **Recent occurrence of human infection by Rocio arbovirus in Salvador, Bahia, Brazil.** In: Resumos do XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 3-7 mar.; Goiânia. 1996. p 76.

Tavares-Neto J, Rosa APAT, Vasconcelos PFC, Costa JML, Rosa JFST, Marsden PD. **Pesquisa de anticorpos para arbovirus no soro de residentes no povoado de Corte de Pedra, Valença, Bahia.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81(4): 351-358.

Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. **A study of the ecology of West Nile virus in Egypt.** Am J Trop Med Hyg. 1956; 5(4): 579-620.

Telino-Junior WR, Azevedo-Junior SM, Lyra-Neves RM. **Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil.** Rev Bras Zool. 2003; 20(3): 451-456.

Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, Ramirez G, Vasquez B, Hayes CG, Rossi CA, Powers AM, Hice CL, Chandler LJ, Cropp BC, Karabatsos N, Roehrig JT, Gubler DJ. **Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America.** Clin Infect Dis. 1999; 28: 67-73.

Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M. **Mayaro virus in wild mammals French Guiana.** Emerg Infect Dis. 2003; 9(10): 1326-1329.

Thonnon J, Fontenille D, Tall A, Diallo M, Renaudineau Y, Baudez B, Raphenon G. **Re-emergence of yellow fever in Senegal in 1995.** Am J Trop Med Hyg. 1998; 59(1): 108-114.

Tiriba AC, Miziara AM, Lourenço R, Costa CRB, Costa CS, Pinto GH. **Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do Estado de São Paulo.** Rev Assoc Med Bras. 1976; 22: 415-420.

Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdarendeli A. **Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Genetic analysis and tick survey in Turkey.** J Clin Microbiol. 2006; 44(11): 4120-4124.

Tonry JH, Brown CB, Cropp CB, Co JKG, Bennett SN, Nerurkar VR, Kuberski T, Gubler DJ. **West Nile virus detection in urine.** Emerg Infect Dis. 2005 (a); 11(8): 1294-1296.

Tonry JH, Xiao S-Y, Siriin M, Hongli C, Travassos da Rosa A, Tesh RB. **Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters.** Am J Trop Med Hyg. 2005 (b); 72: 320-324.

Trainer DO, Hoff GL. **Serologic evidence of arbovirus activity in a moose population in Alberta.** J Wildl Dis. 1971; 7: 118-119.

Travassos J, Bruno-Lobo M, Bruno-Lobo GG. **Estudos sobre os arbovírus V: Inquérito sorológico e avaliação da imunidade pós-vacinal em equinos no Rio de Janeiro.** An Microbiol. 1961; 9 (parte A): 213-225.

Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC. Arboviroses. **In: Leão RNQ. Doenças infecciosas e parasitárias: Enfoque amazônico.** Belém: Editora Cejup Ltda.; 1997. pp 207-225.

Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dias LB, Cruz ACR. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. **In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.** Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. pp 19-31.

Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Hervé J-P, Travassos Da Rosa JFS. **Surto de febre amarela silvestre no estado do Pará, Brasil.** Boi Epidemiol. 1984; 16(15): 97-104.

Trock SC, Meade BJ, Glaser AL, Ostlund EN, Lanciotti RS, Cropp BC, Kulasekera V, Kramer LD, Komar N. **West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000.** Emerg Infect Dis. 2001; 4(7): 745-747.

Tsai TF, Canfield MA, Reed CM, Flannery VL, Sullivan KH, Reeve GR, Bailey RE, Poland JD. **Epidemiological aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Harris County, Texas, 1986.** J Infect Dis. 1988; 157(2): 351-356.

Tsai TF, Cobb WB, Bolin RA, Gilman NJ, Smith GC, Bailey RE, Poland JD, Doran JJ, Emerson JK, Lampert KJ. **Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis outbreak in Mesa County, Colorado.** Am J Epidemiol. 1987; 126(3): 460-473.

Tsai TF, Mitchell CJ. St. Louis encephalitis. **In: Monath TP. The Arboviruses: Epidemiology and ecology.** v 4. Florida: CRC Press Inc.; 1988. pp 113-144.

Tubelis DP, Tomás WM. **Revisão e atualização da listagem de espécies de aves registradas na planície do Pantanal.** (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 39) Corumbá: Embrapa Pantanal; 2002.

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. **Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera:Culicidae) collected in the Amazon basin region of Peru.** J Med Entomol. 2005; 42(5): 891-898.

Ubico SR, McLean RG. **Serologic survey of neotropical bats in Guatemala for virus antibodies.** J Wildl Dis. 1995; 31(1): 1-9.

United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). **World heritage committee inscribes 61 new sites on world heritage list.** 2000.

Disponível em: <http://whc.unesco.org/en/list/999>

Unnasch RS, Sprenger T, Katholi CR, Cuppd EW, Hill GE, Unnasch TR. **A dynamic transmission model of Eastern equine encephalitis virus.** Ecol Modell. 2006; 192: 425-440.

Vaidyanathan R, Scott TW. **Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection.** Apoptosis. 2006; 11(9): 1643-1651.

Varma MGR. Japanese Encephalitis (JE) (Japanese B encephalitis, Russian autumnal encephalitis, summer encephalitis). **In: Organização Mundial da Saúde (OMS). Vector biology and control division. Geographic distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors;** 1989 (a). pp 39-42.

Varma MGR. Yellow fever. **In: Organização Mundial da Saúde (OMS). Vector biology and control division. Geographic distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors;** 1989 (b). pp 35-36.

Vasconcelos PF, 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. **Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: Implications of climatic alterations in disease spread.** J Med Virol. 2001 (a); 65(3):598-604.

Vasconcelos PF, Rodrigues SG, Degallier N, Moraes MA, da Rosa JF, da Rosa ES, Mondet B, Barros VL, da Rosa AP. **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. 1997; 57(2): 132-137.

