

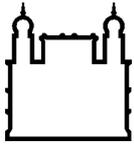
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA CIRCULAÇÃO DE FLAVIVÍRUS E
HEPACIVÍRUS EM SUÍNOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL,
BRASIL

YARA CAVALCANTE VIEIRA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

YARA CAVALCANTE VIEIRA

Investigação molecular da circulação de flavivírus e hepacivírus em suínos domésticos do Distrito Federal, Brasil.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2020

Cavalcante Vieira, Yara.

Investigação molecular da circulação de flavivírus e hepacivírus em suínos domésticos do Distrito Federal, Brasil / Yara Cavalcante Vieira. - Rio de Janeiro, 2020.

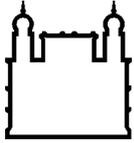
xviii, 94 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Marcelo Alves Pinto.

Bibliografia: f. 68-84

1. Flavivírus. 2. Hepacivírus. 3. Suínos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: YARA CAVALCANTE VIEIRA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA CIRCULAÇÃO DE FLAVIVÍRUS E
HEPACIVÍRUS EM SUÍNOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

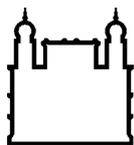
ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: 09 / 12 / 2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alex Pauvolid-Corrêa - Presidente (Texas A&M University-IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr^a. Flavia Barreto dos Santos (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr^a. Janice R. Ciacci-Zanella (EMBRAPA Suínos e Aves)
Prof. Dr^a. Simone Perecmanis (UnB)
Prof. Dr. Edson Elias da Silva (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 09 de Dezembro de 2020.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

Dedico este trabalho à minha
querida mãe,
Teresa Cavalcante.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, pela amizade, dedicação, apoio, orientação competente, espírito público e constante incentivo para a finalização deste trabalho.

À Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira, amiga e mentora, pelo companheirismo, amizade, suporte (técnico, científico e emocional) e empenho dedicado a mim e ao projeto.

À amiga Simone, pelo companheirismo, dedicação e apoio inabalável nestes tantos anos de parceria pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Alex Pauvolid-Corrêa, Dr^a Flávia Barreto dos Santos, Dr^a Janice Reis Ciacci-Zanella, Dr^a Simone Perecmanis e Dr. Edson Elias da Silva, por aceitarem o convite e contribuírem na melhoria desse estudo.

Ao Dr. Rômulo Bezerra, pelo carinho, amizade, preocupação e assistência durante a realização deste projeto.

Ao meu amado marido, Caio Capella, por todo amor, cuidado, carinho, paciência, suporte e companheirismo ao longo de todos esses anos.

Aos meus familiares, especialmente minha mãe Teresa e irmã Isabela, por todo o carinho, apoio e vibrações positivas.

Aos meus sogros, cunhado e cunhada pelo apoio e incentivo para a conclusão desta etapa.

À minha grande amiga Bárbara Costa, pela amizade e incentivo de crescimento profissional.

Aos amigos Caroline Fernandes, Pedro Albuquerque, Elizabeth Leite, Adriane Oliveira, Juci Souza, Leda Castano, Ramon Souza e todos os demais amigos do Centro de Referência Professor Hélio Fraga pela doação, amor e ajuda durante minha internação no HUCFF. Em especial ao amigo Rafi ur Rahman, que se ofereceu a passar a noite em claro numa cadeira desconfortável de hospital na véspera de sua qualificação de doutorado.

Ao amigo Sandro Caldas, pelo carinho e disposição constante para ajudar.

A todos os amigos que despenderam tempo enviando mensagens e me visitando no HUCFF e IHBDF. Obrigada pelas palavras de conforto!

Ao meu médico, Dr. João Batista Tajra, pela dedicação, acompanhamento e ajuda constantes nos últimos 2 anos.

As queridas companheiras de hospital, Juju (*in memoriam*), Nazaré (*in memoriam*), Geralda (*in memoriam*), Lionilia e Mônica, pelo companheirismo e suporte emocional.

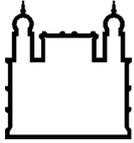
Aos queridos colegas do LADTV, Gentil Vasconcelos, Arthur Alves, Noemi Gardinali, Andreza Soriano e Luciane Amado pela ajuda e apoio durante toda a execução deste projeto.

Aos colegas da Micro Med Vet, Luíza Harada, Bryam Amorim e Amanda Oliveira, pela ajuda na execução deste projeto na Universidade de Brasília.

Por fim, meu muito obrigada a todos que vibraram positivamente pela minha plena recuperação para a finalização desta importante etapa profissional. Deus abençoe cada um de vocês.

“Perante um obstáculo, a linha mais curta entre dois pontos pode ser a curva.”

Bertolt Brecht



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

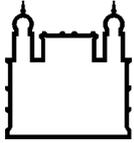
INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA CIRCULAÇÃO DE FLAVIVÍRUS E HEPACIVÍRUS EM SUÍNOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Yara Cavalcante Vieira

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros de grande importância médica e veterinária – *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*. Os flavivírus têm sido responsáveis por sucessivas epidemias de arboviroses no Brasil e podem infectar uma ampla variedade de hospedeiros, entretanto, estudos sobre a circulação destes vírus em suínos domésticos no Brasil são limitados. Da mesma forma, os hepacivírus com mais de uma dezena de espécies descritas em diversos hospedeiros na última década, também vem sendo pouco investigados em suínos domésticos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar, através de métodos moleculares, a circulação de flavivírus e hepacivírus em populações híbridas de suínos domésticos (*Sus scrofa domestica*) provenientes de pequenas criações de subsistência do Distrito Federal e do Sistema Intensivo de Criação de Suínos ao Ar Livre da Universidade de Brasília. Trezentos e vinte oito amostras de soro de suínos domésticos foram analisadas neste estudo, sendo 318 coletadas em 2016 pela Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal e 10 amostras coletadas em 2019 de suínos da Fazenda Água Limpa - Universidade de Brasília. As amostras de soro foram submetidas à extração de ácido ribonucleico (RNA), seguida de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase com iniciadores de grupo para o gênero *Flavivirus* (*One Step* RT-qPCR) e para o gênero *Hepacivirus* (NESTED-RT-PCR). Todas as amostras analisadas neste estudo foram negativas para a presença dos vírus investigados, sugerindo ausência de infecção aguda por flavivírus e hepacivírus nos animais estudados. Mais estudos são necessários, especialmente estudos longitudinais, para uma mais ampla investigação de potenciais ciclos enzooticos silenciosos desses importantes vírus em suínos domésticos brasileiros.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR INVESTIGATION OF FLAVIVIRUS AND HEPACIVIRUS IN DOMESTIC SWINE FROM DISTRITO DEFERAL, BRAZIL

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Yara Cavalcante Vieira

The family *Flaviviridae* is composed of four genera of great medical and veterinary importance - *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus*, and *Pegivirus*. Flaviviruses have been responsible for successive arbovirus epidemics in Brazil and can infect a wide variety of hosts. However, studies on the circulation of flaviviruses in domestic swine in Brazil are limited. In the same way, hepaciviruses with more than a dozen species described in different hosts in the last decade, have also been poorly investigated in domestic swine. Thus, the objective of this study was to investigate, through molecular methods, the circulation of flaviviruses and hepaciviruses in healthy populations of domestic swine (*Sus scrofa domesticus*) from small subsistence farms in the Federal District, West-Central Brazil and the outdoor pig production system from University of Brasilia. A total of 328 serum samples from domestic swine were analyzed in this study, being 318 collected in 2016 by the Secretary of State for Agriculture, Supply and Rural Development of the Distrito Federal, and 10 samples collected in 2019 from Água Limpa Farm – University of Brasilia. Serum samples were submitted to ribonucleic acid (RNA) extraction, followed by reverse transcription and polymerase chain reaction with universal primers for the genus *Flavivirus* (One Step RT-qPCR), and for the genus *Hepacivirus* (NESTED-RT-PCR). All samples analyzed in this study were negative for flaviviruses and hepaciviruses, suggesting the absence of acute infection in the animals sampled. More studies are needed, especially longitudinal studies, for a broader investigation of potential silent enzootic cycles of these important viruses in Brazilian domestic pigs.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A suinocultura no Brasil e Distrito Federal.....	19
1.2 Vírus zoonóticos transmitidos por suínos.....	21
1.3 Família <i>Flaviviridae</i> Gênero <i>Flavivirus</i>	22
1.3.1 Biologia e classificação.....	22
1.3.2 Modo de transmissão dos flavivírus.....	23
1.3.3 Flavivírus em suínos.....	24
1.3.4 Métodos diagnósticos para detecção de flavivírus.....	29
1.3.5 Circulação de flavivírus no Distrito Federal.....	31
1.4 Família <i>Flaviviridae</i> gênero <i>Hepacivirus</i>	34
1.4.1 Biologia e classificação.....	34
1.4.2 Modo de transmissão dos hepacivírus.....	35
1.4.3 Hepacivírus em animais.....	37
1.4.4 Métodos diagnósticos para detecção dos hepacivírus.....	40
1.4.5 Circulação de hepacivírus no Distrito Federal.....	41
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Aspectos éticos.....	47
4.2 População suína estudada e fluxograma de trabalho.....	47
4.3 Extração do RNA viral.....	50
4.4 Detecção do RNA de vírus pertencentes ao gênero <i>Flavivirus</i> por <i>One-Step</i> RT-qPCR.....	50
4.5 Detecção do RNA de vírus pertencentes ao gênero <i>Hepacivirus</i> por <i>Nested</i> RT-PCR.....	51
4.6 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética.....	53

5	RESULTADOS	54
5.1	Animais utilizados no estudo	54
5.2	Pesquisa de flavivírus em suínos domésticos	56
5.3	Pesquisa de hepaticivírus em suínos domésticos	57
6	DISCUSSÃO	59
6.1	Pesquisa de flavivirus	59
6.2	Pesquisa de hepaticivírus.....	63
7	CONCLUSÕES	66
8	PERSPECTIVAS	67
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
10	APÊNDICES E/OU ANEXOS	85
10.1	Anexo 1	85
10.2	Anexo 2	86
10.3	Anexo 3	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica dos criatórios de subsistência da população de suínos estudada.....	49
Figura 2. Fluxograma do experimento.....	50
Figura 3. Representação gráfica da classificação e distribuição dos animais de acordo com a idade.....	54
Figura 4. Representação gráfica da distribuição dos suínos por sexo.....	55
Figura 5. Suíno do SISCAL-UnB (macho reprodutor)	55
Figura 6. Suíno do SISCAL-UnB (fêmea).....	56
Figura 7. Gráfico da curva de dissociação da <i>One Step</i> RT-qPCR para detecção de flavivírus demonstrando o controle positivo e amostras negativas.	57
Figura 8. Gel de agarose a 1,5%. M - Marcador de peso molecular de 100 pb; EHCV - Hepacivírus equino; HCV - Vírus da Hepatite C.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores degenerados para amplificação de segmento do gene NS5 de flavivírus.....	51
Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores degenerados para amplificação de segmento do gene NS3 de hepacivírus.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos prováveis de Dengue no Distrito Federal de 2016 a 2020, segundo local de residência e ano de notificação	33
Tabela 2. Número de casos confirmados de hepatite C no Distrito Federal de 2008 a 2018, segundo local de residência e ano de notificação	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µM	Micromolar
ADE	Facilitação dependente de anticorpos (<i>Antibody Dependent Enhancement</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOVHV	Hepacivírus bovino
BSQV	Vírus Bussuquara
cDNA	DNA complementar
CHCV	Hepacivírus canino
CPCV	Vírus Cacipacoré
DENV	Vírus Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHCV	Hepacivírus equino
EIAV	Vírus da anemia infecciosa equine (<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAL	Fazenda Água Limpa
FC	Fixação do complemento
GBV-B	GB vírus B
GHV	Hepacivírus Guereza
HCV	Vírus da hepatite C
HeV	Vírus Hendra
HEV	Vírus da hepatite E
HI	Inibição da hemaglutinação
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGUV	Vírus Iguape
ILHV	Vírus Ilhéus
ISF	Flavivírus específicos de insetos (<i>Insect-specific Flavivirus</i>)
JEV	Vírus da encefalite japonesa
JgV	Vírus Jogalong
Kb	Quilobase

Kg	Quilograma
Km	Quilômetro
LiPA	Ensaio de sondas em linha (<i>Line Probe Assay</i>)
LIPS	Sistema de imunoprecipitação da luciferase (<i>Luciferase Immunoprecipitation System</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBFV	Flavivírus transmitidos por mosquitos (<i>Mosquito-borne Flavivirus</i>)
MVEV	Vírus da encefalite de Murray Valley
NHUV	Vírus Nhumirim
NJLV	Vírus relacionado ao vírus Naranja
NKV	Flavivírus sem vetores conhecidos (<i>No-known Vector</i>)
Nm	Nanômetro
NoV	Norovírus
NT	Soroneutralização
NTAV	Vírus Ntaya
OIE	Escritório Internacional de Epizootias - Organização Mundial da Saúde Animal (<i>Office International des Epizooties</i>)
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open Reading frame</i>)
PEDV	Diarreia epidêmica dos suínos
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
PRRS	Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
PrV	Vírus da Pseudorraiva
PSA	Peste suína africana
PSC	Peste suína clássica
qPCR	Reação em cadeia da enzima polimerização em tempo real
R\$	Reais
RHV	Hepacivírus de roedores (<i>Rodent Hepacivirus</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Vírus Rocio
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da enzima polimerase
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa
SEAGRI-DF	Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal

SES-DF	Secretaria de Saúde do Distrito Federal
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISCAL	Sistema Intensivo de Criação de Suínos ao Ar Livre
SLEV	Vírus da encefalite de saint louis
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapato
TBFV	Flavivírus transmitidos por carrapatos (<i>Tick-borne Flavivirus</i>)
TGEV	Gastroenterite transmissível
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
UnB	Universidade de Brasília
VPSC	Vírus da peste suína clássica
VSV	Vírus da estomatite vesicular
WLSV	Vírus Wenling Shark
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

1 INTRODUÇÃO

1.1 A suinocultura no Brasil e Distrito Federal

O Brasil é o quarto maior produtor de suínos do mundo, responsável por cerca de 3,89% da produção mundial e com exportação de cerca de 861 mil toneladas de proteína suína produzidas, ou seja, cerca de 21% da produção brasileira tem como destino o consumo no exterior (1).

O rebanho suíno brasileiro é estimado em cerca de 41,4 milhões de animais, sendo que mais de 2 milhões são matrizes suínas alojadas. Em 2019, 3.975 mil toneladas de carne suína foram obtidas do abate de suínos (2). Apesar da recente queda da exportação em relação a anos anteriores, a produção nacional de suínos aumentou nos últimos dois anos (2018-2019). A carne suína é hoje a terceira mais consumida pelos brasileiros, anualmente cada brasileiro consome cerca de 16kg de proteína suína em sua dieta alimentar, cujo consumo fica atrás somente da carne bovina e de frango, ambos com 42kg de consumo por habitante/ano (1).

Dados mais recentes obtidos sobre a movimentação financeira do setor suinícola nacional, apontam que em 2015 mais de R\$ 149 bilhões foram movimentados pelo setor, fazendo com que o produto interno bruto da suinocultura brasileira somasse R\$ 62,576 bilhões neste mesmo ano. Além disso, estima-se que a suinocultura é responsável por empregar diretamente 126 mil pessoas, gerando ainda cerca de 923.394 empregos indiretos (3).

A importância da cadeia produtiva de suínos para o desenvolvimento econômico brasileiro é substancial, conforme os dados apresentados, este é um setor significativo para a pecuária nacional. A manutenção da sanidade dos rebanhos é um desafio para a suinocultura. O país é atualmente livre de importantes enfermidades que afetam a produção e a comercialização de carne suína mundialmente, como a triquinelose, a síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), a diarreia epidêmica dos suínos (PEDV), a gastroenterite transmissível (TGEV), a encefalomielite causada pelo vírus Nipah e a peste suína africana (PSA) (4). Apesar desse oportuno status sanitário desfrutado pela suinocultura brasileira, há grande preocupação da categoria com a entrada de doenças exóticas no país, que poderiam causar prejuízos nas cifras resultantes da produção e exportação do setor.

Diversos tipos de sistemas de produção de suínos são encontrados no Brasil, estes sistemas podem ser resumidamente divididos em intensivos e extensivos. No sistema intensivo os animais podem ser criados de forma tradicional, confinada ou ao ar livre, nesse tipo de sistema há maior tecnologia empregada (5). Já os sistemas extensivos possuem baixo uso de tecnologia e características de subsistência. Propriedades consideradas de subsistência, também são denominadas pelos serviços oficiais como criatórios de suínos (6), e são caracterizadas pela criação dos animais para consumo próprio e sem uso de tecnologia, ou seja, sem caracterização industrial, auxílio técnico e normalmente com uso exclusivo de mão de obra familiar (7). Nesse tipo de criação a maioria das doenças diagnosticadas nos suínos estão associadas as condições precárias de higiene, ausência de manejo técnico e falta de tecnologia (8). Além disso, os criatórios de subsistência de suínos são altamente vulneráveis a entrada de patógenos (9), como o vírus da Peste Suína Clássica (VPSC).

O Distrito Federal (DF) representa, atualmente, 0,33% da produção de suínos no país, com rebanho efetivo de cerca de 190.159 cabeças. O Núcleo Rural Rio Preto em Planaltina possui o maior rebanho do Distrito Federal, com 129.988 animais e 608 propriedades com criação de suínos (1)(10). Atualmente há 2.150 propriedades rurais com criação de suínos cadastradas na Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal (SEAGRI-DF), sendo a maioria localizadas nas Regiões Administrativas de Sobradinho, Planaltina, Brazlândia e Gama (10). Cerca de 8,5% das propriedades com criação de suínos cadastradas na SEAGRI-DF, são consideradas sob maior risco para instalação de VPSC (10).