Vasconcelos PFC, Rosa AP, Rodrigues SG, Rosa ES, Monteiro HA, Cruz AC, Barros VL, Souza MR, Rosa JF. **Yellow fever in Pará State, Amazon region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and epidemiologic findings.** Emerg Infect Dis. 2001 (b); 7(3 Suppl): 565-569.

Vasconcelos PFC, Sperb AF, Monteiro HA, Torres MA, Sousa MR, Vasconcelos HB, Mardini LB, Rodrigues SG. **Isolations of Yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul state, Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 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. Arboviruses pathogenic for man in Brasil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.** Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. pp 72-99.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JFS. **Gestão imprópria do ecossistema natural na Amazônia brasileira resulta na emergência e reemergência de arbovírus.** Cad Saude Publica. 2001 (c); 17: 155-164.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa APA, Dégallier N, Pinheiro FP, Sá Filho, GC. **Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991; 33(6): 465-476.

Vieira, AML, Souza CE, Labruna MB, Mayo RC, Souza SSL, Camargo-Neves VLF. **Manual de vigilância acarológica.** Superintendência de controle de endemias, Secretaria de estado da saúde, Governo do estado de São Paulo. São Paulo: Imprensaoficial; 2004. pp 62.

Volchkov VE, Volchkova VA, Netesov SV. **Complete nucleotide sequence of the Eastern equine encephalomyelitis virus genome.** Mol Gen Mikrobiol Virusol. 1991; 5: 8-15.

Walder R, Suarez OM. **Studies of arboviruses in southwestern Venezuela: I: Isolations of venezuelan and eastern equine encephalitis viruses from sentinel hamsters in the Catatumbo region.** Int J Epidemiol. 1976; 5(4): 375-378.

Waldridge BM, Wenzel JG, Ellis AC, Rowe-Morton SE, Bridges ER, D'Andrea G, Wint R. **Serologic responses to eastern and western equine encephalomyelitis vaccination in previously vaccinated horses.** Vet Ther. 2003; 4(3): 242-248.

Ward MP. **Epidemic West Nile virus encephalomyelitis: A temperature-dependent, spatial model of disease dynamics.** Prev Vet Med. 2005; 71: 253-264.

Watts DM, Lavera V, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, Cropp CB, Karabastos N, Smith JF, Gubler DJ, Wooster MT, Nelson WM, Hayes CG. **Venezuelan equine encephalitis and Oropouche virus infections among peruvian army troops in the amazon region of Peru.** Am J Trop Med Hyg. 1997; 56(6): 661-667.

Watts DM, Lavera V, Callahan J, Rossi C, Oberste MS, Roehrig JT, Wooster MT, Smith JF, Cropp CB, Gentrau EM, Karabastos N, Gubler D, Hayes CG. **Venezuelan equine encephalitis febrile cases among humans in the peruvian Amazon river region.** Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(1): 35-40.

Weaver SC. **Evolutionary influences in arboviral disease.** Curr Top Microbiol Immunol. 2006; 299: 285-314.

- Weaver SC, Hagenbaugh A, Bellew LA, Gousset L, Mallampalli V, Holland JJ, Scott TW. **Evolution of alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex.** J Virol. 1994; 68(1): 158-169.
- Weaver SC, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig GV, Oberste MS, Boshell J, Tesh RB. **Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America.** Lancet. 1996; 348: 436-440.
- Webster LT, Wright FH. **Recovery of Eastern equine encephalomyelitis virus from brain tissue of human cases of encephalitis in Massachusetts.** Science. 1938; 88: 305-306.
- White LA. **Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection.** J Clin Microbiol. 1987; 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. **Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of *West Nile virus*, New York state.** Emerg Infect Dis. 2001; 7(4): 643-649.
- Young NA, Johnson KM. **Antigenic variants of *Venezuelan equine encephalitis virus*: Their geographic distribution and epidemiologic significance.** Am J Epidemiol. 1969; 89: 286-307.
- Zeinad AK, Novaretti MCZ, Chamone DAF. **Vírus do Nilo ocidental: Nova ameaça à segurança transfusional?.** Rev Bras Hematol Hemoter. 2004; 26(2): 114-121.
- Zhang Z, Wilson F, Read R, Pace L, Zhang S. **Detection and characterization of naturally acquired *West Nile virus* infection in a female wild turkey.** J Vet Diagn Invest. 2006; 18(2): 204-208.
- Zweighthaft RM, Rasmussen C, Brolnitsky O, Lashof JC. **St. Louis encephalitis: The Chicago experience.** Am J Trop Med Hyg. 1979; 28(1): 114-118.

ANEXO A



Pantanal

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE SANGUE DE EQUÍNOS
PERTENCENTES À EMBRAPA PANTANAL**

Título do trabalho a ser realizado: Contribuição para o estudo da circulação de arbovírus na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense.

Responsável: Dr. Edson Elias da Silva, chefe do Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose em orientação do médico veterinário Alex Pauvolid Corrêa, aluno do curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.

Instituição a que pertence o pesquisador responsável: Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde.

Nome do proprietário dos animais a serem utilizados: Centro de Pesquisa do Pantanal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pantanal)

Convidamos a instituição Embrapa Pantanal a participar da pesquisa intitulada "Contribuição para o estudo da circulação de arbovírus na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense, de responsabilidade do pesquisador Dr. Edson Elias da Silva, chefe do Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose em orientação a Alex Pauvolid Corrêa, aluno do curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.

A pesquisa objetivou contribuir para o conhecimento da circulação de arbovírus na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense, através de análises laboratoriais de alíquotas de sangue eqüino. Foram coletados 10 ml de sangue total de 94 eqüinos pertencentes à Embrapa Pantanal, através de venopunção em veia jugular esquerda. Para minimizar o risco de eventual sangramento e hematoma no local da venopunção, uma leve compressão por 30 segundos seguida por aplicação de solução comercial larvicida, repelente e cicatrizante foi realizada após a venopunção. Entre os benefícios encontrados estão o conhecimento da circulação arboviral entre os animais avaliados. A participação da Embrapa foi voluntária, cabendo a instituição o direito de desistir a qualquer tempo. As informações geradas pela pesquisa podem ser acessadas pela Embrapa Pantanal a partir do contato com o pesquisador responsável a qualquer momento. Os gastos referentes às coletas e ao processamento das amostras foram de responsabilidade do Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose.

Eu, José Aníbal Comastri Filho, Chefe-Geral da Embrapa Pantanal declaro ter sido informado e concordado em participar, como instituição colaboradora da pesquisa acima descrita.


JOSE ANIBAL COMASTRI FILHO
Chefe-Geral da Embrapa Pantanal

Alex-PC/Elza-eib

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal – Embrapa Pantanal
Rua 21 de Setembro nº 1880 – Bairro N. S. de Fátima
Caixa Postal 109 CEP 79320-900 Corumbá – MS
Tel: +55 (67) 3233-2430 Fax: +55 (67) 3233-1011
www.cpap.embrapa.br – chgeral@cpap.embrapa.br

ANEXO B

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE SANGUE DE EQUINOS PERTENCENTES À FAZENDA SANTA MARIA

Dados de identificação

Título do trabalho a ser realizado: **Contribuição para o estudo da circulação de arbovírus na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense.**

Responsável: **Dr. Edson Elias da Silva, chefe do Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose em orientação do médico veterinário Alex Pauvolid Corrêa, aluno do curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.**

Instituição a que pertence o pesquisador responsável: **Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde.**

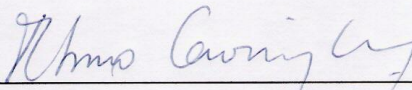
Telefones para contato: **(21) 25621804 (21) 25647638**

Nome do proprietário dos animais a serem utilizados: **Agropecuária Curvo LTDA.**

Convidamos a Agropecuária Curvo LTDA. a participar da pesquisa intitulada "Contribuição para o estudo da circulação de arbovírus na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense, de responsabilidade do pesquisador Dr. Edson Elias da Silva, chefe do Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose em orientação a Alex Pauvolid Corrêa, aluno do curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, na condição de propriedade particular colaboradora.

A pesquisa objetivou contribuir para o conhecimento da circulação de arbovírus na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense, através de análises laboratoriais de alíquotas de sangue equino. Foram coletados 10 ml de sangue total de 42 equinos pertencentes à Fazenda Santa Maria, através de venopunção em veia jugular esquerda. Para minimizar o risco de eventual sangramento e hematoma no local da venopunção, uma leve compressão por 30 segundos seguida por aplicação de solução comercial larvicida, repelente e cicatrizante foi realizada após a venopunção. Entre os benefícios encontrados estão o conhecimento da circulação arboviral entre os animais avaliados. A participação da Fazenda Santa Maria foi voluntária, cabendo a propriedade o direito de desistir a qualquer tempo. As informações geradas pela pesquisa podem ser acessadas pela Agropecuária Curvo LTDA a partir do contato com o pesquisador responsável a qualquer momento. Os gastos referentes às coletas e ao processamento das amostras foram de responsabilidade do Laboratório de Referência Nacional e Internacional para Enterovirose.

Eu, Elísio Camorim Curvo, proprietário da Fazenda Santa Maria declaro ter sido informado e concordado em participar, como colaborador voluntário da pesquisa acima descrita.



Sr. Elísio Camorim Curvo
(Agropecuária Curvo LTDA)

Ficha para coleta de sangue equino realizada em **fevereiro de 2007** na Fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal e Fazenda Santa Maria na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense.

Coleta: Alex Pauvolid Corrêa e Fernando Tavares

COLETA DE SORO EQUINO

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 ^(EHV-1) mês/ano (/)
 () Influenza mês/ano (/) () Encefalomielite mês/ano (/)
 () Rinopneumonite ^(EHV-1/EHV-4) 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 ^(EHV-1) mês/ano (/)
 () Influenza mês/ano (/) () Encefalomielite mês/ano (/)
 () Rinopneumonite ^(EHV-1/EHV-4) 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 ^(EHV-1) mês/ano (/)
 () Influenza mês/ano (/) () Encefalomielite mês/ano (/)
 () Rinopneumonite ^(EHV-1/EHV-4) 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 ^(EHV-1) mês/ano (/)
 () Influenza mês/ano (/) () Encefalomielite mês/ano (/)
 () Rinopneumonite ^(EHV-1/EHV-4) mês/ano (/) () Tétano mês/ano (/)

ANEXO E

Soroneutralização com MAYV (1:8)

Células: _____ Nº #: _____ Data: _____ []: _____

CCID₅₀ MAYV: _____ Diluição viral utilizada: _____

A	01	02	03	04	05	CV	CC
B	06	07	08	09	10		
C	11	12	13	14	15		
D	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25		
F	26	27	28	29	30		
G	31	32	33	34	35		
H	36	37	38	39	40		

Data: ____ / ____ / ____

A	01	02	03	04	05	CV	CC
B	06	07	08	09	10		
C	11	12	13	14	15		
D	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25		
F	26	27	28	29	30		
G	31	32	33	34	35		
H	36	37	38	39	40		

Data: ____ / ____ / ____

A	01	02	03	04	05	CV	CC
B	06	07	08	09	10		
C	11	12	13	14	15		
D	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25		
F	26	27	28	29	30		
G	31	32	33	34	35		
H	36	37	38	39	40		

Data: ____ / ____ / ____

A	01	02	03	04	05	CV	CC
B	06	07	08	09	10		
C	11	12	13	14	15		
D	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25		
F	26	27	28	29	30		
G	31	32	33	34	35		
H	36	37	38	39	40		

Data: ____ / ____ / ____

A	01	02	03	04	05	CV	CC
B	06	07	08	09	10		
C	11	12	13	14	15		
D	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25		
F	26	27	28	29	30		
G	31	32	33	34	35		
H	36	37	38	39	40		