Os critérios que definem um criatório de suíno, ou seja, uma criação de subsistência familiar vulnerável ao VPSC e são utilizados para fins de seleção dessas propriedades na amostragem do inquérito nacional de Peste Suína Clássica (PSC), incluem: fornecimento de resíduos alimentares (lavagem) aos suídeos; proximidade a lixões; proximidade a graxarias; suídeos criados extensivamente; proximidade a áreas de proteção ambiental; proximidade a reservas naturais ou parques com fauna de suídeos silvestres; localização em áreas periurbanas ou próxima a comunidades carentes, dentre outros (10)(6).

1.2 Vírus zoonóticos transmitidos por suínos

Os suínos são anatomicamente e fisiologicamente semelhantes aos humanos. Esses animais compartilham com o homem características como dentição, estrutura ocular e acuidade visual, além de elementos de morfologia e fisiologia renal, cardiovascular, digestiva e da pele (11). O compartilhamento de características biológicas entre suínos e humanos pode permitir que ocasionalmente alguns patógenos atravessem as barreiras naturais entre essas duas espécies (12). Essa superação, por alguns patógenos, da barreira entre os suínos e o homem é possível graças a existência de fatores celulares, principalmente receptores celulares para vírus, que permitem a ligação e multiplicação de agentes infecciosos nos dois hospedeiros. Os suínos são reconhecidos, por exemplo, por possuírem nas células de seu sistema respiratório receptores para vírus do gênero Influenza de origem suína, aviária e humana (13).

As zoonoses, doenças infecciosas de animais causadas por patógenos que eventualmente infectam o homem, são importantes afecções em que os animais exercem papel essencial para sua manutenção na natureza, ao passo que o homem configura um hospedeiro acidental das mesmas (14). Os suínos participam no ciclo de transmissão de importantes doenças zoonóticas. A infecção do homem nesses ciclos de transmissão pode se dar tanto pela ingestão de alimentos de origem suína, como também através do contato direto desses animais com o homem, e através de espécies intermediárias, como os vetores artrópodes (15)(16).

Importantes doenças de etiologia viral e zoonóticas estão distribuídas pelo mundo, as zoonoses virais associadas a suínos podem ser agrupadas da seguinte forma: 1) zoonoses que têm distribuição mundial, onde destacam-se os vírus da influenza A e o vírus da hepatite E (HEV); 2) zoonoses emergentes que ocorrem em localizações geográficas específicas, como as causadas pelos vírus Ebola-Reston, Nipah e Menangle; 3) zoonoses que ocorrem em regiões específicas mas que são endêmicas nestas regiões, como as causadas pelos vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus da estomatite vesicular (VSV); 4) zoonoses associadas a suínos que ocorrem em todo o mundo, mas de forma esporádica, como o vírus da influenza C; e, por fim, 5) as zoonoses cujo potencial zoonótico é considerado limitado ou que necessitam de mais estudos para elucidação do papel dos suínos em seus ciclos de transmissão, como as causadas pelos rotavírus, norovírus (NoV), hendra (HeV), henipa-like, e o vírus da pseudorraiva (PrV) (12).

Dentre os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, o JEV é notadamente o principal vírus zoonótico com participação dos suínos na sua transmissão. Os suínos domésticos assim como algumas espécies de aves são os principais hospedeiros amplificadores desse agente viral (17). Já dentre os vírus que compõem o gênero *Hepacivirus*, ainda não foi descrita nenhuma espécie que infecte suínos até o momento.

1.3 Família *Flaviviridae* Gênero *Flavivirus*

1.3.1 Biologia e classificação

A família *Flaviviridae* compreende uma das famílias virais de importância para a saúde humana e animal, cujos membros notadamente possuem a capacidade de causar doenças em diferentes espécies (18). O gênero *Flavivirus* é um dos quatro gêneros que compreendem a família *Flaviviridae*, a qual inclui também os gêneros *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. Os flavivírus compreendem mais de 70 espécies de vírus, dentre os quais os arbovírus aparecem em maior número (19).

Os arbovírus (do inglês *arthropod-borne virus*) são um grupo ecológico de vírus de animais vertebrados transmitidos por artrópodes (20). A maioria dos arbovírus são zoonóticos, ou seja, podem ser transmitidos para humanos a partir de animais vertebrados infectados. No caso específico dos arbovírus, a transmissão ocorre através do repasto sanguíneo de vetores biológicos, em geral artrópodes que se tornaram infectados após repasto sanguíneo em animais virêmicos (21)(22).

Os flavivírus compartilham complexas interações antigênicas e são agrupados em complexos e subcomplexos antigênicos que não são entidades taxonômicas (23)(24). Dentre os complexos antigênicos estão o complexo YFV, o complexo JEV, o complexo TBEV, o complexo DENV e o complexo NTAV (19). Os arbovírus, ainda, são didaticamente agrupados também por suas associações com vetores, sendo dessa forma reunidos como TBFV (do inglês *Tick-borne flavivirus* – Flavivírus transmitidos por carrapatos), MBFV (do inglês *Mosquito-borne flavivirus* – Flavivírus transmitidos por mosquitos), NKV (do inglês *No-known vector* – Flavivírus sem vetores conhecidos) e ISF (do inglês *Insect-specific flavivirus* – Flavivírus específicos de insetos) (25)(26).

Os flavivírus transmitidos por mosquitos estão entre os mais importantes exemplos de arbovírus causadores de doenças emergentes e re-emergentes de importância para a saúde pública (27). No Brasil, os arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* são responsáveis por importantes doenças como a febre amarela, a dengue e a zika, esta última frequentemente associada a complicações neurológicas como síndrome congênita e de Guillain Barré (28)(29). Atualmente, catorze flavivírus capazes de infectar vertebrados foram descritos no Brasil, são eles: Bussuquara (BSQV), Cacipacoré (CPCV), Dengue 1-4 (DENV 1-4), Febre Amarela (YFV), Iguape (IGUV), Ilhéus (ILHV), vírus relacionado ao vírus Naranjal (NJLV), Rocio (ROCV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus do Oeste do Nilo (WNV) e Zika (ZIKV) (30)(31)(32).

O gênero *Flavivirus* é composto por vírus envelopados, esféricos e com diâmetros que variam entre 40 e 60 nm. O genoma dos flavivírus é constituído por RNA não-segmentado de fita simples com polaridade positiva e com aproximadamente 9.2-11 quilobases (kb). Os flavivírus possuem uma ORF (do inglês *Open Reading Frame*, fase de leitura aberta) única e flanqueada por duas regiões não-codificantes – 5' e 3'. Na tradução do genoma dos flavivírus ocorre a síntese de uma poliproteína que é clivada *co* e pós-tradução em 10 proteínas, sendo 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e 3 proteínas estruturais (C, prM e E, que codificam o capsídeo, a membrana e o envelope viral, respectivamente) (19)(24).

1.3.2 Modo de transmissão dos flavivírus

O gênero *Flavivirus* é composto majoritariamente por arbovírus (33). Dessa forma, a via epidemiologicamente mais significativa de transmissão desses vírus aos hospedeiros vertebrados é através do repasto sanguíneo de vetores biológicos artrópodes infectados. Os variados ciclos de transmissão destes arbovírus envolvem diferentes espécies de hospedeiros invertebrados e vertebrados e ocorrem não só de ambientes silvestres, mas também urbanos (34).

No ciclo de transmissão silvestre ou enzoótico, determinadas espécies de vertebrados e invertebrados são capazes de amplificar e transmitir os vírus quando infectadas, participando efetivamente do ciclo de transmissão desses agentes na natureza (35)(36).

Dentre os grupos de vertebrados envolvidos nestes ciclos de transmissão destacam-se as aves (principalmente os pássaros) e os mamíferos (sobretudo os roedores e os primatas não humanos) (35)(36). O homem quando exposto ao ciclo de transmissão enzoótica, normalmente participa como um hospedeiro terminal e por isso não está envolvido em ciclos de manutenção desses arbovírus na natureza (20).

Já em ciclos urbanos epidêmicos, o homem participa como o principal hospedeiro amplificador. Nestes cenários, pessoas infectadas tornam-se fontes de infecção para vetores artrópodes que habitam ambientes peridomiciliares, e por isso participam de ciclos de manutenção. A participação do homem nesses ciclos de transmissão em ambiente urbano favorece a propagação viral levando a importantes epidemias (34).

Os flavivírus também podem ser transmitidos entre vertebrados sem o envolvimento de vetores. Entretanto, a relevância epidemiológica dessas outras formas de transmissão ainda é pouco esclarecida. Entre as diferentes formas de transmissão estão a ingestão pela predação, a transmissão por contato, por relação sexual, em transfusões de sangue e hemoderivados e ainda transmissão intrauterina e pela amamentação (37)(38)(39)(40).

A transmissão dos flavivírus pode ocorrer, ainda, entre os próprios vetores artrópodes. Essa transmissão, que pode ser vertical transovariana ou venérea, é considerada uma importante forma de manutenção destes arbovírus na natureza (41).

1.3.3 Flavivírus em suínos

Alguns flavivírus estão associados à infecção natural em suínos, destacando-se o JEV, o WNV e o MVEV. As doenças febris causadas pelos dois primeiros estão listadas na Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) devido ao reconhecimento de suas tendências de disseminação e potencial zoonótico (42). Outros flavivírus como o DENV (43) e o ZIKV (44) já demonstraram capacidade de infecção em suínos experimentalmente infectados.

Pode-se dizer que o JEV é o mais importante flavivírus patógeno de suínos (42). A identificação do JEV como agente etiológico de encefalites que ocorriam sazonalmente no Japão deu-se na primeira metade da década de 1930 por Hayashi

e colaboradores (45). Em ciclo silvestre, os principais hospedeiros amplificadores do JEV são as aves, mais de 90 espécies de aves já foram identificadas como capazes de servir de fonte de infecção para mosquitos, particularmente aves aquáticas (46). O reconhecimento de suínos como hospedeiros amplificadores do JEV em um ciclo doméstico ocorreu após estudo ecológico realizado entre os anos de 1956-1957 no Japão e publicado no final da década de 1950 por Scherer e colaboradores (47).

O JEV encontra-se entre os principais agentes causadores de encefalite viral em humanos na Ásia, acometendo especialmente crianças. Os seres humanos assim como os equinos são hospedeiros terminais do JEV, ou seja, não servem de fonte de infecção para os mosquitos vetores. Os suínos, por sua vez, assumem papel no ciclo de manutenção deste vírus, principalmente em regiões rurais no continente asiático, atuando como hospedeiros amplificadores (48)(49)(42).

Regiões rurais asiáticas, onde há a coexistência de plantações de arroz com alta densidade de vetores e criatórios de suínos, são particularmente afetadas pela encefalite japonesa. Esses territórios apresentam importantes componentes para o estabelecimento do ciclo de transmissão do JEV, incluindo populações do principal mosquito vetor, o *Culex tritaeniorhynchus*, que utilizam como criadouros plantações de arroz irrigadas por inundação na Ásia, e grandes populações de suíno doméstico, que por apresentarem viremia alta e prolongada participam como fonte de infecção de JEV para os vetores durante o repasto sanguíneo (47)(50)(46).

Os suínos acometidos pelo JEV comumente apresentam infecção subclínica, fêmeas adultas infectadas nos dois primeiros terços da gestação podem desenvolver problemas reprodutivos que geralmente acarretam abortos ou o nascimento de leitegadas problemáticas, com animais fracos, natimortos ou mumificados. Os machos podem apresentar infertilidade transitória, e leitões, ocasionalmente, apresentam quadro neurológico e definhamento (42). A transmissão não vetorial e horizontal entre suínos também é sugerida. Estudos recentes demonstraram a persistência do vírus em tonsilas por mais de 10 dias e em secreções oronasais dos animais acometidos até 8 dias após a infecção (51).

No Brasil, ainda não há registro da circulação do JEV e casos de encefalite japonesa nunca foram reportados no país. Todavia, a doença é de notificação obrigatória no país, e qualquer caso suspeito ou diagnóstico laboratorial da doença deve ser imediatamente notificado (52). No mundo, estima-se que o JEV infecte aproximadamente 68 mil pessoas a cada ano. Entretanto, menos de 1% dos infectados desenvolvem quadro clínico. Dentre os casos clínicos, 20-30% dos

acometidos vão à óbito e até 50% dos sobreviventes permanecem com sequelas neurológicas importantes (48).

Outro importante flavivírus que pode infectar suínos é o WNV, que foi isolado pela primeira vez em 1937 na província de West Nile, uma província situada a oeste do Rio Nilo Branco em Uganda (53). Até início da década de 1990, as infecções pelo WNV eram associadas somente a casos clínicos esporádicos e surtos ocasionais de uma doença febril leve em humanos e principalmente equinos, conhecida como Febre do Oeste do Nilo.

Em 1994, o WNV causou a primeira epidemia de doença neurológica com alta taxa de mortalidade em humanos, principalmente entre crianças, na Algéria (54)(55). Seguida, em 1996, pela primeira grande epidemia no continente europeu, que ocorreu em 14 distritos do Vale do Danúbio e Bucareste, na Romênia. Cerca de 89% dos pacientes diagnosticados sorologicamente durante a epidemia romena apresentavam infecção aguda pelo WNV, com acometimento do sistema nervoso central (56).

Em 1999 ocorreu a primeira detecção do WNV nas Américas. A introdução do vírus nos Estados Unidos da América (EUA) foi responsável por um importante surto entre os meses de agosto e setembro de 1999 na cidade de Nova Iorque. Um fato interessante a ser ressaltado é que concomitante às notificações de encefalite em humanos nesse período, foi relatada a morte de um número importante de aves na cidade, especialmente corvos (57)(58).

De fato, espécies de passeriformes estão entre as mais susceptíveis à infecção pelo WNV. Espécies como o corvo americano tiveram redução populacional significativa em alguns estados dos EUA (59)(60)(61). Entretanto, o ciclo enzoótico de WNV nos EUA envolve espécies de passeriformes mais resistentes, como os pardais (*Passer domesticus*) que mantêm o ciclo de transmissão como hospedeiros amplificadores primários, e mosquitos ornitofílicos como espécies de *Culex*, como principais vetores (62).

Além das aves, epizootias por WNV também vêm sendo reportadas, principalmente em equinos. Desde a primeira detecção em 1999, mais de 20.000 casos clínicos de WNV em equinos foram reportados (63). Sendo que um em cada três animais infectados evoluem para o óbito ou sofrem eutanásia (64). Outras espécies de vertebrados selvagens e domésticos também podem se infectar e também adoecer pelo WNV. Contudo, assim como equinos e seres humanos, normalmente esses animais apresentam viremia baixa e curta por isso participam

apenas como hospedeiros terminais (65). Algumas exceções vêm sendo descritas na literatura, principalmente em estudos experimentais, por exemplo, já foi observado que em gatos domésticos experimentalmente infectados pelo WNV, apresentando picos de viremia, poderiam infectar vetores mesmo com baixa eficiência. Também infectado experimentalmente, o crocodiliano (*Alligator mississippiensis*) sustentou viremia considerada infecciosa para mosquitos *Culex quinquefasciatus* (37)(38).

Evidências sorológicas da infecção do WNV em suínos domésticos têm sido reportadas em diversos países, sugerindo que suínos também estão expostos ao WNV. Entretanto, a patogenia do WNV nesses animais permanece desconhecida (42).

Em infecções experimentais com o WNV, os suínos domésticos não apresentaram quadro clínico. A viremia nesses animais variou desde indetectável à moderada, dependendo da idade dos animais e do isolado viral utilizado para infecção. Suínos recém desmamados, por exemplo, apresentaram viremia com título viral suficiente para infectar mosquitos *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*, porém, por período muito curto, de algumas horas. Tais achados não sustentam a hipótese de que os suínos domésticos tenham um papel significativo como hospedeiros amplificadores do WNV na natureza (66)(67).

A infecção pelo WNV, no entanto, pode interferir na infecção posterior pelo JEV e vice-versa. Em um estudo experimental, a infecção primária pelo WNV seguida de infecção secundária pelo JEV levou a uma redução de carga viral de JEV quando comparado com animais controle. A infecção sequencial de WNV e JEV também influencia na resposta imune humoral. Animais previamente infectados por WNV tiveram anticorpos anti-WNV aumentados após infecção secundária por JEV em um fenômeno conhecido como a teoria do pecado original (68).

No Brasil, evidências sorológicas da infecção pelo WNV vêm sendo relatadas em diferentes regiões ao longo da última década. Pauvolid-Corrêa reportou em 2011 (69) a presença de anticorpos neutralizantes para o WNV em equinos do Pantanal. Em 2012, Melandri e colaboradores (70) também reportaram evidências sorológicas da circulação de WNV em aves e equinos do Pantanal. Já em 2014, através da expansão do estudo inicial de Pauvolid-Corrêa, foram encontradas fortes evidências da circulação generalizada do WNV nos equinos desta região (71). Neste período também foram encontradas evidências da emergência e circulação de WNV em equinos de outras regiões brasileiras, como a sudeste e nordeste (72).

O primeiro caso humano de encefalite por WNV no Brasil foi reportado em dezembro de 2014, em um paciente trabalhador rural no estado do Piauí (73)(74). Na ocasião não foi possível o isolamento viral, ocorrendo o primeiro isolamento do vírus no Brasil em 2018, no município de São Mateus no Espírito Santo, a partir de um cavalo com desordem neurológica (75).

A encefalite de Murray Valley é a principal causa de doença neurológica por arbovírus na Austrália. O MVEV, juntamente com o JEV e o WNV, compõe o já citado complexo antigênico da encefalite japonesa (76). O MVEV foi isolado pela primeira vez no ano de 1951 em um caso fatal de encefalite ocorrido próximo ao sistema fluvial Murray-Darling no sudeste da Austrália (77). No entanto, casos graves de encefalite já haviam sido reportados no país entre 1917 e 1925, não tendo sua etiologia identificada naquele período. Em 1974 um grande surto de encefalite viral foi atribuído à infecção pelo MVEV, a maioria dos casos observados ocorreu, novamente, no sudeste australiano (42).

Acredita-se que o MVEV seja mantido em ciclos enzoóticos no noroeste da Austrália, envolvendo aves aquáticas, principalmente garças, e o mosquito vetor *Culex annulirostris*. Desde o surto de 1974, a maioria dos casos humanos de encefalite de Murray-Valley foram notificados justamente nessa região do país. Casos esporádicos observados em outras regiões são correlacionados à atividade migratória de aves aquáticas infectadas, em regiões afetadas por inundações (76).