Data: ____ / ____ / ____

A	01	02	03	04	05	CV	CC
B	06	07	08	09	10		
C	11	12	13	14	15		
D	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25		
F	26	27	28	29	30		
G	31	32	33	34	35		
H	36	37	38	39	40		

Data: ____ / ____ / ____

ANEXO F

Soroneutralização detalhada com MAYV

Células: _____ N° #: _____ CCID₅₀ MAYV: _____ Diluição viral utilizada: _____

Data célula: _____ []: _____ Data inoculação: _____

	01	02	03	04	05	CV	CC
1:8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:64	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:256	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:512	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:1024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Data: ____ / ____ / ____

	01	02	03	04	05	CV	CC
1:8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:64	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:256	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:512	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:1024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Data: ____ / ____ / ____

	01	02	03	04	05	CV	CC
1:8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:64	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:256	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:512	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:1024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Data: ____ / ____ / ____

	01	02	03	04	05	CV	CC
1:8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:64	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:256	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:512	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:1024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Data: ____ / ____ / ____

	01	02	03	04	05	CV	CC
1:8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:64	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:256	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:512	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:1024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Data: ____ / ____ / ____

	01	02	03	04	05	CV	CC
1:8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:64	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:128	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:256	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:512	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1:1024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Data: ____ / ____ / ____

ANEXO G

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SUPERINTENDÊNCIA EM MATO GROSSO DO SUL LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO			
NÚMERO LICENÇA 002/2007	Nº DE REGISTRO NO IBAMA: -----	PERÍODO DE VALIDADE 09/03/2007 a 09/03/2008	PROC. IBAMA Nº 02001.000171/2007-39
OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRE/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> OUTROS (especificar)		FAVORECIDO <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTIFICA <input type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSO <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> OUTROS (especificar):	
FAVORECIDO (ESPECIFICAÇÃO) NOME: ALEX PAULOVID CORREA – INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RESPONSÁVEL TÉCNICO: ALEX PAULOVID CORREA ENDEREÇO: RUA COMANDANTE RUBENS SILVA, 323 AP 405 – JACAREPAGUÁ – RIO DE JANEIRO/RJ CEP 22.745-281, FONE (21) 93417293 – 3415-5803			
MEIO DE TRANSPORTE: AÉREO RESPONSÁVEL PELO TRANSPORTE: O Responsável Técnico PROCEDENCIA/LOCAL CAPTURA/ LOCAL PESQUISA: CORUMBÁ – PANTANAL /MS DESTINO: INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – Pavilhão Cardoso Fontes – Departamento de Virologia – Laboratório de Enterovírus – Sala 16, Av. Brasil, 4365, Manguinhos – Rio de Janeiro/RJ Cx. Postal 926 – CEP: 21.045-900.			
LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR/POPULAR	
DIVERSOS	<i>culicídeos</i>	MOSQUITO PREGO, PERNILONGO DENTRE OUTROS	
OBSERVAÇÕES: <ul style="list-style-type: none"> • Esta licença autoriza a captura, coleta e transporte conforme especificado acima, em atendimento ao Projeto de Pesquisa "Contribuição para o Estudo da Circulação de Arbovírus na Região do Pantanal". • Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória nº 2186-16/01, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso à amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do IBAMA, nos termos da Medida Provisória nº 2186-16/2001 e Decreto nº 3.945/2001; • Logo após o vencimento da validade desta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao Núcleo de Fauna do IBAMA/MS, o Relatório das atividades desenvolvidas em função da Licença expedida, bem como cópia dos trabalhos publicados como decorrência. Tal relatório deverá ser entregue em duas vias, sendo uma impressa e outra em meio digital. 			
LOCAL E DATA DE EMISSÃO: Campo Grande (MS), 09 de março de 2007.		AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO) Marcio Ferreira Yule Superintendente - Substituto IBAMA - MS	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO ▪ SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DUA), INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PUBLICOS; ▪ VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS. 			
MOD. 09.008 1ª VIA – INTERESSADO 2ª VIA - PROCESSO			

ANEXO H

Coleta e captura de culicídeos realizada em **fevereiro de 2007** na Fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense.

Coleta e captura: Jeronimo Alencar, Júlia Silva, Fernando Tavares e Alex Pauvolid Corrêa
Identificação: Jerônimo Alencar e Júlia Silva

Dados meteorológicos:

<http://reia.inmet.gov.br/sonabra/dbRegSonabra.php?remove=.%2Farquivos%2F1206207936.dat&codEst=A717&dtaini=07%2F02%2F2007&dtafim=09%2F02%2F2007&Submit=Pesquisar>

06/02/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 15:00h e término às 16:00h

Invernada Reserva (06) (à beira da estrada)

Dados meteorológicos de 19 UTC do dia 06/02/07 a 20 UTC do dia 06/02/07

Temperatura mínima 31.3°C e máxima 32.7°C

Umidade mínima 62% e máxima 69%

Pressão mínima 993.4 hPa e máxima 995.2 hPa

Vento (Velocidade mínima 3.6 m/s e máxima 4.2 m/s, Rajada mínima 8.2 m/s e máxima 9.0 m/s), Radiação mínima 2141kJm² e máxima 2494kJm², Chuva 0 mm

106 m altitude

S 18° 58' 48.0''

O 56° 37' 11.3''

Psorophora albigena

tubo 01 050 espécimes

tubo 01' 050 espécimes*

tubo 02 050 espécimes

tubo 02' 050 espécimes*

tubo 03 050 espécimes

tubo 03' 050 espécimes*

tubo 04 050 espécimes

tubo 04' 050 espécimes*

tubo 05 069 espécimes

Sabethes albicrivus

tubo 06 001 espécime

Mansonia titilans

tubo 07 003 espécimes

Ochlerotatus scapularis

tubo 08 001 espécime

06/02/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 19:00h e término às 20:00h