O MVEV causa encefalite fatal em equinos e está associado a morte de patos jovens em criatórios australianos. A maioria das infecções em seres humanos são assintomáticas ou cursam com doença febril leve. Os casos de encefalite associados ao MVEV possuem taxas de mortalidade semelhantes à encefalite causada pelo JEV. Embora já tenha sido demonstrada experimentalmente a susceptibilidade de suínos domésticos ao MVEV, a infecção clínica permanece desconhecida (42).

As primeiras evidências sorológicas da exposição de suínos ao MVEV foram encontradas em porcos asselvajados que apresentaram alta prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) para o MVEV na Austrália (78). Já os suínos domésticos infectados experimentalmente apresentaram viremia baixa a moderada (79). Porém, considerando-se a alta densidade de porcos asselvajados no norte e leste da Austrália, há a proposição de que caso um pequeno grupo desses animais apresente viremia suficiente para infectar mosquitos vetores, o impacto

desses animais na amplificação e manutenção do MVEV na natureza possa ser significativa (42).

Outros flavivírus como o DENV (43) e o ZIKV (80) já demonstraram infectividade em suínos infectados experimentalmente. Os suínos domésticos foram satisfatoriamente susceptíveis à infecção pelo ZIKV, com detecção de anticorpos anti-ZIKV a partir de 5 dias após a inoculação subcutânea e intradermal do vírus (44). O DENV inoculado em miniporcões Yucatan resultou em baixos níveis de viremia e, curiosamente, quando animais que haviam sido infectados por via subcutânea foram subseqüentemente desafiados com o mesmo sorotipo previamente utilizado, desenvolveram rash cutâneo e edema dérmico com a presença de complexos de anticorpos nos soros desse animais, sugerindo a possibilidade de um fenômeno de *ADE-like* (do inglês *antibody dependent enhancement* – facilitação dependente de anticorpos) (43).

1.3.4 Métodos diagnósticos para detecção de flavivírus

O diagnóstico laboratorial dos flavivírus é realizado através de técnicas de detecção direta e indireta, que incluem principalmente o isolamento do agente viral em sistemas de cultivo celular, a detecção do genoma viral e as provas sorológicas (81).

As provas sorológicas configuram o método indireto mais aplicado no diagnóstico de rotina das infecções por flavivírus. A pesquisa de anticorpos, apesar das limitações principalmente devido a reações cruzadas entre os diferentes flavivírus, é amplamente utilizada para estudos de flavivírus enzoóticos em vertebrados, em virtude da limitada utilização de ferramentas moleculares em hospedeiros terminais que apresentam viremia baixa e de curta duração, reduzindo a janela de oportunidade para o diagnóstico molecular (82). Tais provas incluem: inibição da hemaglutinação (HI); fixação de complemento (FC); imunofluorescências direta e indireta (IFD e IFI); ensaios imunoenzimáticos (ELISA); soroneutralização (NT); e o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) (81)(83).

O PRNT é considerado o mais específico método sorológico atualmente disponível e padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial diferencial das infecções por flavivírus. O princípio do teste é a interação entre o vírus infectante e anticorpos neutralizantes do hospedeiro infectado. Anticorpos neutralizantes específicos neutralizam o vírus infeccioso limitando sua capacidade de infecção e de causar

efeito citopático na cultura celular utilizada. A maior problemática encontrada neste teste é sua característica laboriosa de execução, que inclui a necessidade de pessoal treinado e uso de instalação de nível de biossegurança 2 e 3, em virtude da manipulação de culturas celulares e vírus infectantes (83). Dessa forma, embora o PRNT seja considerado o padrão-ouro para o diagnóstico sorológico dos flavivírus, a detecção de imunoglobulinas IgM e IgG específicas por ELISA é o método de diagnóstico sorológico mais amplamente utilizado, devido a seu baixo custo e rapidez para obtenção de resultados, apesar da menor especificidade (84).

As reações cruzadas entre os diferentes flavivírus ocorrem devido ao compartilhamento de epítomos comuns nas proteínas do envelope (E) dos vírus pertencentes a este gênero, o que compromete a acurácia do diagnóstico sorológico diferencial das infecções, principalmente em áreas onde circulam diversas espécies de flavivírus (84).

O isolamento viral é geralmente realizado em cultura de células susceptíveis, utilizando-se amostra de soro, líquido cefalorraquidiano ou amostras de tecidos do indivíduo acometido pela infecção. A replicação em cultura celular depende de quantidade suficiente de amostra biológica sendo que nem sempre o efeito citopático será evidente na cultura celular. Para fins de diagnóstico, o isolamento em cultura de células é realizado em combinação com a técnica de imunofluorescência ou RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da enzima polimerase) para confirmar a presença e/ou identificar o isolado. No entanto, o isolamento viral pode demorar e exigir mais de uma semana para ser realizado, dependendo também da quantidade inicial de vírus na amostra analisada (85)(64)(86).

A detecção do genoma de RNA dos flavivírus juntamente com o isolamento viral configuram importantes métodos diretos de diagnóstico. Porém, a RT-PCR oferece maior sensibilidade e rapidez de execução quando comparada com o isolamento viral em cultura de células, o DNA amplificado proporciona, ainda, a opção subsequente de sequenciamento que fornece informações acerca da identificação e cepa do vírus, eliminando dessa forma a ambiguidade acarretada pelas reações cruzadas frequentemente observadas na sorologia (85).

A identificação molecular dos flavivírus assim como o seu isolamento viral, no entanto, dependem estritamente da presença do material genético ou da partícula viral viável na amostra biológica analisada, respectivamente. O WNV, por exemplo, é um flavivírus cujo pico de viremia nos hospedeiros infectados ocorre antes do

aparecimento do quadro clínico. Dessa forma, amostras de sangue de casos clínicos humanos de febre do oeste do Nilo, coletadas após o surgimento de sinais e sintomas, podem testar negativas para a presença do WNV, sendo necessário nesses casos o uso de testes sorológicos para confirmação da doença (64). A baixa viremia encontrada nos hospedeiros terminais do WNV, assim como de outros flavivírus, também dificulta o diagnóstico molecular da doença (86).

Através do uso de ferramentas moleculares é possível, ainda, a detecção e identificação universal de flavivírus, ou seja, a detecção simultânea de diferentes flavivírus. Moureau e colaboradores (2007) propuseram um protocolo de RT-qPCR, capaz de amplificar mais de 51 espécies de flavivírus, tal protocolo é baseado em um sistema de detecção em que um corante intercalante de DNA dupla-fita, denominado SYBR green, emite fluorescência de forma cumulativa conforme aumenta-se a quantidade de produto de PCR gerado na reação. O SYBR green apresenta menor especificidade quando comparado com outros sistemas que utilizam sonda, como o sistema TaqMan, entretanto, o mesmo apresenta alta sensibilidade, devido a capacidade do fluoróforo de se ligar a qualquer DNA dupla-fita (87). Dessa forma, reações de qPCR que utilizam o sistema SYBR green têm características interessantes para triagem, devido à alta sensibilidade que apresentam.

1.3.5 Circulação de flavivírus no Distrito Federal

Localizado no centro-oeste brasileiro, o Distrito Federal com uma população estimada em 3 milhões de habitantes (88) possui 5.760,783 km² e é constituído por 33 regiões administrativas (Águas Claras, Arniqueira, Brazlândia, Candangolândia, Ceilândia, Cruzeiro, Fercal, Gama, Guará, Itapõa, Jardim Botânico, Lago Norte, Lago Sul, Núcleo Bandeirante, Paranoá, Park Way, Planaltina, Plano Piloto, Recanto das Emas, Riacho Fundo I, Riacho Fundo II, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, SCIA/Estrutural, SAI, Sobradinho, Sobradinho II, Sol Nascente e Pôr do Sol, Sudoeste/Octogonal, Taguatinga, Varjão, Vicente Pires) (89). O número atual de estabelecimentos agropecuários que declaram realizar a criação de suínos na região é de 2.150 (10). Embora existam evidências da circulação de pelo menos 14 flavivírus em vertebrados no Brasil, até o momento apenas seis vem sendo reportados no Distrito Federal, incluindo os quatro sorotipos de DENV 1-4, ZIKV e

YFV os quais infectam seres humanos, com exceção do YFV que também infecta primatas não-humanos da região (90).

Os quatro sorotipos do DENV são responsáveis por importantes epidemias na região. De 2016 até 2019 foram identificados 67.639 casos prováveis de dengue nas regiões administrativas que compreendem o Distrito Federal (91)(Tabela 1).

Tabela 1. Número de casos prováveis de dengue no Distrito Federal de 2016 a 2020, segundo local de residência e ano de notificação

Superintendência	2016	2017	2018	2019	Total
CENTRAL	1.015	97	60	3.540	4.712
Asa Norte	249	30	20	853	1.152
Asa Sul	221	31	6	805	1.063
Cruzeiro	59	6	8	278	351
Lago Norte	247	7	12	422	688
Lago Sul	138	16	9	300	463
Sudoeste/Octogonal	60	3	2	220	285
Varjão do Torto	41	4	3	662	710
CENTRO-SUL	1.795	452	122	4.851	7.220
Candangolândia	181	11	9	365	566
Guará	531	139	39	1.828	2.537
Núcleo Bandeirante	203	12	7	591	813
Park Way	79	10	3	280	372
Riacho Fundo I	235	55	21	834	1.145
Riacho Fundo II	179	68	20	384	651
SCIA (Estrutural)	373	156	23	563	1.115
SIA	14	1	1	6	22
LESTE	2.952	551	575	8.742	12.460
Itapõa	634	115	116	2.439	3.304
Jardim Botânico	95	9	6	227	337
Paranoá	472	127	154	2.947	3.700
São Sebastião	1.751	300	299	3.129	5.479
NORTE	2.306	810	524	10.513	14.153
Fercal	80	27	7	519	633
Planaltina	1.430	553	426	5.667	8.076
Sobradinho	438	119	52	1.781	2.390
Sobradinho II	358	111	39	2.546	3.054
OESTE	3.896	623	171	5.473	10.163
Brazlândia	1.946	93	48	1.310	3.397
Ceilândia	1.950	530	123	4.163	6.766
SUDOESTE	4.165	818	554	8.076	13.613
Águas Claras	272	59	31	862	1.224
Recanto das Emas	816	144	110	1.995	3.065
Samambaia	1.359	300	252	2.547	4.458
Taguatinga	1.362	277	127	1.951	3.727
Vicente Pires	356	38	34	721	1.149
SUL	1.518	596	88	3.116	5.318
Gama	509	315	46	910	1.780
Santa Maria	460	275	33	885	1.653
Em branco	549	6	9	1.321	1.885
TOTAL	17.647	3.947	2.094	44.311	67.639

Fonte: SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação (92).

O ZIKV foi registrado pela primeira vez no Distrito Federal em julho de 2015, ano em que foram identificados 13 casos suspeitos de doença aguda pelo vírus (93). Entre 2017 e 2019 foram registrados 466 casos de febre pelo ZIKV no Distrito Federal, e três casos de síndrome congênita associada ao ZIKV em crianças cujas mães foram infectadas durante o período gestacional (90).

Já o YFV reemergiu no Distrito Federal nos últimos anos, e é considerado endêmico no centro-oeste brasileiro. A vacina contra febre amarela faz parte do protocolo vacinal obrigatório da população local (94). Em 2017, foram confirmados três casos de febre amarela no DF, sendo apenas um autóctone, o paciente residente da região administrativa do Sudoeste foi internado em novembro e veio a óbito em dezembro do mesmo ano (95). Em 2018, dois casos foram reportados e o único caso autóctone ocorreu em janeiro no Setor Habitacional Torto, localizado na região administrativa Plano Piloto, o qual evoluiu para a cura (96).

Não se tem até o momento descrição de flavivírus em suínos domésticos brasileiros. Há, no entanto, relatos de morte de suínos domésticos durante a epidemia do flavivírus Rocio no estado de São Paulo na década de 1970. Esse fato foi observado e relatado pela população local no período do surto de encefalite, mas não houveram investigações detalhadas do envolvimento desses animais durante a circulação do vírus na região (97).

1.4 Família *Flaviviridae* gênero *Hepacivirus*

1.4.1 Biologia e classificação

O gênero *Hepacivirus* é um dos quatro gêneros que compreendem a Família *Flaviviridae*, e é um gênero que compreende um grupo crescente de patógenos humanos e animais (19).

O vírus da hepatite C (HCV) é o membro melhor caracterizado dentro do gênero *Hepacivirus*. O HCV foi descoberto em 1989 por Choo e colaboradores (98), isolado inicialmente a partir do soro de um paciente com hepatite não-A e não-B, logo após sua identificação descobriu-se que o HCV era o agente viral responsável por aproximadamente 90% dos casos de hepatite não-A e não-B nos EUA (99).

O HCV era o único membro descrito no gênero *Hepacivirus* até 2011, quando emergiu a primeira evidência de hepacivírus circulando em cães com doença respiratória nos Estados Unidos (100). Na última década, membros do gênero *Hepacivirus* foram descritos em cães (100), equinos (101)(102), morcegos (103), várias espécies de roedores (104)(105)(106), bovinos europeus e africanos (107)(108), primatas não-humanos (109), tubarões (110), asnos (111) e patos (112). Recentemente, sequências hepacivírus-like foram encontradas em mosquito *Culex annulirostris* e carrapatos *Ixodes* na Austrália (113)(114).

Os membros da família *Flaviviridae* compartilham algumas características estruturais e virológicas. Os hepacivírus, como os flavivírus, são vírus cujo material genético é formado de RNA de fita simples e polaridade positiva, suas partículas virais são esféricas e envelopadas, com aproximadamente 50 nm de diâmetro. O genoma dos hepacivírus possui ORF (do inglês *Open Reading Frame*, fase de leitura aberta) única e flanqueada por duas regiões não codificantes – 5' e 3', a tradução do seu genoma codifica uma poliproteína que é clivada por proteases virais e do hospedeiro em proteínas estruturais (C, E1 e E2) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). No HCV, imediatamente à jusante das três proteínas estruturais encontra-se uma pequena proteína denominada p7, já em outras espécies de hepacivírus encontra-se uma proteína correspondente a p7 (115)(19).

Atualmente, há 14 espécies no gênero *Hepacivirus* que são denominadas de A até N, e nas quais os isolados são classificados com base nas relações filogenéticas e na distância entre sequências de regiões conservadas. A espécie A inclui os hepacivírus de equinos e caninos; na espécie B foi classificado o GB vírus B (GBV-B); a espécie C é composta pelo HCV; a espécie D é composta pelo Guereza hepacivírus, isolado de primatas do velho mundo; as espécies E até J são compostas por hepacivírus de roedores; e as espécies K até M, por hepacivírus isolados de morcegos; o hepacivírus bovino, compõe a espécie N (116).

1.4.2 Modo de transmissão dos hepacivírus

O modo de transmissão de diversas espécies do gênero *Hepacivirus* permanece incerto. Até o momento, a via de transmissão pela qual os hepacivírus se propagam é especulativa (117). O único membro do gênero cujo modo de transmissão está esclarecido é o HCV.

A transmissão do HCV ocorre primordialmente através da exposição percutânea a sangue e hemoderivados contaminados, podendo ocorrer, também, de forma vertical, da mãe para o filho e, raramente, através de relações sexuais. O genoma do HCV já foi detectado em diversos fluídos corporais, como urina, saliva, fluído seminal e lágrimas (118)(119), porém não é descrita transmissão através dessas secreções, assim como também não há evidências de que o HCV consiga penetrar a pele íntegra. A transmissão através da mucosa, porém, já foi relatada através do contato de sangue contaminado com a mucosa ocular (120). Atualmente, os riscos de transmissão estão relacionados, particularmente, ao uso de drogas injetáveis e atividade sexual de alto risco (121).

A forma como os hepacivírus são transmitidos em populações de animais e a origem do HCV em humanos é incerta. Acredita-se que o hepacivírus equino (Hepacivírus A) seja transmitido de modo semelhante ao HCV, via inoculação direta. A alta prevalência do hepacivírus equino em cavalos de corrida é sugestiva de que a transmissão entre estes animais possa ocorrer de forma iatrogênica por exposição parenteral, através da inoculação do agente (102)(117). Uma outra hipótese levantada acerca do modo de transmissão dos hepacivírus é a de que esta ocorra via repasto sanguíneo de artrópodes contaminados, os quais poderiam ser vetores mecânicos ou até mesmo biológicos dos hepacivírus, contudo deve-se enfatizar que este tipo de transmissão nunca foi relatada para o HCV (122).

Especula-se que os tabanídeos, que são moscas hematófagas, possam participar da transmissão de hepacivírus como potenciais vetores mecânicos. A transmissão ocorreria principalmente em virtude de como este artrópode corta a pele de hospedeiros para se alimentar, pelo grande volume de sangue em suas peças bucais, e por fim pela facilidade com que trocam de hospedeiro quando são interrompidos durante o repasto sanguíneo. Os tabanídeos estão implicados na transmissão mecânica de outros vírus em animais, como o vírus da anemia infecciosa equina (do inglês *Equine Infectious Anemia Virus* - EIAV) (117).

Recentemente, uma sequência divergente do tipo hepacivírus-like, denominada Jogalong vírus (JgV), foi descoberta em um mosquito *Culex annulirostris* ingurgitado na região de Kimberley no norte da Austrália ocidental. Entretanto, os autores sugerem que o JgV tenha sido obtido através do repasto sanguíneo desse mosquito em um podargo australiano (114). Anteriormente, já havia sido relatado a detecção de hepacivírus em carrapatos do gênero *Ixodes* (113).

1.4.3 Hepacivírus em animais

Nos últimos nove anos a diversidade filogenética do gênero *Hepacivirus* aumentou consideravelmente. Até 2011, o único hepacivírus conhecido era o HCV, cuja infecção acontece exclusivamente em humanos e chimpanzés. Atualmente, os hepacivírus estão descritos em diferentes espécies e sua caracterização em novos hospedeiros encontra-se em plena expansão (115).