Invernada Sede

Dados meteorológicos de 23 UTC do dia 06/02/07 a 00 UTC do dia 07/02/07

Temperatura mínima 28.4°C e máxima 30.5°C

Umidade mínima 70% e máxima 83%

Pressão mínima 993.2 hPa e máxima 994.1 hPa

Vento (Velocidade mínima 1.8 m/s e máxima 2.6 m/s, Rajada mínima 4.1 m/s e máxima 5.7 m/s), Radiação mínima - 3.54kJm² e máxima 29.04kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0''

O 56° 37' 05.5''

Anopheles triannulatus

tubo 09 001 espécime

Anopheles albitarsis

tubo 10 035 espécimes

tubo 18 002 espécimes

Coquillettidia juxtamansonia

tubo 11 030 espécimes

tubo 17 002 espécimes

Mansonia humeralis
tubo 12 017 espécimes
tubo 14 001 espécime
Culex quinquefasciatus
tubo 13 007 espécimes
Culex sp.
tubo 15 013 espécimes
Mansonia tittilans
tubo 16 100 espécimes
tubo 19 086 espécimes

* Divisão em *pools* de 50 espécimes em 08/03/2007

07/02/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 10:00h e término às 11:00h

Invernada 07 (Ao redor da salina)

Dados meteorológicos de 14 UTC do dia 07/02/07 a 15 UTC do dia 07/02/07

Temperatura mínima 23°C e máxima 29.8°C

Umidade mínima 71% e máxima 94%

Pressão mínima 998.8 hPa e máxima 1000.8 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.6 m/s e máxima 3.0 m/s, Rajada mínima 5.4 m/s e máxima 12.7 m/s), Radiação mínima 109.1kJm² e máxima 701.4kJm², Chuva 0.6 mm

S 18° 59' 09.0``

O 56° 37' 05.5``

Psorophora albigena

tubo 20 050 espécimes

tubo 20' 050 espécimes*

tubo 21 050 espécimes

tubo 21' 050 espécimes*

tubo 22 089 espécimes

Ochlerotatus scapularis

tubo 23 001 espécime

07/02/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 15:00h e término às 16:00h

Invernada Reserva (06) (Dentro da cordilheira)

Dados meteorológicos de 19 UTC do dia 07/02/07 a 20 UTC do dia 07/02/07

Temperatura mínima 25.6°C e máxima 26.7°C

Umidade mínima 80% e máxima 85%

Pressão mínima 995.9 hPa e máxima 997.6 hPa

Vento (Velocidade mínima 2.4 m/s e máxima 2.9 m/s, Rajada mínima 4.2 m/s e máxima 5.1 m/s), Radiação mínima 1016kJm² e máxima 1096kJm², Chuva 0 mm

S 18° 58' 48.0``

O 56° 37' 11.3``

Psorophora albigena

Tubo 24 50 espécimes

Tubo 24' 50 espécimes*

Tubo 25 50 espécimes

Tubo 25' 50 espécimes*

Tubo 26 082 espécimes

Sabethes purpureus

Tubo 27 001 espécime

Psorophora ferox

Tubo 28 001 espécime

Sabethes chloropterus

Tubo 29 002 espécimes

Mansonia humeralis

Tubo 30 001 espécime

Mansonia tittilans

Tubo 31 026 espécimes

Ochlerotatus argyrothorax

Tubo 32 004 espécimes

07/02/07 Hematofagia em equino

Início às 17:00h e término às 18:00h

Invernada Sede (Galpão)

Dados meteorológicos de 21 UTC do dia 07/02/07 a 22 UTC do dia 07/02/07

Temperatura mínima 26°C e máxima 27.1°C

Umidade mínima 80% e máxima 85%

Pressão mínima 995.9 hPa e máxima 996.8 hPa

Vento (Velocidade mínima 1.9 m/s e máxima 2.5 m/s, Rajada mínima 4.1 m/s e máxima 5.1 m/s), Radiação mínima 345.6kJm² e máxima 774.3kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0"

O 56° 37' 05.5"

Psorophora albigena

Tubo 33 035 espécimes

Mansonia humeralis

Tubo 34 016 espécimes

Mansonia tititans

Tubo 35 009 espécimes

Anopheles triannulatus

Tubo 36 003 espécimes

* Divisão em *pools* de 50 espécimes em 08/03/2007

07/02/07 Hematofagia em equino

Início às 20:00h e término às 21:00h

Invernada Sede (Galpão)

Dados meteorológicos de 00 UTC do dia 08/02/07 a 01 UTC do dia 08/02/07

Temperatura mínima 24.3°C e máxima 25.4°C

Umidade mínima 84% e máxima 92%

Pressão mínima 997.2 hPa e máxima 998.7 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.1 m/s e máxima 1.0 m/s, Rajada mínima 2.3 m/s e máxima 3.0 m/s), Radiação mínima -3.54kJm² e máxima -3.53kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0"

O 56° 37' 05.5"

Mansonia humeralis

Tubo 37 003 espécimes

Mansonia tititans

Tubo 38 003 espécimes

Anopheles albitarsis

Tubo 39 056 espécimes

Anopheles triannulatus

Tubo 40 003 espécimes

Culex sp.

Tubo 41 006 espécimes

07/02/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 19:00h e término às 20:00h

Invernada Sede

Dados meteorológicos de 23 UTC do dia 07/02/07 a 00 UTC do dia 08/02/07

Temperatura mínima 25.4°C e máxima 26°C

Umidade mínima 84% e máxima 90%

Pressão mínima 996.6 hPa e máxima 998.1 hPa

Vento (Velocidade mínima 1.0 m/s e máxima 1.6 m/s, Rajada mínima 3.0 m/s e máxima 4.7 m/s), Radiação mínima -3.54kJm² e máxima 16.99kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0"

O 56° 37' 05.5"

Psorophora ciliata

Tubo 42 002 espécimes

Mansonia humeralis

Tubo 43 021 espécimes

Coquillettidia fasciolata

Tubo 44 001 espécime

Mansonia tititans

Tubo 45 019 espécimes

Psorophora albigena

Tubo 46 001 espécime

Anopheles albitarsis

Tubo 47 023 espécimes

Culex sp.