O primeiro hepacivírus descrito após o HCV foi o CHCV. A identificação de um novo hepacivírus em amostras de *swab* nasal de cães foi um achado ocasional, em um estudo realizado para caracterizar vírus presentes na microbiota de animais de companhia que utilizava, além de amostras de animais saudáveis, amostras adquiridas durante um surto de doença respiratória aguda. Através de sequenciamento de alto desempenho, sequências filogeneticamente relacionadas ao HCV foram descritas nas amostras oriundas de animais com quadro clínico respiratório. Diferente do hepatotropismo que caracteriza o HCV, nos cães a quantidade de cópias de RNA do recém descoberto hepacivírus apresentava-se maior em amostras respiratórias do que em amostras de fígado, um achado inusitado e intrigante (100).

Estudos realizados subsequentemente falharam em detectar o CHCV em outros grupos de cães (117). Além disso, não foi obtido êxito na detecção do recém descrito hepacivírus em uma ampla coorte de cães com hepatite crônica sem etiologia definida (123). O que sugere que a infecção do hepacivírus em cães seja uma transmissão recente para esta espécie, ou, a mais aceita, de que os animais tenham sido infectados ao consumir carne equina, ou por exemplo, ao serem imunizados com vacinas para cães fabricadas a partir do soro de equinos (117). Tais hipóteses são levantadas devido: à dificuldade em encontrar cães infectados pelo Hepacivírus canino (CHCV) (124) e ao fato de sequências com alta identidade nucleotídica com as sequências de cães terem sido detectadas em 2012 em soros de equinos nos EUA (101).

A detecção do CHCV em um novo grupo de cães foi novamente possível em 2015, quando El-Attar e colaboradores (124) descreveram pela primeira vez o vírus em cães do Reino Unido, mais especificamente em um abrigo onde doenças respiratórias eram comuns. Mais uma vez o CHCV foi detectado em amostras do sistema respiratório, especialmente tecido traqueal. Contudo, a patogenia do vírus em cães ainda não foi muito bem esclarecida.

Em 2012, o mesmo grupo que descreveu o CHCV realizou um amplo ensaio sorológico em diversos animais e encontrou um grande número de equinos com anticorpos anti-NS3 de hepacivírus. O genoma viral foi detectado em alguns dos equinos soropositivos, sendo logo observado pelo grupo que a sequência de hepacivírus equina possuía alta identidade nucleotídica com a sequência canina (101).

O CHCV e o EHCV foram classificados como espécie A dos hepacivírus (116). Ao contrário do que acontece com o CHCV, a detecção de EHCV em equinos não é um evento raro. Pybus & Thézé (117) levantaram algumas hipóteses para essa questão incluindo a transmissão cruzada entre equinos e cães, que ocorreria pelo uso de soro de equinos em vacinas comercializadas para uso em cães, a transmissão pela via respiratória em animais alojados nos mesmos ambientes, ou por fim a ingestão pelos cães de carne ou miúdos de origem equina contaminados. Contudo, são necessários estudos que confirmem tais instigações.

O EHCV já foi detectado em diversos países, inclusive no Brasil (125)(102). Os equinos acometidos pelo EHCV normalmente não apresentam doença grave, sendo normalmente reportadas infecções subclínicas leves e transitórias, diferente do HCV que é seu homólogo mais próximo e normalmente cursa para o desenvolvimento de doença crônica em humanos. Há, porém, relatos de doença hepática grave em equinos naturalmente infectados pelo EHCV (126)(127). Além disso, a cinética da infecção e evolução do EHCV em equinos demonstrou-se similar à do HCV durante a infecção experimental desses animais (128).

Após a descoberta do EHCV foi levantada a possibilidade de que outros hepacivírus estivessem presentes em diferentes espécies de hospedeiros mamíferos, e tal prerrogativa levou o mesmo grupo que descreveu o CHCV e o EHCV pela primeira vez a procurar em outras espécies de pequenos animais novos hepacivírus. Esses pesquisadores utilizaram amostras de soro de 400 espécies de roedores capturados na natureza, identificando a presença de várias espécies de hepacivírus. As espécies de hepacivírus de roedores (do inglês *rodent hepacivirus* - RHV) recém isoladas, no entanto, apresentaram divergência molecular substancialmente maior em relação ao HCV do que a observada anteriormente com o grupo A dos hepacivírus (105). Logo após, Drexler e colaboradores (2013)(104) reportaram a presença de hepacivírus em roedores oriundos da Europa, África, Tailândia e México, revelando, ainda, tropismo do hepacivírus de roedores pelo

fígado destes animais. Atualmente, os hepacivírus de roedores agrupam-se nas espécies E, F, G, H, I e J (116).

Ainda em 2013, as primeiras sequências genômicas de hepacivírus infectando morcegos foram descritas em um estudo realizado com amostras de soro de morcegos de sete países (Guatemala, Camarões, Nigéria, Quênia e República Democrática do Congo, Bangladesh e México). Nesse estudo foram identificados três novos hepacivírus em morcegos africanos do Quênia, sem constatar, no entanto, evidências de doença clínica relacionada a infecção por hepacivírus nestes animais (103). Os três vírus identificados em morcegos por Quan e colaboradores (2013) foram agrupados nas espécies K, L e M do gênero *Hepacivirus* (116).

Dentre os primatas, os chimpanzés são os únicos animais, além dos seres humanos, susceptíveis à infecção pelo HCV. Desde a descoberta do HCV em 1989, há grande interesse no estabelecimento de novos modelos animais para estudo do HCV, pois o uso excepcional de chimpanzés esbarra diretamente em questões éticas, orçamentárias e legais (129). Em 2013, foi publicada a primeira descrição de hepacivírus no soro de três macacos *Colobus guereza* em Uganda. O novo vírus denominado Guereza hepacivírus (GHV) apresentou, porém, ancestralidade comum com hepacivírus de roedores, morcegos e o GB vírus B (GBV-B). Em contrapartida, o GHV aparenta ser divergente do HCV (130).

Outro hepacivírus que infecta primatas não-humanos é o GBV-B, descrito pela primeira vez em 1967 após a inoculação do soro de um cirurgião com hepatite aguda em micos (*Saguinus* spp.). Os animais que receberam o soro desenvolveram quadro de hepatite. Apesar do GBV-B ter sido associado com doença hepática, ele só foi completamente caracterizado em 1995. Várias tentativas de inclusão do GBV-B no gênero *Hepacivirus* foram realizadas e atualmente o GBV-B está incluído na espécie B (131)(115)(116).

O último hepacivírus descrito em mamíferos foi o hepacivírus bovino (BOVHV), que foi identificado em bovinos de Gana (108) e Alemanha (107). A investigação do curso da infecção natural do BOVHV em bovinos alemães revelou indícios de infecção aguda e crônica nos animais, com alguns animais sustentando viremia por mais de 6 meses. Altas concentrações do genoma viral também foram encontradas em tecido hepático, sugerindo o hepatotropismo do BOVHV(107).

No entanto, os bovinos infectados pelo BOVHV não apresentaram sinais clínicos ou post-mortem que indicassem doença ou dano hepático (107). No Brasil, o BOVHV já circula entre os bovinos nacionais há pelo menos duas décadas. Em

1996, a investigação de vírus da diarréia viral bovina em soros de bovinos do Rio Grande do Sul, identificou três amostras com baixa identidade com o pestivírus. Após a descrição do BOVHV em 2015, os pesquisadores brasileiros identificaram que as sequências encontradas quase vinte anos antes possuíam identidade nucleotídica de 88,9% com o recém-descrito hepacivírus bovino (132). Desde sua primeira descrição, o BOVHV já foi descrito em gado leiteiro na China (133)(134), em soro fetal bovino procedente da China (135) e dos Estados Unidos da América (136). Em 2018, mais uma vez o BOVHV foi detectado em bovinos brasileiros, dessa vez da região nordeste do país (137).

Além dos mamíferos já citados, foi descrito recentemente um novo hepacivírus em amostras de tecido hepático de tubarões. O denominado Wenling Shark Virus (WLSV) foi o primeiro hepacivírus descrito em um hospedeiro não-mamífero. Tal descoberta demonstra a ampla variedade de hospedeiros e diversidade genômica dos hepacivírus (110).

Até o momento, as investigações quanto às infecções por hepacivírus em mamíferos domésticos e silvestres foram realizadas em um pequeno número de espécies, sendo que nenhuma espécie de hepacivírus foi descrita em suínos. A expansão de investigações em mais espécies de mamíferos poderá fornecer maior clareza acerca da origem e evolução de integrantes deste gênero, tornando relevante e importante a caracterização de um maior número de hospedeiros e da diversidade genética entre os hepacivírus animais (115).

1.4.4 Métodos diagnósticos para detecção dos hepacivírus

O diagnóstico laboratorial dos hepacivírus, tal como é realizado para os flavivírus, baseia-se na detecção direta e indireta do agente infeccioso, que incluem a detecção do genoma viral e as provas sorológicas. Muitos dos hepacivírus descritos recentemente em animais foram descobertos por técnicas de sequenciamento de alto desempenho, utilizadas principalmente em pesquisas científicas. Como o único hepacivírus capaz de causar doença em seres humanos é o HCV, os métodos diagnósticos comercialmente disponíveis e mais rotineiramente empregados restringem-se a este agente infeccioso, ficando a detecção dos hepacivírus recém-descritos ainda limitada ao campo da pesquisa científica.

Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos anti-hepacivírus, principalmente anti-HCV, foram aprimorados desde a descoberta do HCV em 1989. O ELISA vem sendo amplamente utilizado para a triagem de pacientes com suspeita da infecção, especialmente aqueles com fatores de risco identificáveis e elevação inexplicável dos níveis de aminotransferases hepáticas (138)(139). O primeiro ensaio de triagem foi produzido a partir da clonagem do HCV e conseqüentemente a expressão do antígeno recombinante c100-3 em leveduras (140). Desde então, várias gerações aprimoradas de ELISA são capazes de detectar anticorpos específicos para vários epítomos do HCV, utilizando antígenos recombinantes que capturam anticorpos anti-HCV a partir de amostras de soro ou plasma (141).

Ensaio imunoenzimáticos também podem ser utilizados para determinação dos diferentes genótipos do HCV, como o ELISA de competição, que auxilia na identificação do tipo (genótipo) envolvido na infecção (141). Para a identificação de subtipos do HCV, o LiPA (do inglês *Line Probe Assay* – ensaio de sondas em linha) tem sido amplamente empregado, tal ensaio consiste na genotipagem por hibridização reversa, onde DNA biotinilado é hibridizado com sondas nucleotídicas imobilizadas (142). A determinação molecular do genótipo do HCV é importante para o diagnóstico da doença causada por este agente infeccioso e para escolha do tratamento antiviral, sendo uma significativa alternativa ao método de ELISA de competição. As diferenças encontradas entre os diferentes genótipos do HCV acarretam mudanças no que diz respeito a terapêutica, que pode ser ajustada individualmente de acordo com as necessidades do paciente (140)(141).

A RT-PCR é uma ferramenta ímpar para o diagnóstico de infecção ativa pelo HCV e outros hepacivírus em questão. As vantagens do diagnóstico molecular incluem: 1) o diagnóstico precoce de infecções agudas; 2) a identificação da infecção em indivíduos ou animais incapazes de expressar uma resposta de anticorpos; 3) a confirmação de infecção ativa em indivíduos cujos ensaios sorológicos tiveram resultado indeterminado; e por fim 4) quantificação da carga viral através da RT-PCR quantitativa em tempo (140).

1.4.5 Circulação de hepacivírus no Distrito Federal

Como mencionado anteriormente, além do HCV, os únicos hepacivírus descritos no Brasil até o momento são os Hepacivírus A e N. Contudo, ainda não foi identificada a circulação desses vírus em animais do Distrito Federal.

De 2008 a 2018 foram notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 2.194 casos confirmados de hepatite C em diferentes regiões administrativas (RA) que compõem o Distrito Federal. A maior parte dos casos está concentrada na superintendência de saúde da região sudoeste, composta pelas RAs Águas Claras, Recanto das Emas, Samambaia, Taguatinga e Vicente Pires. As regiões administrativas que mais apresentaram casos de infecção pelo HCV neste período foram Ceilândia e Taguatinga (Tabela 2). Do total de casos confirmados de hepatite C, 152 evoluíram para o óbito (143).

O número expressivo de casos notificados observado em 2016 é atribuído a uma mudança na compilação dos dados, onde passaram a ser também inseridos no SINAN todos os pacientes com hepatite C cadastrados no sistema de dispensação de medicamentos da SES-DF (Secretaria de Saúde do Distrito Federal), mas que não haviam sido notificados ao longo dos anos (143).

Tabela 2. Número de casos confirmados de hepatite C no Distrito Federal de 2008 a 2018, segundo local de residência e ano de notificação

Superintendência	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
CENTRAL	25	31	23	18	23	33	22	10	116	15	13	329
Asa Norte	8	12	7	2	5	11	8	4	52	4	6	119
Asa Sul	5	8	7	8	12	7	7	3	28	5	4	94
Cruzeiro	3	3	5	4	2	7	1	1	3	3	1	33
Lago Norte	5	2	3	2	1	3	3	1	9	2	0	31
Lago Sul	2	4	1	1	2	1	2	1	12	1	1	28
Sudoeste/Octogonal	2	2	0	1	1	3	1	0	12	0	1	23
Varjão do Torto	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
CENTRO-SUL	22	20	17	19	16	19	15	9	70	12	17	236
Candangolândia	0	2	1	1	5	1	0	3	7	0	2	22
Guará	12	7	10	8	8	10	8	2	34	10	7	116
Núcleo Bandeirante	4	4	2	3	0	3	3	0	7	0	2	28
Park Way	0	0	1	0	1	1	0	0	10	0	1	14
Riacho Fundo I	2	3	2	3	1	0	4	2	7	2	2	28
Riacho Fundo II	3	0	0	0	1	1	0	2	4	0	3	14
SCIA (Estrutural)	1	3	1	4	0	3	0	0	1	0	0	13
SIA	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
LESTE	15	39	14	25	24	12	8	13	18	8	5	181
Itapoã	0	0	0	2	5	3	0	0	3	2	1	16
Jardim Botânico	0	2	1	1	1	0	0	0	1	1	0	7
Paranoá	0	0	0	5	6	1	1	6	3	3	2	27
São Sebastião	15	37	13	17	12	8	7	7	11	2	2	131
NORTE	30	53	36	45	27	24	22	13	43	18	13	324
Fercal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Planaltina	18	22	21	28	14	12	14	9	19	3	6	166
Sobradinho	10	19	8	13	5	5	8	1	15	11	6	101
Sobradinho II	2	12	7	4	8	7	0	3	8	4	0	55
OESTE	19	28	31	31	30	22	26	14	41	23	22	287
Brazlândia	2	3	3	3	5	0	4	1	1	1	1	24
Ceilândia	17	25	28	28	25	22	22	13	40	22	21	263
SUDOESTE	23	72	57	57	57	51	69	37	109	31	43	606
Águas Claras	1	5	3	1	6	5	7	3	26	3	1	61
Recanto das Emas	4	14	9	23	15	12	11	7	6	10	11	122
Samambaia	9	15	12	13	14	15	24	16	25	9	7	159
Taguatinga	9	38	33	19	19	16	24	10	47	9	18	242
Vicente Pires	0	0	0	1	3	3	3	1	5	0	6	22
SUL	7	15	33	18	19	13	11	9	30	13	9	177
Gama	3	8	7	10	8	8	4	5	19	10	6	88
Santa Maria	4	7	26	8	11	5	7	4	11	3	3	89
Em Branco	1	2	5	4	5	3	2	2	19	7	4	54
Total	142	260	216	217	201	177	175	107	446	127	126	2194

Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde do Distrito Federal (143).

2 JUSTIFICATIVA

Os suínos fazem parte da dieta humana. Modificações genéticas nesses animais têm, recentemente, os colocado em posição promissora em relação aos xenotransplantes. Além disso, os suínos estão envolvidos na transmissão de vários agentes zoonóticos. Esses animais são hospedeiros naturais e intermediários de diversos agentes infecciosos de importância médica.

Suínos de criações de subsistência, ou seja, provenientes de sistemas de criação sem tecnificação e com envolvimento de mão de obra familiar, vivem sob condições vulneráveis e favoráveis para disseminação e transmissão de doenças. Animais oriundos deste sistema de criação são submetidos a práticas de manejo sem que o tratador faça uso de equipamentos de proteção, estreitando seu contato com o homem.

No Brasil, até o momento, não há descrição de flavivírus e hepacivírus infectando suínos domésticos. Apesar de não haver descrição em suínos brasileiros, alguns flavivírus vêm sendo descritos em suínos domésticos como, por exemplo, o JEV. Como visto, os suínos constituem um importante elemento na cadeia de transmissão do JEV, atuando como hospedeiros amplificadores desse agente viral.

Os fatores envolvidos na emergência, reemergência e disseminação global dos flavivírus ainda não são completamente compreendidos. Conforme abordado na primeira seção deste trabalho, pelo menos 14 flavivírus já foram reportados em vertebrados no Brasil, sendo que a maioria é de transmissão enzoótica e pouco se sabe acerca de sua distribuição geográfica e seus hospedeiros amplificadores. Portanto, a investigação de flavivírus e seus possíveis hospedeiros no Brasil é de grande importância para a saúde pública.

A origem do vírus da hepatite C (HCV) como um patógeno humano ainda é um quebra-cabeça sem solução. Até o momento, as investigações quanto às infecções por hepacivírus em mamíferos domésticos e silvestres foram realizadas em um pequeno número de espécies, sendo que nenhuma espécie de hepacivírus foi descrita em suínos. A expansão de investigações em mais espécies de mamíferos poderá fornecer maior clareza acerca da circulação e distribuição geográfica dos hepacivírus no Brasil.

Dessa forma, no presente estudo pretendemos investigar a circulação de flavivírus e hepacivírus de importância médica e veterinária em suínos domésticos

de criatórios de subsistência no Distrito Federal. Ou seja, suínos de “fundo de quintal”, oriundos de criações susceptíveis a entrada de patógenos e que vivem sob condições favoráveis para o estabelecimento de epizootias e transmissão de zoonoses. Para isso utilizaremos reações de PCR capazes de amplificar e detectar vírus já conhecidos e ainda desconhecidos pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Hepacivirus*, através do uso de oligonucleotídeos iniciadores de grupo.