Tubo 48 008 espécimes

07/02/07 Armadilha Shannon

Início às 21:00h e término às 22:00h

Invernada Sede

Dados meteorológicos de 01 UTC do dia 08/02/07 a 02 UTC do dia 08/02/07

Temperatura mínima 24°C e máxima 24.8°C

Umidade mínima 89% e máxima 94%

Pressão mínima 998.0 hPa e máxima 999.2 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.1 m/s e máxima 1.0 m/s, Rajada mínima 1.8 m/s e máxima 2.3 m/s), Radiação mínima -3.53kJm² e máxima -3.45kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0"

O 56° 37' 05.5"

Mansonia humeralis

Tubo 49 005 espécimes

Psorophora ciliata

Tubo 50 001 espécime

Coquillettidia juxtamansonia

Tubo 51 001 espécime

Mansonia tittilans

Tubo 52 029 espécimes

Psorophora albigena

Tubo 53 002 espécimes

Aedeomyia squamipennis

Tubo 54 001 espécime

Culex sp.

Tubo 55 032 espécimes

Anopheles rondoni

Tubo 56 001 espécime

Anopheles albitarsis

Tubo 57 019 espécimes

Anopheles triannulatus

Tubo 58 004 espécimes

07/02/07 Armadilha CDC®

Início às 21:00h de 07/02/07 e término às 06:00h de 08/02/07

Invernada Sede

Dados meteorológicos de 01 UTC do dia 08/02/07 a 10 UTC do dia 08/02/07

Temperatura mínima 23.9°C e máxima 24.8°C

Umidade mínima 89% e máxima 95%

Pressão mínima 997.9 hPa e máxima 999.2 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.0 m/s e máxima 1.4 m/s, Rajada mínima 1.6 m/s e máxima 4.0 m/s), Radiação mínima -3.53kJm² e máxima 20.79kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0"

O 56° 37' 05.5"

Mansonia humeralis

Tubo 59 009 espécimes

Mansonia tittilans

Tubo 60 036 espécimes

Culex sp.

Tubo 61 043 espécimes

Anopheles albitarsis

Tubo 62 002 espécimes

08/02/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 15:00h e término às 16:00h

Invernada 19

Dados meteorológicos de 19 UTC do dia 08/02/07 a 20 UTC do dia 08/02/07

Temperatura mínima 32.1°C e máxima 33.9°C

Umidade mínima 45% e máxima 57%

Pressão mínima 995.9 hPa e máxima 997.7 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.6 m/s e máxima 1.0 m/s, Rajada mínima 4.1 m/s e máxima 4.8 m/s), Radiação mínima 2252kJm² e máxima 2719kJm², Chuva 0 mm

Psorophora albigenu
Tubo 63 50 espécimes
Tubo 63' 50 espécimes*
Mansonia tittilans
Tubo 64 003 espécimes
Psorophora albigenu
Tubo 65 018 espécimes
Ochlerotatus scapularis
Tubo 66 004 espécimes

08/02/07 Hematofagia em eqüinos

Início às 19:00h e término às 20:00h

Invernada Sede (Galpão)

Dados meteorológicos de 23 UTC do dia 08/02/07 a 00 UTC do dia 09/02/07

Temperatura mínima 27°C e máxima 31.3°C

Umidade mínima 63% e máxima 93%

Pressão mínima 995.8 hPa e máxima 997.5 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.0 m/s e máxima 0.1 m/s, Rajada mínima 0.6 m/s e máxima 2.0 m/s), Radiação mínima -3.54kJm² e máxima 16.03kJm², Chuva 0 mm

S 18° 59' 09.0''

O 56° 37' 05.5''

Culex sp.

Tubo 67 25 espécimes

Anopheles sp.

Tubo 68 20 espécimes

Mansonia humeralis

Tubo 69 01 espécime

Mansonia tittilans

Tubo 70 50 espécimes

Mansonia tittilans

Tubo 71 50 espécimes

Mansonia tittilans

Tubo 72 50 espécimes

Mansonia tittilans

Tubo 73 50 espécimes

* Divisão em grupos de 50 espécimes em 08/03/2007

ANEXO I

Coleta e captura de culicídeos realizada em **novembro de 2007** na Fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal na Sub-região da Nhecolândia no Pantanal Sul Mato Grossense.

Coleta e captura: Alex Pauvolid Corrêa
Identificação: Hércio Gil

Dados meteorológicos:

<http://reia.inmet.gov.br/sonabra/dbRegSonabra.php?remove=.%2FArquivos%2F1194818446.dat&codEst=A717&dtaini=3>

[1%2F10%2F2007&dtafim=05%2F11%2F2007&Submit=Pesquisar](#)

31/10/07 CDC®

Colocada às 19:00h do dia 31/10/07 e retirada às 06:00h do dia 01/11/07

Invernada Reserva (6) (À beira da estrada)

Dados meteorológicos de 23 UTC do dia 31/10/07 a 10 UTC do dia 01/11/07

Temperatura mínima 25°C e máxima 30.5°C

Umidade mínima 62% e máxima 82%

Pressão mínima 990.9 hPa e máxima 993.8 hPa

Vento (Velocidade mínima 1.0 m/s e máxima 3.5 m/s, Rajada mínima 1.9 m/s e máxima 6.3 m/s), Radiação mínima - 3.54 kJm² e máxima 138.4 kJm², Chuva 0 mm

106 m altitude

S 18° 58' 48.0"

O 56° 37' 11.3"

Tubos

01 - 086 fêmeas *Mansonia titillans*

02 - 006 fêmeas 02 machos *Anopheles albitarsis*

001 macho *Culex declarator*

2,5 - 003 fêmeas *Culex declarator* parasitadas por ácaro

03 - Não Culicidae

01/11/07 Armadilha Shannon

Colocada às 18:00h e retirada às 19:30h do dia 01/11/07

Invernada Reserva (6) (À beira da baía)