Resultados desse estudo contribuirão para o conhecimento sobre a circulação desses vírus no país, além de fornecer subsídios para a implementação de ações relativas à vigilância e aos procedimentos operacionais para o aprimoramento da sanidade suídea no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a circulação de flavivírus e hepacivírus em suínos domésticos hígidos de pequenas criações de subsistência do Distrito Federal e do Sistema Intensivo de Criação de Suínos ao Ar Livre da Universidade de Brasília (SISCAL - UnB).

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Detectar através de ferramentas moleculares RNA de flavivírus e hepacivírus em soro de suínos domésticos do Distrito Federal.
- 2) Realizar o sequenciamento nucleotídico seguido de análise filogenética de flavivírus e hepacivírus detectados em soro de suínos domésticos do Distrito Federal.
- 3) Investigar potencial participação de suínos domésticos em ciclos de transmissão de flavivírus e hepacivírus no Distrito Federal.
- 4) Contribuir para o conhecimento da circulação dos diferentes flavivírus e hepacivírus no Distrito Federal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), sob os protocolos nº 18/2018 (Anexo 1) e nº 111/2019 (Anexo 2).

4.2 População suína estudada e fluxograma de trabalho

Um total de 328 amostras de soro de suínos (*Sus scrofa domesticus*) foi utilizado neste estudo. Destas, 318 amostras foram cedidas pela Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal (SEAGRI-DF) (Anexo 3) e as dez amostras restantes foram coletadas de suínos oriundos do Sistema Intensivo de Criação de Suínos ao Ar Livre (SISCAL) da Fazenda Água Limpa (FAL), propriedade rural da Universidade de Brasília (UnB) (Anexo 3).

As amostras cedidas pela SEAGRI-DF foram coletadas em criatórios de subsistência durante o inquérito nacional de Peste Suína Clássica (PSC) em áreas livres, delineado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entre os meses de agosto e setembro do ano de 2016. De acordo com a Norma Interna DSA Nº 05 de 2009 do MAPA (6), os critérios definidos para a escolha dos estabelecimentos amostrados deve considerar:

- estabelecimentos em fronteira internacional e divisas da zona livre de PSC existente no Brasil;
- estabelecimentos próximos a áreas de proteção, reservas naturais ou parques com fauna de suídeos silvestres;
- localização em áreas periurbanas ou comunidades carentes;
- criações extensivas de suídeos;
- estabelecimentos próximos a assentamentos rurais ou reservas indígenas;
- estabelecimentos que fornecem resíduos alimentares (lavagem) aos animais;
- estabelecimentos próximos a lixões;

- estabelecimento de criação cujo proprietário possui propriedade em outro país ou em área endêmica para a PSC;
- estabelecimentos próximos a graxarias;
- estabelecimentos próximos a quarentenários de suídeos.

De acordo com dados fornecidos pela SEAGRI-DF, o número de propriedades amostradas foi definido para detectar pelo menos uma propriedade positiva para presença do CSFV - Vírus da Peste Suína Clássica (do inglês *Classical Swine Fever Virus*), utilizando um intervalo de confiança de 95% e prevalência esperada de 1%. A partir desses parâmetros 318 propriedades foram selecionadas para o estudo realizado em 2016.

Todas as coletas do inquérito nacional de PSC foram realizadas em duplicatas e conduzidas em propriedades rurais de subsistência localizadas no Distrito Federal, totalizando 317 propriedades localizadas no Distrito Federal, e uma única coleta realizada em propriedade rural localizada no município de Águas Lindas de Goiás, cidade no entorno do Distrito Federal (Figura 1). Destaca-se, ainda, que a SEAGRI-DF disponibilizou uma única alíquota (5 ml) de soro de cada animal e que cada amostra utilizada neste estudo representa um suíno proveniente de uma única propriedade dentre as 318 amostradas.

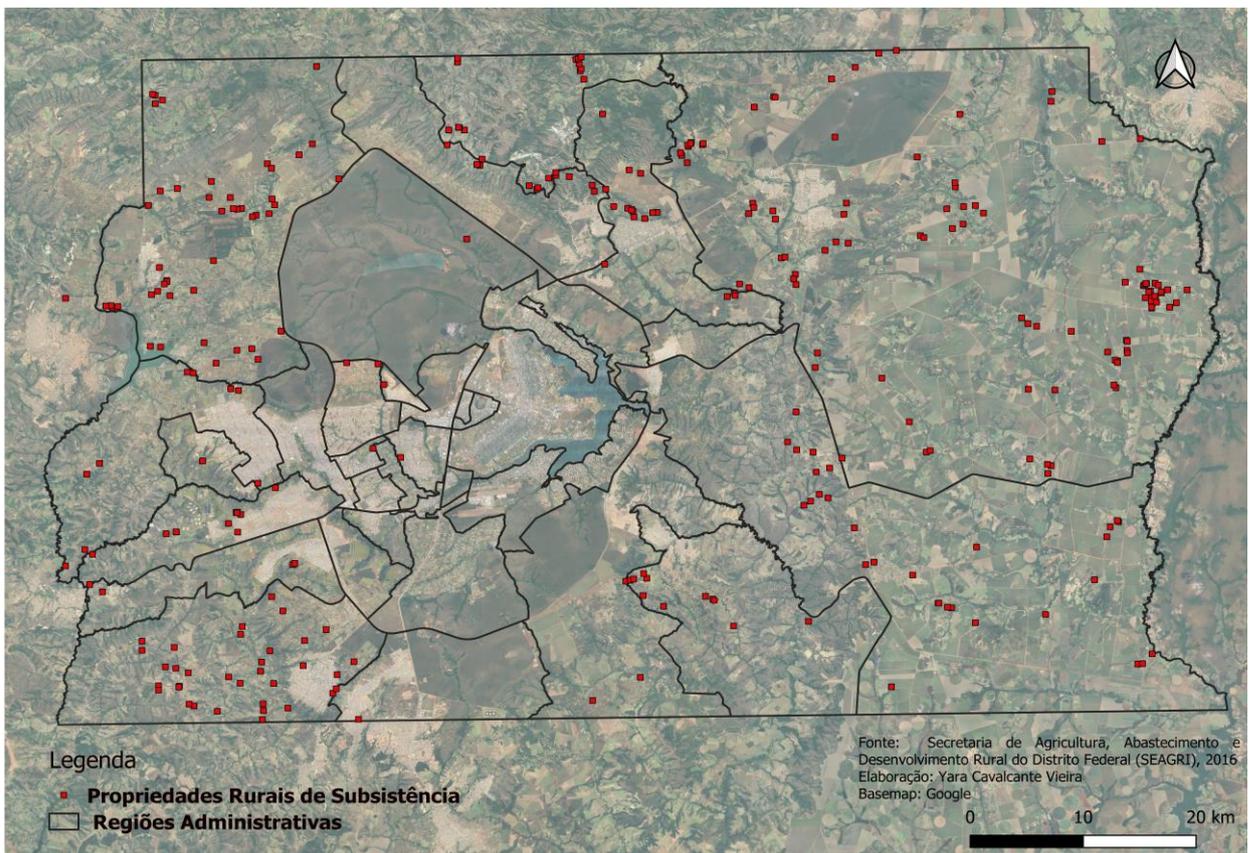


Figura 1. Localização geográfica dos criatórios de subsistência da população de suínos estudada

Cada amostra oriunda do inquérito nacional de PSC representa um suíno de subsistência identificado por sexo, idade e local de nascimento (Anexo 3). Destaca-se, ainda, que todos os animais pertencentes a este estudo foram declarados como nascidos na propriedade.

Os suínos venopuncionados pela SEAGRI-DF não foram submetidos a exames clínicos, entretanto todos os animais estavam aparentemente hígidos no momento da coleta de sangue. Os suínos coletados no SISCAL da FAL-UnB são clinicamente avaliados periodicamente e também aparentavam estar saudáveis no momento da venopunção. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas com gelo reciclável durante o transporte das propriedades rurais até a SEAGRI-DF e ao Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília, onde foram mantidas à -20°C e -70°C , respectivamente.

As amostras de soro foram submetidas a extração de RNA e o extraído utilizado em uma *One-Step* RT-qPCR para detecção de flavivírus, e síntese de cDNA e *Nested* RT-PCR para detecção de hepaticivírus. Os produtos foram purificados e submetidos a reação de sequenciamento para posterior sequenciamento nucleotídico e análise filogenética (Figura 2).

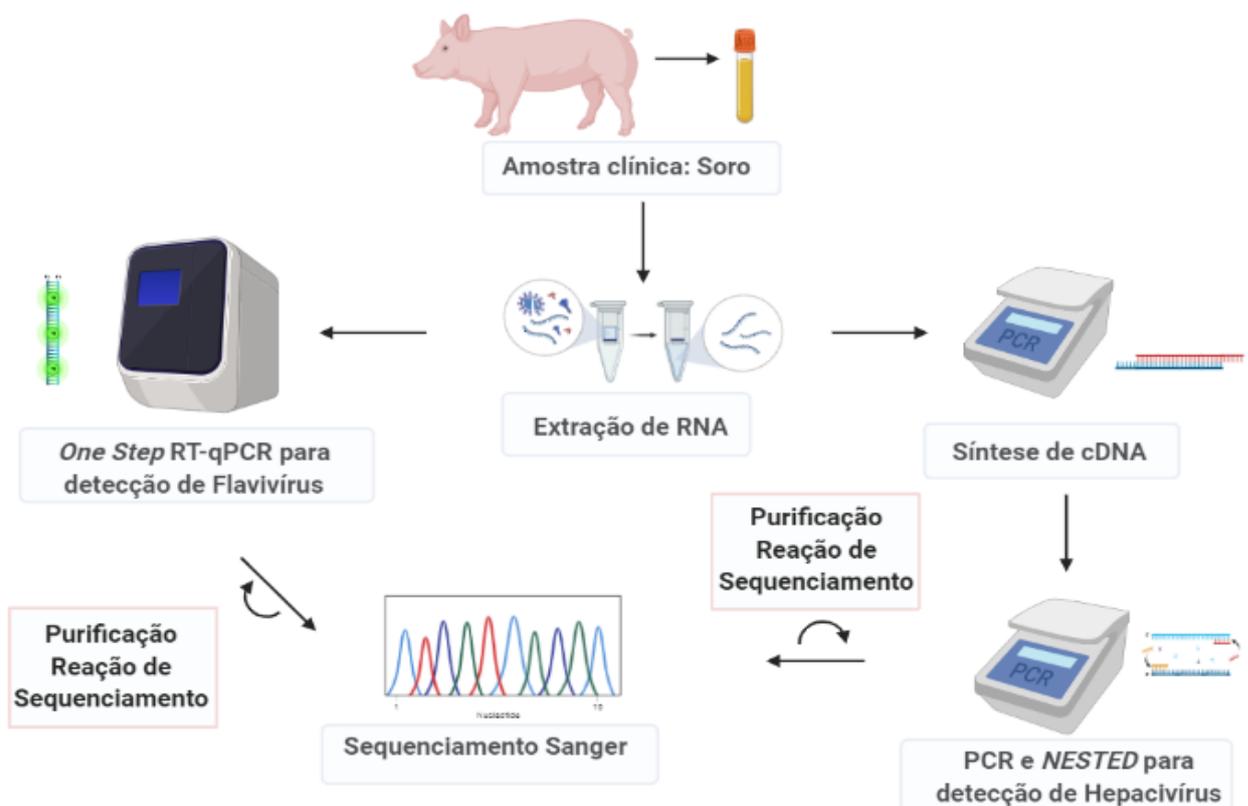


Figura 2. Fluxograma do experimento.

4.3 Extração do RNA viral

A extração do genoma viral a partir das amostras de soro foi realizada utilizando-se *kit* comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (*Qiagen, USA*), seguindo instruções do fabricante. A extração foi executada a partir de 140µL de soro, com eluição final de 60µL de RNA, imediatamente armazenado a -70°C para utilização posterior nas análises.

4.4 Detecção do RNA de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* por *One-Step* RT-qPCR

O RNA extraído foi submetido a *One-Step* RT-qPCR end-point, utilizando-se *QuantiNova SYBR® Green RT-PCR Kit* (*QIAGEN, USA*) e oligonucleotídeos universais degenerados (quadro 1) previamente descritos por Moureau e colaboradores (2008)(144). A reação foi preparada com 0,1 µL de água DNase/RNase free, 0,2 µL de *QuantiNova RT mix*, 0,1 µL de ROX, 10 µL de 2x *QuantiNova Master Mix* e 0,8 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 13,88 µM/µL.

Foram utilizados como controles positivos da reação inóculos de DENV-2, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Flavivírus (LABFLA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores degenerados para amplificação de segmento do gene NS5 de flavivírus

<i>Oligonucleotídeo iniciador</i>	
PF1S	5'-TGY RTB TAY AAC ATG ATG GG-3'
PF2R-bis	5'-GTG TCC CAI CCN GCN GTR TC-3'

Fonte: Adaptado de Moureau e colaboradores (2007) (144).

A termociclagem foi realizada em equipamento ABI 7500, sendo as reações realizadas em duplicata e nas seguintes condições, adaptadas de Moureau e colaboradores (144)(2008): transcrição reversa a 50°C por 10 minutos; desnaturação inicial com inativação da transcrição reversa e ativação da enzima Taq DNA polimerase a 95°C por 2 minutos; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, hibridização a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A curva de dissociação foi estabelecida aumentando-se gradativamente a temperatura em 0,5°C a cada 30 segundos, dentro do intervalo entre 55°C e 95°C.

Amostras em que a temperatura de *melting* (T_m) foi igual ou maior que 75°C e com pico único foram consideradas positivas para a presença de RNA de flavivírus.

4.5 Detecção do RNA de vírus pertencentes ao gênero *Hepacivirus* por *Nested* RT-PCR

O DNA complementar (cDNA) dos RNAs extraídos foi sintetizado com *kit* comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, USA)*, seguindo instruções do fabricante. A amplificação de um segmento do gene NS3 do genoma dos hepacivírus foi realizada com oligonucleotídeos degenerados previamente descritos por Drexler e colaboradores (2013)(104). Foram utilizados como controles positivos da reação inóculos de EHCV e HCV, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do IOC.

A mistura da primeira reação foi preparada com volume final de 25 µL, contendo 9 µL de água DNase/RNase free, 5 µL de 5X *Colorless GoTaq® Reaction Buffer*, 2 µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) a 2,5mM (*Applied Biosystem*, EUA), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo iniciador degenerado a 10mM - hepaci 1 e hepaci 4 (quadro 2), 0,25 µL de enzima *GoTaq® DNA Polimerase* (*Promega*, EUA), 1,25 µL de MgCl₂ e 5 µL de cDNA previamente sintetizado. A termociclagem consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguida de extensão final a 72°C por 5 minutos. O amplificado com 674pb foi utilizado posteriormente em reação de *Nested RT-PCR* para amplificação de segmento com 289pb.

A segunda reação foi preparada com 1 µL de produto de PCR, repetindo-se as demais condições de preparo da reação e termociclagem da PCR anterior, e completando-se volume final de 25 µL com água DNase/RNase free. Nesta reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores degenerados hepaci 2 e hepaci 3 (quadro 1).

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores degenerados para amplificação de segmento do gene NS3 de hepacivírus

<i>Oligonucleotídeo iniciador</i>	
Hepaci-1	5'-GCN CCN ACN GGN AGY GGN AA-3'
Hepaci-2	5'-GCN ACN GCN ACN CCN CCN GG-3'
Hepaci-3	5'-CCN GTC ATN AGR GCR TCN GT-3'
Hepaci-4	5'-CAR TCN RTN ACN GAR TCR AAR TYN CC-3'

Fonte: Adaptado de Drexler e colaboradores (2013) (104).

Os produtos da reação de *Nested RT-PCR* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (*GIBCO*, EUA) com tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE 1X), corado com corante *safer dye* (*KASVI*, Brasil) e o amplificado com 289pb visualizado em transiluminador de led (*KASVI*, Brasil).

4.6 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Os produtos de PCR de amostras positivas foram submetidos à sequenciamento de Sanger para caracterização molecular dos isolados. Os produtos foram purificados com *kit* comercial *QIAquick gel extraction* (Qiagen, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Para todos os isolados foi realizado sequenciamento direto em ambas as direções (senso e antisenso).

As misturas para reações de sequenciamento foram preparadas com *kit* *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, EUA) contendo 4,5 µL de água RNase/DNase free, 1 µL de oligonucleotídeo iniciador a 3,2 pmol, 1 µL de Big dye, 1,5 µL de tampão (5x Buffer Big dye), 2 µL (10 ng) de produto. A reação de sequenciamento utilizada para flavivírus consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 15 segundos, seguida de anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos; seguido de 39 ciclos de 95°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. A reação de sequenciamento utilizada para hepacivírus consistiu em 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Ambas as reações foram realizadas com variação (*slope*) de 1°C/s entre as temperaturas.

As reações foram encaminhadas à plataforma de sequenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, precipitadas de acordo com o protocolo interno e o sequenciamento realizado com sequenciador *ABI3730* (Applied Biosystems, EUA) (145).

Os eletroferogramas obtidos foram analisados com o programa MEGA v.7.0.14, as sequências com boa qualidade foram alinhadas e comparadas àquelas depositadas no *GenBank*, utilizando-se a ferramenta BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*).

5 RESULTADOS

5.1 Animais utilizados no estudo

De acordo com o banco de dados obtido junto à SEAGRI-DF e ao SISCAL-UnB, os 328 suínos que compuseram esta investigação foram classificados em jovens, adultos e adultos jovens. Foram considerados jovens os animais com até 12 meses de idade, adultos jovens os animais entre 13 e 59 meses, e adultos aqueles a partir de 59 meses. De acordo com esse critério, a distribuição dos animais foi a seguinte: 222 (67,6%) jovens, 103 (31,4%) adultos jovens e 3 (1%) adultos (Figura 3). Em relação ao sexo dos suínos, 196 (60%) eram fêmeas e 132 (40%) machos (Figura 4).



Figura 3. Representação gráfica da classificação e distribuição dos animais de acordo com a idade.

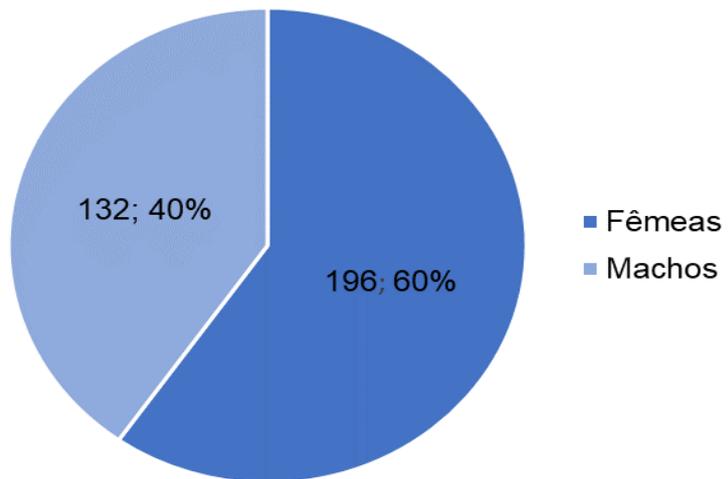


Figura 4. Representação gráfica da distribuição dos suínos por sexo



Figura 5. Suíno do SISCAL-UnB (macho reprodutor)
Fonte: Acervo pessoal.



Figura 6. Suíno do SISCAL-UnB (fêmea)
Fonte: Acervo pessoal.

5.2 Pesquisa de flavivírus em suínos domésticos

A reação *One-Step* RT-qPCR end-point, uma reação para a detecção de RNA de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, foi validada no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília (LMMV-UnB). Todos os controles positivos para flavivírus utilizados no estudo resultaram positivos em todos os ensaios (DENV-2), assim como todos os controles negativos resultaram negativos (Figura 7).

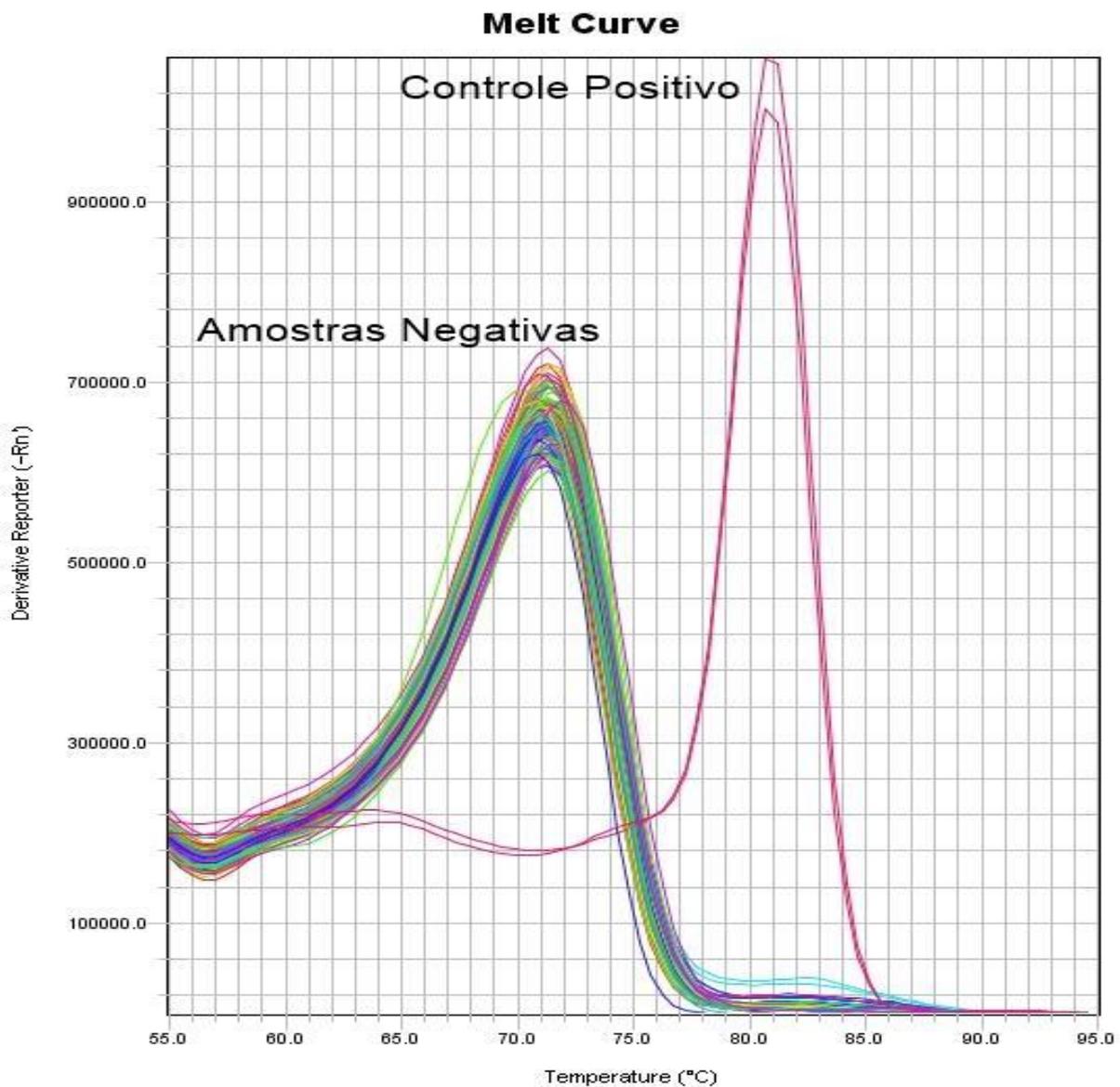


Figura 7. Gráfico da curva de dissociação da *One Step* RT-qPCR para detecção de flavivírus demonstrando o controle positivo e amostras negativas.

Todas as 328 amostras de soro de suínos analisadas foram negativas para flavivírus. O limite de detecção da reação apresentada por Moureau e colaboradores (2007)(144) é descrito como menor que 21000 cópias/reação para todos os RNA dos flavivírus testados na padronização, alcançando valores menores que 3 cópias/reações para alguns vírus testados pelo grupo.

5.3 Pesquisa de hepacivírus em suínos domésticos

A *Nested* RT-PCR utilizada na pesquisa de vírus pertencentes ao gênero *Hepacivirus* também foi validada no LMMV, sendo que os dois controles positivos

para hepacivírus utilizados (HCV e EHCV) durante a pesquisa foram satisfatoriamente amplificados em todos os ensaios (Figura 8), e os controles negativos foram negativos no protocolo executado.

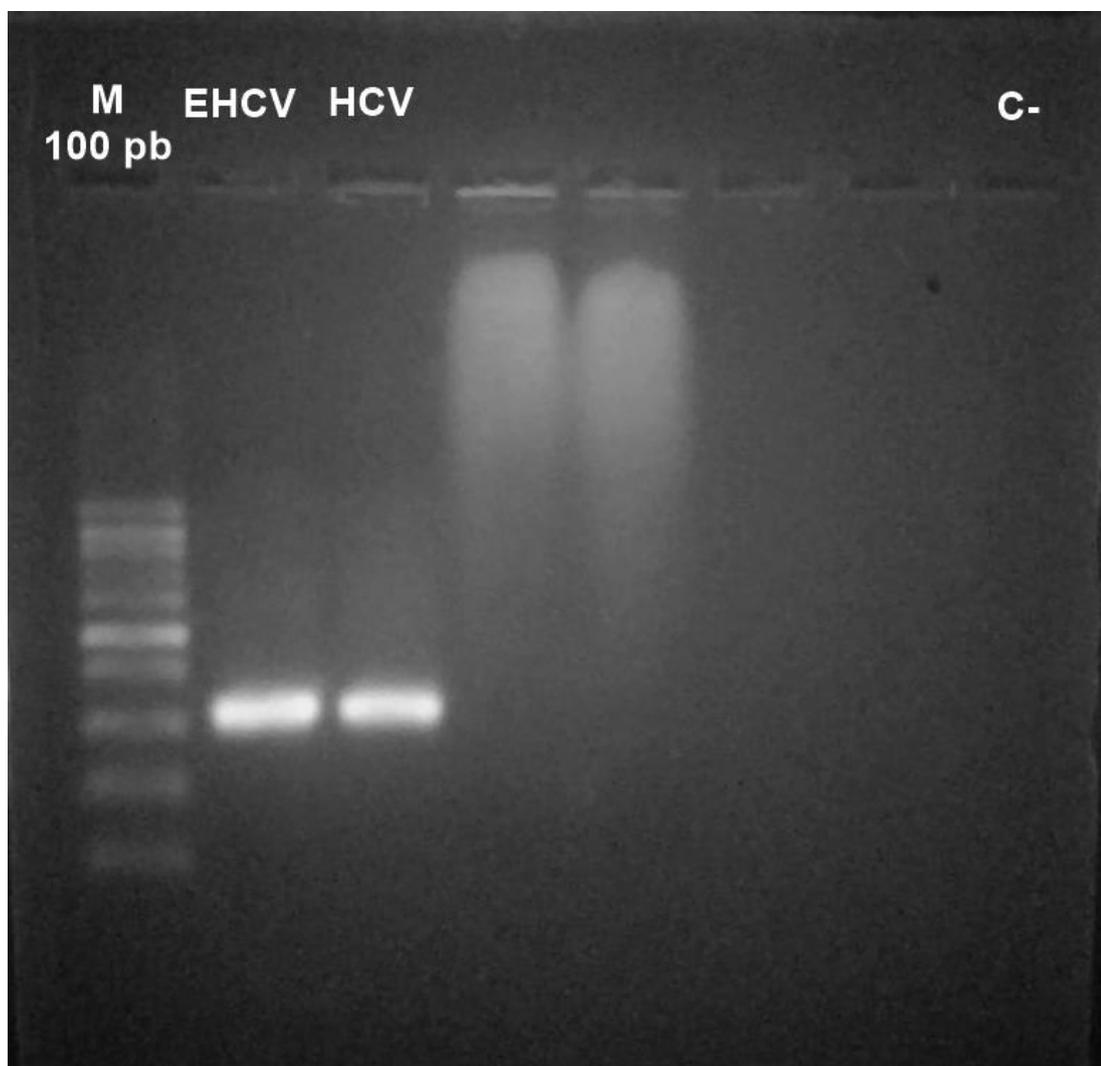


Figura 8. Gel de agarose a 1,5%. M - Marcador de peso molecular de 100 pb; EHCV - Hepacivírus equino; HCV - Vírus da Hepatite C.
Fonte: Acervo pessoal.

Todas as 328 amostras de soro de suínos analisadas foram negativas para hepacivírus.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a presença de infecção por vírus pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Hepacivirus* em amostras de soro de suínos domésticos de criações de subsistência e do SISCAL - UnB, coletadas nos anos de 2016 e 2019 no Distrito Federal. Nas subseções abaixo discutiremos separadamente os resultados obtidos nesta investigação.

6.1 Pesquisa de flavivirus

Catorze vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* e capazes de infectar vertebrados já foram identificados no Brasil, são eles: BSQV, CPCV, DENV 1-4, YFV, IGUV, ILHV, NJLV, ROCV, SLEV, WNV e ZIKV (30)(31)(32). Os flavivírus estão entre os principais grupos de vírus de importância médica e veterinária que circulam no país, e nos últimos anos têm sido responsáveis por sucessivas epidemias de arboviroses no Brasil, o qual possui características ecológicas, ambientais e socioeconômicas que formam um cenário ideal para a circulação desses vírus (21)(146).

O presente estudo é a primeira investigação da circulação de flavivírus em suínos do Distrito Federal, utilizando métodos moleculares para detecção de genoma viral. Métodos sorológicos são amplamente empregados em estudos que investigam a infecção por flavivírus em hospedeiros vertebrados, principalmente flavivírus enzoóticos. Entretanto, optamos pelo emprego de métodos moleculares seguido de sequenciamento porque estes permitem a detecção de infecção aguda, identificação e caracterização específica do flavivírus envolvido, dados para avaliação da disseminação desses vírus no país, além da detecção de animais virêmicos corroborar para a potencial participação dos mesmos em ciclos de manutenção desses vírus (85).

Dessa forma, para investigarmos a presença de infecção por flavivírus em nossas amostras, optamos pela utilização do protocolo de detecção molecular por *One-Step* RT-qPCR, descrito por Moureau e colaboradores (144)(2007), que é capaz de amplificar e detectar mais de 51 espécies de flavivírus através do uso de oligonucleotídeos iniciadores degenerados. Com este método direto de detecção seria possível a identificação e subsequente caracterização molecular dos flavivírus

amplificados e sequenciados durante a investigação, informações relevantes para o estudo.

Somando-se a isso, o protocolo descrito por Moureau e colaboradores (144)(2007) também é eficaz para a descrição de flavivírus ainda desconhecidos. O vírus Nhumirim (NHUV), por exemplo, foi identificado pela primeira vez em pool de mosquitos *Culex (Culex) chidesteri* capturados no pantanal mato-grossense, através do protocolo supracitado (147).

A maioria das amostras de soro de suínos que compreendem esta investigação foram coletadas entre agosto e setembro de 2016 no Distrito Federal, período que compreende o final da estação seca e início do período chuvoso na região. Já as amostras oriundas do SISCAL – UnB foram coletadas em dezembro de 2019, período predominantemente chuvoso. Como descrito anteriormente 318 dessas amostras foram coletadas e cedidas pela SEAGRI-DF, que utilizou as mesmas durante o inquérito nacional de PSC.

A escolha pela utilização desse banco de soros para investigação deve-se principalmente às características e tipo de criação em que estes animais se encontram, classificada como de subsistência. Diversas propriedades amostradas para o inquérito localizam-se próximas a grandes centros urbanos do Distrito Federal (Figura 1), os quais apresentam ciclos epidêmicos de flavivírus, como DENV e ZIKV. A criação de suínos normalmente não é a atividade principal do produtor nesse tipo de criação, e usualmente esses animais são criados no quintal de tais propriedades, em estreita proximidade com seres humanos. As condições de higiene e sanidade também são abaixo do ideal nesses locais, verificando-se também intensa proliferação de artrópodes, conforme relatado por médicos veterinários da SEAGRI-DF. Já os suínos do SISCAL – UnB são criados em um sistema intensivo, onde a criação possui tecnologia, porém os animais são criados ao ar livre e com contato com a natureza. Esses componentes, como já pontuado anteriormente quando visitamos o estado da arte, são importantes para o estabelecimento de epizootias por flavivírus.

Dos 328 soros de suínos analisados neste trabalho nenhum apresentou RNA de flavivírus, sugerindo ausência de infecção aguda por flavivírus nos animais investigados. Resultados semelhantes foram obtidos recentemente por Pauvolid-Correa e colaboradores (2019)(148), onde cerca de 2.000 amostras de sangue total de vertebrados domésticos, incluindo 36 suínos, e selvagens também do centro-

oeste brasileiro, mais especificamente dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, foram negativas para RNA de flavivírus.

Moreira-Soto e colaboradores (2018)(149) também obtiveram resultados semelhantes utilizando o protocolo descrito por Moureau e colaboradores (2007)(144) ao investigar a infecção por flavivírus e alphavírus em primatas não-humanos das regiões nordeste e centro-oeste brasileiros, nenhum animal testou positivo para a presença de RNA viral de flavivírus nesta investigação.

A detecção molecular de flavivírus em amostras de sangue total ou soro de animais domésticos ou selvagens requer coleta de sangue no período de viremia, que em hospedeiros não amplificadores costuma ser curto e com baixa carga viral. Mesmo em hospedeiros amplificadores, esse período de viremia costuma ser curto e ocorre apenas por alguns dias ao longo de toda a vida desses vertebrados. Ainda que chamados de hospedeiros amplificadores, essas espécies envolvidas em ciclos de transmissão de flavivírus são amplificadores temporários, uma vez que costumam apresentar imunidade logo após a primeira exposição. Essa característica comum aos flavivírus arbovírus torna ainda mais difícil a detecção de viremia em coletas únicas desses animais.

Dessa forma, não se pode descartar que os animais utilizados neste estudo tenham sido expostos a um ciclo abortivo de transmissão, uma vez que não foi possível analisar coletas seriadas de cada um dos animais amostrados em um período de tempo, o que provavelmente contribuiria para melhorar o entendimento da circulação desses vírus nesses animais, através da utilização do método de investigação molecular empregado.

As sorologias possuem limitações inerentes a técnica, a interpretação de resultados positivos na sorologia deve ser realizada com bastante cautela devido a ocorrência de reações cruzadas (150). Como já esclarecido nas seções anteriores, os flavivírus são antigenicamente relacionados entre si e, em regiões em que existe a circulação simultânea de dois ou mais flavivírus, a interpretação de resultados dos métodos sorológicos deve levar em consideração potenciais reatividades cruzadas, tornando um pouco mais complexo o diagnóstico sorológico desse grupo de vírus (82).

No entanto, mesmo com as limitações apresentadas acima, o uso de ferramentas sorológicas neste estudo complementar e contribuiria para melhorar o entendimento da circulação de flavivírus em suínos domésticos brasileiros, uma vez que os testes sorológicos positivos evidenciam exposição passada a estes vírus.

Assim, é importante o incentivo do uso de ambas as ferramentas diagnósticas em estudos futuros. No estudo de Pauvolid-Correa e colaboradores (2019) (148), anteriormente citado, apesar de todas as amostras apresentarem-se negativas para RNA de flavivírus, vinte três amostras de sete diferentes espécies de vertebrados foram positivas para ZIKV no PRNT₉₀, sugerindo a exposição destes animais ao ZIKV em ambiente urbano e periurbano. Dessa forma, ao somarmos ambas as técnicas diagnósticas somamos também as informações sobre a circulação desses vírus, o que é bastante significativo para estudos desta natureza.