Dados meteorológicos de 22 UTC do dia 01/11/07 a 00 UTC do dia 02/11/07

Temperatura mínima 27.4°C e máxima 33.8°C

Umidade mínima 41% e máxima 69%

Pressão mínima 990.3 hPa e máxima 994 hPa

Vento (Velocidade mínima 1.4 m/s e máxima 4.8 m/s, Rajada mínima 6.7 m/s e máxima 9 m/s), Radiação mínima - 3.54 kJm² e máxima 80.50 kJm², Chuva 0 mm

103 m altitude

S 18° 58' 04.1"

WO 56° 37' 53.5"

Tubos

04 - 100 fêmeas *Mansonia titillans*

05 - 058 fêmeas *Mansonia titillans*

06 - 033 fêmeas *Anopheles triannulatus*

07 - 023 machos *Mansonia titillans*, *Mansonia amazonensis*

001 macho *Cx. (Melanoconion)* sp.

002 macho *Cx. declarator*

08 - 022 machos *Anopheles albitarsis*

09 - 047 fêmeas 02 machos *Mansonia titillans* parasitados por ácaro

10 - 100 fêmeas *Mansonia titillans*

11 - 057 fêmeas *Mansonia titillans*

12 - 002 fêmeas *Anopheles triannulatus* parasitadas por ácaro

01/11/07 CDC®

Colocada às 18:00h do dia 01/11/07 e retirada às 06:00h do dia 02/11/07

Invernada Reserva (6) (Dentro da cordilheira próxima à baía)

Dados meteorológicos de 22 UTC de 01/11/07 a 10 UTC do dia 02/11/07

Temperatura mínima 21.5°C e máxima 33.8°C

Umidade mínima 41% e máxima 90%

Pressão mínima 990.3 hPa e máxima 997.6 hPa

Vento (Velocidade mínima 0 m/s e máxima 4.8 m/s, Rajada mínima 1.9 m/s e máxima 9 m/s), Radiação mínima - 3.54 kJm² e máxima 96.33 kJm², Chuva 0 mm

99 m altitude

S 18° 58' 04.3''

O 56° 37' 49.7''

Tubos

13 - 100 fêmeas *Mansonia titillans*

14 - 100 fêmeas *Mansonia titillans*

15 - 047 fêmeas *Mansonia titillans*

16 - 039 fêmeas *Anopheles triannulatus*

001 macho *Psorophora ferox*

17 - 021 machos *Mansonia titillans*

002 machos *Cx. declarator*

002 machos *Cx. chidestri*

18 - 032 fêmeas 01 macho *Mansonia titillans* parasitados por ácaro

19 - Chironomidae ?? 180

20 - Não Culicidae

21 - Não Culicidae

22 - 002 machos e 01 fêmea *Tabanus importunus*

001 macho *Tabanus wilkersoni*

23 - Não Culicidae

02/11/07 Isca Eqüina

Início às 18:00h e término às 18:30h

Invernada Sede (Galpão que fica à beira da baía)

Dados meteorológicos de 22 UTC do dia 02/11/07

Temperatura mínima 22.2°C e máxima 23.7°C

Umidade mínima 72% e máxima 76%

Pressão mínima 996 hPa e máxima 996.8 hPa

Vento (Velocidade 5.2 m/s, Rajada 9.6 m/s), Radiação 122.2 kJm², Chuva 0 mm

106 m altitude

S 18° 59' 09.0''

O 56° 37' 05.5''

Tubos

24 - 033 fêmeas *Mansonia titillans*

25 - 006 fêmeas *Mansonia titillans* parasitadas por ácaro

26 - Não Culicidae

03/11/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 08:00h e término às 11:00h

Invernada atrás da pista de pouso dentro do capão à beira de uma baía

Dados meteorológicos de 12 UTC a 15 UTC do dia 03/11/07

Temperatura mínima 19.4°C e máxima 23.5°C

Umidade mínima 73% e máxima 91%

Pressão mínima 998.9 hPa e máxima 1000.3 hPa

Vento (Velocidade mínima 0.4 m/s e máxima 3.3 m/s, Rajada mínima 3.3 m/s e máxima 5.4 m/s), Radiação mínima 382.2 kJm² e máxima 1634 kJm², Chuva 0 mm

107 m altitude

S 18° 59' 17.2''

WO 56° 37' 07.2''

Tubos

27 - Ceratopogonidae 20 fêmeas (08:00h às 09:00h)

28 - 033 fêmeas *Mansonia titillans*

03/11/07 Hematofagia em membros da equipe

Início às 13:00h e término às 15:00h

Segunda invernada atrás da pista de pouso dentro da cordilheira próximo a uma baía

Dados meteorológicos de 17 UTC a 19 UTC do dia 03/11/07

Temperatura mínima 23.8°C e máxima 26.8°C

Umidade mínima 65% e máxima 74%

Pressão mínima 995.7 hPa e máxima 998.3 hPa

Vento (Velocidade mínima 1.6 m/s e máxima 2 m/s, Rajada mínima 3.9 m/s e máxima 4.2 m/s), Radiação mínima 1051 kJm² e máxima 1494 kJm², Chuva 0 mm
107 m altitude
S 18° 59' 05.9``
O 56° 37' 42.6``
Tubos
29 - 004 fêmeas *Ochlerotatus stigmaticus*
064 fêmeas *Ps. ferox* e *Ps. discrucians*
30 - 003 fêmeas *Mansonia titillans* parasitadas por ácaro

03/11/07 Isca Eqüina
Início às 18:00h e término às 19:00h
Invernada Sede (Atrás da garagem)
Dados meteorológicos de 22 UTC a 23 UTC do dia 03/11/07
Temperatura mínima 22.5°C e máxima 25.2°C
Umidade mínima 72% e máxima 83%
Pressão mínima 996 hPa e máxima 997.5 hPa
Vento (Velocidade mínima 2.4 m/s e máxima 3.8 m/s, Rajada mínima 5.6 m/s e máxima 7.4 m/s), Radiação mínima - 1.55 kJm² e máxima 179.5 kJm², Chuva 0 mm
102 m altitude
S 18° 59' 17.2``
O 56° 37' 04.5``
Tubos
31 - 14 fêmeas *Mansonia titillans*

03/11/07 CDC®
Início às 20:00h do dia 03/11/07 e término às 05:00h do dia 04/11/07
Invernada Sede (Dentro da casa do Sr. Roberto)
A armadilha foi desligada antes da retirada dos insetos !
Dados meteorológicos de 00 UTC a 09 UTC do dia 04/11/07
Temperatura mínima 20.6°C e máxima 22.5°C
Umidade mínima 83% e máxima 96%
Pressão mínima 996.5 hPa e máxima 998.8 hPa
Vento (Velocidade mínima 0 m/s e máxima 2.3 m/s, Rajada mínima 1.7 m/s e máxima 3.9 m/s), Radiação mínima - 3.52 kJm² e máxima - 1.39 kJm², Chuva 0 mm
103 m altitude
S 18° 59' 10.2``
O 56° 37' 05.6``
Tubos
32 - 10 fêmeas e 05 machos *Mansonia titillans* e *Culex declarator*
01 macho *An. triannulatus*

04/11/07 Hematofagia em membros da equipe
Início às 09:00h e término às 11:00h
Invernada Reserva (6) (Dentro da cordilheira à beira de uma salina)
Dados meteorológicos de 13 UTC a 15 UTC do dia 04/11/07
Temperatura mínima 23.2°C e máxima 26.4°C
Umidade mínima 74% e máxima 90%
Pressão mínima 1000 hPa e máxima 1000.6 hPa
Vento (Velocidade mínima 0.9 m/s e máxima 1.9 m/s, Rajada mínima 3.6 m/s e máxima 4.3 m/s), Radiação mínima 571.9 kJm² e máxima 1452 kJm², Chuva 0 mm
110 m altitude
S 18° 57' 36.7``
O 56° 37' 35.3``
Tubos
33 - 59 fêmeas *Ps. ferox* e 02 fêmeas *Mansonia amazonensis*
34 - 01 fêmea *Mansonia titillans* e *Ps. ferox* parasitada por ácaro

04/11/07 CDC® (no alto de uma árvore à aproximadamente 6 m de altura do solo)
Início às 18:00h do dia 04/11/07 e término às 06:00h do dia 05/11/07
Invernada atrás da pista de pouso dentro do capão à beira de uma baía
Dados meteorológicos de 22 UTC do dia 04/11/07 a 10 UTC do dia 05/11/07
Temperatura mínima 20.7°C e máxima 27.1°C
Umidade mínima 69% e máxima 96%
Pressão mínima 996.7 hPa e máxima 1000.4 hPa

Vento (Velocidade mínima 0 m/s e máxima 3.1 m/s, Rajada mínima 0.9 m/s e máxima 6.5 m/s), Radiação mínima - 3.54 kJm² e máxima 119.2 kJm², Chuva 0 mm

107 m altitude (a armadilha estava a 12 m do chão, logo 120 m de altitude)

S 18° 59' 17.2''

O 56° 37' 07.2''

Tubos

35 - 75 fêmeas 01 macho *An. triannulatus*

36 - 097 fêmeas e 01 macho *Mansonia titillans*

003 fêmeas *Cx. declarator*

37 - 038 fêmeas *Mansonia titillans* parasitadas por ácaro

38 - Culicinae ? 13 fêmeas

39 - 103 fêmeas 01 macho *Mansonia titillans*

40 - 102 fêmeas *Mansonia titillans*

ANEXO J

Protocols for mosquito trituration

Copper Clad (BB) Grinding (must be done in a biosafety cabinet)

1. Place up to 50 mosquitoes in plastic, capped culture tubes. We use 6 ml, 12x75 mm polypropylene (not polystyrene, they will break) round bottom tubes (Falcon #2063 from Becton Dickinson).
2. Place 4 copper-clad steel beads (BBs) in tube. BBs are round copper clad air gun pellets available at most discount, hardware, or sporting goods stores. BBs may be autoclaved and dried thoroughly prior to use, though we have had no problems using BBs that were not autoclaved.
3. Add 2.0 ml of BA-1 or other grinding diluent into tube with mosquitoes. Close cap tightly. Vortex 45 sec to 1 min until slurry is formed. Hold tube at a 45 degree angle.
4. BBs may be removed from the homogenate with a magnet or homogenate may be decanted into a centrifuge tube by holding a magnet to the tube while pouring off. However, BB removal from the ground pool material is optional. Preliminary testing indicates that long-term frozen storage of the homogenate with the BBs does not affect virus titer or detection by EIA, RT-PCR, or virus isolation in cell culture.
5. Centrifuge tubes at 6,000 rpm for 15 minutes to separate solid material from supernatant. Aliquot clarified suspension as required for virus testing.
6. At this point, mosquito homogenate may be frozen at -70 C until tested. Preferably, testing should be done prior to freezing to avoid titer reduction from freeze/thaw.

Mortar and Pestle Grinding (must be done in a biosafety cabinet)

1. Place 1-50 mosquitoes in a sterile, cold mortar. Add a small amount of alundum, an inert abrasive, to aid in grinding.
2. Have ready a rack with aliquots of 2.0 ml of cold diluent.
3. Add ~ 0.5 ml of cold dilute to mortar and grind mosquitoes for approximately 30 seconds. Add remaining diluent and continue grinding until mosquitoes are completely macerated.
4. Pour material into 1.7 ml microcentrifuge tubes.
5. Spin tube at 6,000 rpm for 20 min in refrigerated centrifuge.
6. Transfer aliquots of clarified supernatant as desired for virus testing. Store aliquots and pellets with remaining supernatant at -70°C.