Outro ponto a ser ressaltado é que conforme descrito na seção de materiais e métodos, as amostras cedidas pela SEAGRI-DF foram mantidas a -20°C até envio ao LMMV, o que não é a temperatura ideal de armazenamento para preservação de RNA viral. Todavia, esse é apenas um aspecto a ser considerado uma vez que as amostras coletadas nos suínos do SISCAL-UnB foram mantidas sob condições ideais de armazenamento, mas também foram negativas para a presença dos vírus investigados neste estudo.

Investigações de circulação de flavivírus como a que realizamos neste estudo ainda são escassas, portanto, são fundamentais para a compreensão do papel dos hospedeiros vertebrados na manutenção e transmissão desses vírus. A circulação desses vírus em vertebrados, especialmente animais domésticos, é pouco conhecida e pouco explorada. Os resultados negativos observados neste estudo, durante o período amostrado, colaboram para a vigilância ativa de flavivírus em suínos brasileiros. No entanto, para uma análise mais ampla dos dados, estudos longitudinais são necessários, assim como o uso de ferramentas complementares entre si, como a sorologia junto a RT-PCR.

Os resultados negativos apresentados neste trabalho, não permitem deliberar sobre a ocorrência de transmissão enzoótica de flavivírus entre os suínos domésticos investigados, entre agosto e setembro de 2016 e em dezembro de 2019, no Distrito Federal. Em contrapartida, em 2016, ano em que foram coletadas a maioria das amostras deste estudo, mais de 17 mil hospedeiros humanos foram infectados por flavivírus em ciclos epidêmicos nessa mesma região (92). O ano de 2016 também marcou o início do pior surto de febre amarela silvestre dos últimos 80 anos no Brasil, de novembro de 2016 até abril de 2018 foram notificados 1.833 casos confirmados e 578 óbitos por febre amarela no país (151). No Distrito Federal, foram confirmadas epizootias em primatas não-humanos em 2016 (152), com três casos humanos reportados em 2017 e dois em 2018 (95)(96).

Estudos longitudinais, envolvendo a investigação ativa e diferentes ferramentas de diagnóstico devem ser incentivados, já que a detecção de ciclos silenciosos com a transmissão enzoótica ocorrendo antes do aparecimento de casos clínicos em humanos contribuiriam substancialmente para a vigilância de flavivírus no país e para o estabelecimento de políticas públicas efetivas em um contexto de saúde única.

6.2 Pesquisa de hepacivírus

Na última década, estudos de investigação ativa por novas espécies de vírus pertencentes ao gênero *Hepacivirus* têm demonstrado a circulação de diferentes hepacivírus em diferentes espécies animais (107).

No presente estudo investigamos a circulação de hepacivírus em suínos do Distrito Federal através de métodos moleculares e utilizando oligonucleotídeos iniciadores degenerados descritos por Drexler e colaboradores (2013)(104), pelos quais foram descritos novos hepacivírus de roedores. Dos 328 soros de suínos analisados neste trabalho nenhum apresentou RNA de hepacivírus. A revisão de literatura, corrobora os achados apresentados uma vez que nenhuma espécie de hepacivírus foi identificada em suínos domésticos até o momento.

Resultados similares têm sido obtidos por diferentes autores que também se propuseram a investigar a circulação de hepacivírus em suínos domésticos. Em 2012, Lyons e colaboradores (153) investigaram, utilizando métodos moleculares, a presença de hepacivírus em um total de 552 amostras de animais do Reino Unido, dentre os quais 40 amostras de soro de suínos. Apesar dos resultados negativos em suínos domésticos, foram encontradas três amostras de plasma de equino positivas. Da mesma forma, Schlottau e colaboradores (2018)(154) também investigaram a presença de infecção por hepacivírus em suínos domésticos. Dentre 4.421 amostras oriundas de diferentes espécies animais, foram testados 470 suínos. Mais uma vez todas as amostras de soro suíno foram negativas e amostras de soro de equinos e asnos positivas.

Todavia, a presença de anticorpos específicos para o BOVHV foi reportada em amostras de soros de suínos por Baechlein e colaboradores (2019)(155). Amostras de soro de 100 matrizes suínas e 100 suínos em fase de engorda foram analisadas por LIPS (do inglês *Luciferase Immunoprecipitation System* – Sistema de Imunoprecipitação da Luciferase), quatro amostras de soro suíno reagiram

fracamente com o antígeno e uma única amostra foi altamente reativa. A intrigante forte reatividade desta única amostra pode ter se dado tanto por um efeito inespecífico de componentes do soro como também indicar a infecção passada por hepacivírus bovino ou outro hepacivírus ainda desconhecido, o que fomenta e incentiva a continuidade da investigação deste grupo de vírus nesses animais.

Diversos estudos foram realizados com asnos até a identificação da circulação de hepacivírus nestes animais. A primeira detecção de hepacivírus nesta espécie deu-se apenas em 2017 após estudo com 829 asnos, dos quais 279 foram soropositivos e o RNA viral detectado em apenas três animais (156). A baixa prevalência de RNA nas amostras de asnos e a alta soroprevalência de anticorpos sugerem uma predominância de infecção aguda nesses animais, o que pode ser considerado como uma diferença do padrão de infecção crônica dos hepacivírus. Por analogia, é possível que a infecção por hepacivírus em suínos seja transitória, dificultando a detecção molecular do agente nesta espécie animal.

Diferentes espécies de hepacivírus têm sido detectados em animais, mas a única espécie descrita até o momento que possui alta homologia com o HCV é o EHCV. Dessa forma, a pesquisa por novos hepacivírus em um hospedeiro anatomicamente e fisiologicamente semelhante ao ser humano como o suíno tem sido realizada por grupos de pesquisa de diferentes continentes, o que deve ser incentivado e continuado. Mesmo que não haja, até o momento, evidência de transmissão zoonótica das novas espécies identificadas de hepacivírus, a investigação dessas novas espécies pode contribuir para o entendimento da origem do HCV, da diversidade genética dos hepacivírus animais e contribui, ainda, para a identificação de um modelo experimental alternativo aos primatas não-humanos para estudos da biologia e patogenicidade desse agente infeccioso.

Nossos resultados não evidenciaram infecção aguda por hepacivírus e a circulação de hepacivírus em suínos domésticos coletados entre agosto e setembro de 2016 e em dezembro de 2019 no Distrito Federal. Entretanto, assim como apontado na seção anterior em relação aos flavivírus, mais estudos de investigação ativa e estudos longitudinais são necessários para a melhor compreensão da variedade de espécies hospedeiras e da diversidade genética desse grupo de vírus. Apenas algumas espécies de mamíferos foram investigadas para a infecção por hepacivírus e nosso trabalho configura a primeira investigação ativa da presença de infecção por hepacivírus em suínos brasileiros.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados das análises moleculares reportados neste estudo sugerem ausência de infecção aguda por flavivírus e hepacivírus em suínos de criações de subsistência no Distrito Federal e do SISCAL-UnB, no período amostrado;
- Estudos longitudinais incluindo ferramentas moleculares e sorológicas devem ser incentivados, visando um melhor entendimento da exposição e circulação de flavivírus e hepacivírus em rebanhos suínos no Brasil.

8 PERSPECTIVAS

- Continuar a investigação ativa da presença de infecção por esses grupos de vírus em suínos domésticos, através de estudo longitudinal;
- Investigar através de ferramentas sorológicas, como o PRNT₉₀, a exposição da população estudada aos flavivírus que circulam no Brasil;

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Central de Inteligência de Aves e Suínos - CIAS - Portal Embrapa [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/>
2. Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>
3. Associação Brasileira de Criadores de Suínos, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Mapeamento da Suinocultura Brasileira [Internet]. 1^a. Brasília: SEBRAE; 2016 [cited 2017 Nov 19]. 376 p. Available from: http://www.abcs.org.br/attachments/-01_Mapeamento_COMPLETO_bloq.pdf
4. Zanella JRC, Morés N, de Barcellos DESN. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. *Pesqui Agropecu Bras*. 2016 May 1;51(5):443–53.
5. Cardoso BF, Oyamada GC, Magno Da Silva C. Produção, Tratamento e Uso dos Dejetos Suínos no Brasil.
6. Serviço Público Federal Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento Secretaria De Defesa Agropecuária-Sda Departamento De Saúde Animal-DSA Gabinete 1 Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento Secretaria De Defesa Agropecuária Norma Interna DSA. 2009.
7. Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul [Internet]. [cited 2020 Nov 22]. Available from: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/02101335-inftec-52-panorama-da-suinocultura-no-rio-grande-do-sul.pdf>
8. Coelho ACB, Oliveira PA de, Santos BL dos, Zamboni R, Silva PE, Pereira CM, et al. DOENÇAS DE SUÍNOS DIAGNOSTICADAS EM CRIAÇÕES DE SUBSISTÊNCIA NA REGIÃO SUL DO BRASIL. *INVESTIGAÇÃO*. 2017 Dec 15;16(8).
9. Rigueira LL. Soroprevalência da brucelose em criatórios de suínos no Distrito Federal, Brasil. 2017 Mar 21 [cited 2020 Nov 22]; Available from: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/24078>
10. NOVO SIDAGRO: [Internet]. [cited 2020 Nov 23]. Available from: <http://sidagro.seagri.df.gov.br/sidagro/login.seam>

11. Pond WG, Houpt KA. The biology of the pig. Comstock Pub. Associates; 1978. 371 p.
12. Uddin Khan S, Atanasova KR, Krueger WS, Ramirez A, Gray GC. Epidemiology, geographical distribution, and economic consequences of swine zoonoses: A narrative review [Internet]. Vol. 2, Emerging Microbes and Infections. Nature Publishing Group; 2013 [cited 2020 Mar 26]. p. 1–11. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2013.87>
13. Zanella JRC. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. *Pesqui Agropecuária Bras.* 2016 May;51(5):510–9.
14. ZOOSES AND COMMUNICABLE DISEASES COMMON TO MAN AND ANIMALS. 2001.
15. Funk J, Wagstrom E. Preharvest Food Safety, Zoonotic Diseases, and the Human Health Interface. In: *Diseases of Swine* [Internet]. Wiley; 2019 [cited 2020 Mar 26]. p. 197–210. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119350927.ch12>
16. Vectorborne and Zoonotic Diseases [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: https://www.niehs.nih.gov/research/programs/geh/climatechange/health_impacts/vectorborne/index.cfm
17. Park SL, Huang YJS, Lyons AC, Ayers VB, Hettenbach SM, McVey DS, et al. North American domestic pigs are susceptible to experimental infection with Japanese encephalitis virus. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1):1–8.
18. Dos F, Souza SE, Py-Daniel V. 06-Artigo-Fabiana-. 2007 [cited 2018 May 6];(41):187–212. Available from: http://www.funai.gov.br/arquivos/conteudo/cogedi/pdf/revista_estudos_pesquisas_v4_n1/05-Fabiana_dos_Santos_Souza_e_Victor_Py-Daniel-Influencia_das_movimentacoes_Yanomami_na_endemic.pdf
19. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J Gen Virol.* 2017 Jan 1;98(1):2–3.
20. WHO [Internet]. [cited 2020 Mar 29]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39922/WHO_TRS_719.pdf?sequence=1&isAllowed=y
21. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Oct 26];40(2):224–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-

86822007000200016&lng=en&tlng=en

22. WHO | Zoonoses. WHO [Internet]. 2017 [cited 2018 Oct 27]; Available from: <http://www.who.int/topics/zoonoses/en/>
23. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*. 1989;70(1):37–43.
24. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. 33 Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. 2006.
25. Chambers TJ, Monath TP. The Flaviviruses. Volume 61, Detection, diagnosis and vaccine development. Elsevier Academic Press; 2003. 577 p.
26. Huhtamo E, Cook S, Moureau G, Uzcátegui NY, Sironen T, Kuivanen S, et al. Novel flaviviruses from mosquitoes: Mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses. *Virology*. 2014;464–465(1):320–9.
27. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* [Internet]. 2004 Dec 30 [cited 2017 Nov 19];10(12s):S98–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577938>
28. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016 Jun 27;50.
29. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Nov 19];22(7):1185–92. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/7/15-1990_article.htm
30. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* [Internet]. 2000 Nov [cited 2018 Nov 10];2(13):1643–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113383>
31. Figueiredo LTM. West Nile virus infection in Brazil. Vol. 52, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2019.
32. Rodrigues SG, Azevedo R do S da S, Martins LC, Nunes MRT, Araújo G de CB, Monteiro HA de O, et al. Estudo eco-epidemiológico na área do Projeto Salobo, Marabá-Pará: isolamento e identificação de amostras de arbovírus. 2004;
33. Blitvich BJ, Firth AE. A review of flaviviruses that have no known arthropod

- vector. Vol. 9, Viruses. MDPI AG; 2017.
34. Vasilakis N, Weaver SC. Flavivirus transmission focusing on Zika. Vol. 22, Current Opinion in Virology. Elsevier B.V.; 2017. p. 30–5.
 35. Mlera L, Melik W, Bloom ME. The role of viral persistence in flavivirus biology. Vol. 71, Pathogens and Disease. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 135–61.
 36. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease [Internet]. Vol. 2, Nature Reviews Microbiology. 2004 [cited 2020 Mar 28]. p. 789–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378043>
 37. Austgen LE, Bowen RA, Bunning ML, Davis BS, Mitchell CJ, Chang GJJ. Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*. 2004 Jan;10(1):82–6.
 38. Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, et al. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2150–5.
 39. Kelley T, Richards S. Insights into Zika Virus History, Human Health Effects, and Control Measures. Vol. 10, Environmental Health Insights. SAGE Publications Inc.; 2016.
 40. Mann TZ, Haddad LB, Williams TR, Hills SL, Read JS, Dee DL, et al. Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. Vol. 32, Paediatric and Perinatal Epidemiology. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 358–68.
 41. Campos SS, Fernandes RS, Dos Santos AAC, De Miranda RM, Telleria EL, Ferreira-De-Brito A, et al. Zika virus can be venereally transmitted between *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites and Vectors*. 2017 Dec 15;10(1).
 42. Williams DT, MacKenzie JS, Bingham J. Flaviviruses. In: Diseases of Swine [Internet]. Wiley; 2019 [cited 2020 Mar 28]. p. 530–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119350927.ch33>
 43. Cassetti MC, Durbin A, Harris E, Rico-Hesse R, Roehrig J, Rothman A, et al. Report of an NIAID workshop on dengue animal models. *Vaccine* [Internet]. 2010 Jun 11 [cited 2017 Nov 19];28(26):4229–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434551>
 44. Ragan IK, Blizzard EL, Gordy P, Bowen RA. Investigating the Potential Role of North American Animals as Hosts for Zika Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2017 Mar [cited 2017 Nov 19];17(3):161–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28145811>

45. Hayashi M. Übertragung des Virus von Encephalitis epidemica japonica auf Affen. *Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 1933 Dec 1 [cited 2020 Mar 29];1(1):419–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1819.1933.tb02410.x>
46. Le Flohic G, Porphyre V, Barbazan P, Gonzalez JP. Review of Climate, Landscape, and Viral Genetics as Drivers of the Japanese Encephalitis Virus Ecology. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(9).
47. Gresser I, Izumi T, Moyer JT, Scherer WF, McCown J. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1959 Nov 1 [cited 2020 Jan 29];8(6):698–706. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1959.8.698>
48. Campbell GL, Hills SL, Fischer M, Jacobson JA, Hoke CH, Hombach JM, et al. Estimation de l'incidence mondiale de l'encéphalite japonaise: une évaluation systématique. *Bull World Health Organ*. 2011 Oct;89(10).
49. Japanese encephalitis [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis>
50. Takagi M, Sugiyama A, Maruyama K. Effect of Rice Culturing Practices on Seasonal Occurrence of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) Immatures in Three Different Types of Rice-Growing Areas in Central Japan. *J Med Entomol* [Internet]. 1995 Mar 1 [cited 2020 Jan 29];32(2):112–8. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/32.2.112>
51. Ricklin ME, Garcia-Nicolàs O, Brechbühl D, Python S, Zumkehr B, Posthaus H, et al. Japanese encephalitis virus tropism in experimentally infected pigs. *Vet Res*. 2016 Feb 24;47(1).
52. IN 50/2013 — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/arquivos-programas-sanitarios/anexo16notifiobrgatIN502013.pdf/view>
53. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. *Am J Trop Med Hyg*. 1940 Jul 1;s1-20(4):471–92.
54. Le Guenno B, Bougermouh A, Azzam T, Bouakaz R. West Nile: A deadly virus? [13]. Vol. 348, *Lancet*. 1996. p. 1315.

55. McLean RG, Ubico SR, Bourne D, Komar N. West Nile virus in livestock and wildlife. Vol. 267, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2002. p. 271–308.
56. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*. 1998 Sep 5;352(9130):767–71.
57. CDC | Update: West Nile Virus Encephalitis -- New York, 1999 [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4841a3.htm>
58. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Jun 14 [cited 2020 Feb 13];344(24):1807–14. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200106143442401>
59. West Nile virus | West Nile Virus | CDC [Internet]. [cited 2020 Nov 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/westnile/index.html>
60. Yaremych SA, Warner RE, Mankin PC, Brawn JD, Raim A, Novak R. West Nile Virus and High Death Rate in American Crows. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2004 [cited 2020 Nov 21];10(4):709–11. Available from: </pmc/articles/PMC3323091/?report=abstract>
61. Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis AP, et al. West Nile Virus Infection in Birds and Mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2001 Aug [cited 2020 Nov 21];7(4):679–85. Available from: </pmc/articles/PMC2631772/?report=abstract>
62. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2020 Mar 28];9(3):311–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12643825>
63. USDA APHIS | West Nile Virus (WNV) [Internet]. [cited 2020 Nov 24]. Available from: <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease-information/equine/wnv/west-nile-virus>
64. Castillo-Olivares J, Wood J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res*. 2004;35:467–83.
65. Van Der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ. West Nile virus in the vertebrate world Brief Review. *Arch Virol*. 2005;150:637–57.

66. Characterization of West Nile Virus Infection in Swine - Pork Checkoff [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: <https://www.pork.org/research/characterization-of-west-nile-virus-infection-in-swine-2/>
67. Teehee ML, Bunning ML, Stevens S, Bowen RA. Experimental infection of pigs with West Nile virus. Brief Report. Arch Virol [Internet]. 2005 Jun [cited 2020 Mar 28];150(6):1249–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770358>
68. Ilkal MA, Prasanna Y, Jacob PG, Geevarghese G, Banerjee K. Experimental studies on the susceptibility of domestic pigs to West Nile virus followed by Japanese encephalitis virus infection and vice versa. Acta Virol [Internet]. 1994 Jun [cited 2017 Nov 19];38(3):157–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7817897>
69. Pauvalid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LTM, Couto-Lima D, Campos Z, et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2011 Jun [cited 2020 Sep 20];106(4):467–74. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=en
70. Melandri V, Guimarães AÉ, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2012 Dec [cited 2020 Nov 25];107(8):1073–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000800020&lng=en&nrm=iso&tlng=en
71. Pauvalid-Corrêa A, Campos Z, Juliano R, Velez J, Nogueira RMR, Komar N. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. Michael SF, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014 Feb 13 [cited 2020 Sep 20];8(2):e2706. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002706>
72. Silva JR, de Medeiros LC, dos Reis VP, Chávez JH, Munhoz TD, Borges GP, et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2013 Nov [cited 2020 Nov 25];108(7):921–3. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-

73. Vieira MACS, Romano APM, Borba AS, Silva EVP, Chiang JO, Eulálio KD, et al. Case report: West nile virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2020 Nov 21];93(2):377–9. Available from: [/pmc/articles/PMC4530764/?report=abstract](#)
74. WHO | West Nile virus – Brazil [Internet]. [cited 2020 Nov 24]. Available from: <https://www.who.int/csr/don/15-december-2014-wnv/en/>
75. Martins LC, Da Silva EVP, Casseb LMN, Da Silva SP, Cruz ACR, De Sousa Pantoja JA, et al. First isolation of west nile virus in brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019 Jan 1;114(1).
76. Knox J, Cowan RU, Doyle JS, Ligtermoet MK, Archer JS, Burrow JNC, et al. Murray valley encephalitis: A review of clinical features, diagnosis and treatment [Internet]. Vol. 196, *Medical Journal of Australia*. 2012 [cited 2020 Feb 18]. p. 322–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/mja11.11026>
77. French EL. Murray Valley encephalitis isolation and characterization of the aetiological agent. *Med J Aust* [Internet]. 1952 Jan 26 [cited 2020 Feb 18];1(4):100–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14909902>
78. Gard GP, Giles JR, Dwyer Gray RJ, Woodroffe GM. Serological evidence of inter epidemic infection of feral pigs in New South Wales with Murray Valley ecephalitis virus. *Aust J Exp Biol Med Sci* [Internet]. 1976 Jun [cited 2020 Feb 18];54(3):297–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1016127>
79. Kay BH, Young PL, Hall RA, Fanning ID. Experimental infection with Murray Valley encephalitis virus. Pigs, cattle, sheep, dogs, rabbits, macropods and chickens. *Aust J Exp Biol Med Sci* [Internet]. 1985 Feb [cited 2020 Feb 18];63(1):109–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2990398>
80. Darbellay J, Lai K, Babiuk S, Berhane Y, Ambagala A, Wheler C, et al. Neonatal pigs are susceptible to experimental Zika virus infection. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017 Feb 15 [cited 2018 Oct 26];6(2):e6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28196970>
81. Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. Vol. 8, *International Journal of Infectious Diseases*. Elsevier; 2004. p. 69–80.
82. Allwinn R, Doerr H, Emmerich P, Schmitz H, Preiser W. Cross-reactivity in

- flavivirus serology: New implications of an old finding? *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 2002 Mar 30 [cited 2020 Mar 29];190(4):199–202. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-001-0107-9>
83. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. In: *Viral Immunology* [Internet]. 2008 [cited 2020 Mar 29]. p. 123–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476771>
 84. Houghton-Triviño N, Montaña D, Castellanos JE. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Rev Salud Publica*. 2008;10(2):299–307.
 85. Lanciotti RS. Molecular Amplification Assays for the Detection of Flaviviruses. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press Inc.; 2003 [cited 2020 Mar 29]. p. 67–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006535270361002X>
 86. Zeinad AK, Novaretti MCZ, Chamone DAF. Vírus do Nilo Ocidental: nova ameaça à segurança transfusional? *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(2):114–21.
 87. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 22];3(1):85. Available from: </pmc/articles/PMC3988599/?report=abstract>
 88. Pirâmide Etária – Info DF [Internet]. [cited 2020 Mar 29]. Available from: http://infodf.codeplan.df.gov.br/?page_id=6
 89. Administrações Regionais – Secretaria de Estado de Governo do Distrito Federal [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <http://segov.df.gov.br/category/administracoes-regionais/>
 90. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2017 [cited 2017 Nov 22];48(13). Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/27/Monitoramento-integrado-de-alteracoes-no-crescimento-e-desenvolvimento-relacionadas-a-infeccao-pelo-virus-Zika.pdf>
 91. Informativos Epidemiológicos – Secretaria de Saúde do Distrito Federal [Internet]. [cited 2020 Mar 29]. Available from: <http://www.saude.df.gov.br/informes-epidemiologicos/>

92. SINANWEB - Página inicial [Internet]. [cited 2020 Mar 29]. Available from: <http://portalsinan.saude.gov.br/>
93. Secretaria de Vigilância em Saúde - Boletim Aedes aegypti – Secretaria de Saúde do Distrito Federal [Internet]. [cited 2020 Mar 29]. Available from: <http://www.saude.df.gov.br/2015-boletim-aedes-aegypti/>
94. Ministério da Saúde | Vacinação: quais são as vacinas, para quê servem, por que vacinar, mitos [Internet]. [cited 2020 Mar 29]. Available from: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/vacinacao/vacine-se>
95. Confirmada 1ª morte por febre amarela contraída no DF por residente – Agência Brasília [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/2017/12/29/confirmada-1a-morte-por-febre-amarela-contraida-no-df-por-residente/>
96. Saúde confirma primeiro caso de febre amarela do ano no DF – Agência Brasília [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/2018/02/27/saude-confirma-primeiro-caso-de-febre-amarela-do-ano-no-df/>
97. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology - Thomas P. Monath - Google Livros [Internet]. [cited 2020 Mar 6]. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ZtzBDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT108&dq=iversson+rocio+virus+1988&ots=UCRHsT6hBA&sig=j7fzWRosty5SkfzU9HKkdrjs3o4#v=onepage&q&f=false>
98. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* (80-). 1989;244(4902):359–62.
99. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. Vol. 3, *International Journal of Medical Sciences*. Ivyspring International Publisher; 2006. p. 47–52.
100. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Jul 12 [cited 2020 Feb 19];108(28):11608–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610165>
101. Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henriquez JA, Mishra N, et al. Serology-Enabled Discovery of Genetically Diverse Hepaciviruses in a New Host. *J Virol*. 2012 Jun 1;86(11):6171–8.

102. Figueiredo AS, Lampe E, do Espírito-Santo MP, do Amaral Mello FC, de Almeida FQ, de Lemos ERS, et al. Identification of two phylogenetic lineages of equine hepacivirus and high prevalence in Brazil. *Vet J* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2020 Mar 30];206(3):414–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26545848>
103. Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, Anthony SJ, et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 May 14 [cited 2020 Feb 28];110(20):8194–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610427>
104. Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Lukashev AN, Gmyl A, Coutard B, et al. Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Jun [cited 2020 Feb 19];9(6):e1003438. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818848>
105. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TKH, Hjelle B, Cullen JM, Burbelo PD, et al. Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio* [Internet]. 2013 Apr 9 [cited 2020 Feb 19];4(2):e00216-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572554>
106. Firth C, Bhat M, Firth MA, Williams SH, Frye MJ, Simmonds P, et al. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *rattus norvegicus* in New York city. *MBio*. 2014 Oct 14;5(5).
107. Baechlein C, Fischer N, Grundhoff A, Alawi M, Indenbirken D, Postel A, et al. Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J Virol* [Internet]. 2015 Jul [cited 2020 Feb 28];89(14):7007–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926652>
108. Corman VM, Grundhoff A, Baechlein C, Fischer N, Gmyl A, Wollny R, et al. Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* [Internet]. 2015 Jun [cited 2020 Feb 19];89(11):5876–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25787289>
109. Sibley SD, Lauck M, Bailey AL, Hyeroba D, Tumukunde A, Weny G, et al. Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African old world monkey species. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 11 [cited 2020 Feb 19];9(6):e98569. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24918769>
110. Shi M, Lin X-D, Vasilakis N, Tian J-H, Li C-X, Chen L-J, et al. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of

- the Flaviviridae and Related Viruses. *J Virol*. 2016 Jan 15;90(2):659–69.
111. Walter S, Rasche A, Moreira-Soto A, Pfaender S, Bletsa M, Corman VM, et al. Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine Hepaciviruses in Donkeys. *J Virol*. 2017 Jan 1;91(1).
 112. Chu L, Jin M, Feng C, Wang X, Zhang D. A highly divergent hepacivirus-like flavivirus in domestic ducks. *J Gen Virol* [Internet]. 2019 Aug [cited 2020 Feb 20];100(8):1234–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31282853>
 113. Harvey E, Rose K, Eden J-S, Lo N, Abeyasuriya T, Shi M, et al. Extensive Diversity of RNA Viruses in Australian Ticks. *J Virol*. 2018 Nov 7;93(3).
 114. Williams SH, Levy A, Yates RA, Somaweera N, Neville PJ, Nicholson J, et al. Discovery of Jogalong virus, a novel hepacivirus identified in a *Culex annulirostris* (Skuse) mosquito from the Kimberley region of Western Australia. Forrester N, editor. *PLoS One* [Internet]. 2020 Jan 3 [cited 2020 Feb 20];15(1):e0227114. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0227114>
 115. Hartlage AS, Cullen JM, Kapoor A. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 23];3(1):53–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27741408>
 116. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol*. 2016 Nov 1;97(11):2894–907.
 117. Pybus OG, Thézé J. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus [Internet]. Vol. 16, *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2020 Feb 23]. p. 1–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625715001443>
 118. Liou T -C, Chang T -T, Young K -C, Lin X -Z, Lin C -Y, Wu H -L. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* [Internet]. 1992 Jul 1 [cited 2020 Feb 22];37(3):197–202. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.1890370309>
 119. Feucht HH, Zollner B, Schroter M, Altrogge H, Laufs R. Tear fluid of hepatitis C virus carriers could be infectious. *J Clin Microbiol*. 1995 Aug 1;33(8):2202–3.
 120. Knipe DM, Howley P. *Fields virology: Sixth edition*. Vol. 1, *Fields Virology: Sixth Edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP); 2013. 1–2664 p.
 121. Henderson DK. Managing occupational risks for hepatitis C transmission in the

- health care setting. Vol. 16, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology (ASM); 2003. p. 546–68.
122. Pybus OG, Markov P V., Wu A, Tatem AJ. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. *Int J Parasitol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2020 Feb 23];37(8–9):839–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907001324>
 123. Bexfield NH, Watson PJ, Heaney J, Heeney JL, Tiley L. Canine hepacivirus is not associated with chronic liver disease in dogs. *J Viral Hepat*. 2014 Mar;21(3):223–8.
 124. El-Attar LMR, Mitchell JA, Brooks Brownlie H, Priestnall SL, Brownlie J. Detection of non-primate hepaciviruses in UK dogs. *Virology*. 2015 Oct 1;484:93–102.
 125. Gemaque BS alam., Junior Souza de Souza A, do Carmo Pereira Soares M, Malheiros AP inheir., Silva AL im., Alves MM oreir., et al. Hepacivirus infection in domestic horses, Brazil, 2011-2013 [Internet]. Vol. 20, *Emerging infectious diseases*. 2014 [cited 2020 Mar 30]. p. 2180–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420101>
 126. Reuter G, Maza N, Pankovics P, Boros Á. Non-primate hepacivirus infection with apparent hepatitis in a horse - Short communication. *Acta Vet Hung*. 2014 Sep 1;62(3):422–7.
 127. Tegtmeyer B, Echelmeyer J, Pfankuche VM, Puff C, Todt D, Fischer N, et al. Chronic equine hepacivirus infection in an adult gelding with severe hepatopathy. *Vet Med Sci* [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 26];5(3):372–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31267690>
 128. Ramsay JD, Evanoff R, Wilkinson TE, Divers TJ, Knowles DP, Mealey RH. Experimental transmission of equine hepacivirus in horses as a model for hepatitis C virus. *Hepatology*. 2015 May 1;61(5):1533–46.
 129. Ploss A, Kapoor A. Animal Models of Hepatitis C Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Dec 16;a036970.
 130. Lauck M, Sibley SD, Lara J, Purdy MA, Khudyakov Y, Hyeroba D, et al. A Novel Hepacivirus with an Unusually Long and Intrinsically Disordered NS5A Protein in a Wild Old World Primate. *J Virol*. 2013 Aug 15;87(16):8971–81.
 131. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Apr 11 [cited 2020 Feb

- 28];92(8):3401–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724574>
132. Canal C, Weber M, Cibulski S, da Silva M, Puhl D, Stalder H, et al. A Novel Genetic Group of Bovine Hepacivirus in Archival Serum Samples from Brazilian Cattle. *Biomed Res Int*. 2017 Aug 20;2017:1–4.
 133. Deng Y, Guan SH, Wang S, Hao G, Rasmussen TB. The Detection and Phylogenetic Analysis of Bovine Hepacivirus in China. Pérez LJ, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018:6216853. Available from:
<https://doi.org/10.1155/2018/6216853>
 134. Lu G, Jia K, Ping X, Huang J, Luo A, Wu P, et al. Novel bovine hepacivirus in dairy cattle, China. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2020 Feb 28];7(1):1–3. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0055-8>
 135. Lu G, Ou J, Zhao J, Li S. Presence of a Novel Subtype of Bovine Hepacivirus in China and Expanded Classification of Bovine Hepacivirus Strains Worldwide into 7 Subtypes. *Viruses*. 2019 Sep 11;11(9).
 136. Sadeghi M, Kapusinszky B, Yugo DM, Phan TG, Deng X, Kanevsky I, et al. Virome of US bovine calf serum. *Biologicals* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Feb 28];46:64–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100412>
 137. da Silva MS, Junqueira DM, Baumbach LF, Cibulski SP, Mósena ACS, Weber MN, et al. Comprehensive evolutionary and phylogenetic analysis of Hepacivirus N (HNV). *J Gen Virol*. 2018 Jul 1;99(7):890–6.
 138. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology* [Internet]. 2009 Apr [cited 2020 Feb 29];49(4):1335–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.22759>
 139. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 123 p. Available from:
https://qualitr.paginas.ufsc.br/files/2018/08/manual_tecnico_hepatites_08_2018_web.pdf
 140. Germer JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications [Internet]. Vol. 76, *Mayo Clinic Proceedings*. 2001 [cited 2020 Feb 29]. p. 911–20. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619611621113>
141. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol*. 2007 May 7;13(17):2461–6.
 142. Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, et al. Evaluation of versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2020 Sep 20];46(6):1901–6. Available from: <https://jcm.asm.org/content/46/6/1901>
 143. Informativos Epidemiológicos – Hepatites Virais – Secretaria de Saúde do Distrito Federal [Internet]. [cited 2020 Mar 30]. Available from: <http://www.saude.df.gov.br/informativos-epidemiologicos-hepatites-virais/>
 144. Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2007 Dec [cited 2019 Jul 14];7(4):467–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18020965>
 145. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* [Internet]. 2008 [cited 2020 Aug 4];7(3):861–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18949705/>
 146. Lopes N, Nozawa C, Elisa R, Linhares C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil Características generales y epidemiología de los arbovirus emergentes en Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 29];5(3):55–64. Available from: <http://revista.iec.pa.gov.br>
 147. Pauvolid-Corrêa A, Solberg O, Couto-Lima D, Kenney J, Serra-Freire N, Brault A, et al. Nhumirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Arch Virol* [Internet]. 2015 Jan 25 [cited 2020 Jun 24];160(1):21–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-014-2219-8>
 148. Pauvolid-Corrêa A, Gonçalves Dias H, Marina Siqueira Maia L, Porfírio G, Oliveira Morgado T, Sabino-Santos G, et al. Zika Virus Surveillance at the Human–Animal Interface in West-Central Brazil, 2017–2018. *Viruses* [Internet].

- 2019 Dec 16 [cited 2020 Aug 4];11(12):1164. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/12/1164>
149. Moreira-Soto A, Carneiro I de O, Fischer C, Feldmann M, Kümmerer BM, Silva NS, et al. Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil. *mSphere* [Internet]. 2018 Jan 31 [cited 2020 Jun 30];3(1). Available from: </pmc/articles/PMC5793042/?report=abstract>
 150. Komar N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. New York Academy of Sciences; 2001 [cited 2020 Aug 4]. p. 58–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02685.x>
 151. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro F de P, Pissinatti A, Cunha RV da, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation [Internet]. Vol. 113, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. NLM (Medline); 2018 [cited 2020 Nov 22]. p. e180278. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao/situacao-epidemiologica-dados>
 152. Ministério da Saúde [Internet]. [cited 2020 Nov 22]. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-43---Atualiza----o-em-31maio2017.pdf>
 153. Lyons S, Kapoor A, Sharp C, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, et al. Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 Dec [cited 2020 Aug 4];18(12):1976–82. Available from: </pmc/articles/PMC3557883/?report=abstract>
 154. Schlottau K, Fereidouni S, Beer M, Hoffmann B. Molecular identification and characterization of nonprimate hepaciviruses in equines. *Arch Virol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2020 Aug 4];164(2):391–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30361815/>
 155. Baechlein C, Baron AL, Meyer D, Gorriz-Martin L, Pfankuche VM, Baumgärtner W, et al. Further characterization of bovine hepacivirus: Antibody response, course of infection, and host tropism. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2020 Aug 4];66(1):195–206. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.12999>
 156. Walter S, Rasche A, Moreira-Soto A, Pfaender S, Bletsa M, Corman VM, et al. Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine

Hepaciviruses in Donkeys. J Virol [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Aug 4];91(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27795428/>

10 APÊNDICES E/OU ANEXOS

10.1 Anexo 1

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UnB)


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 12 de abril de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “DETECÇÃO DE VÍRUS ZIKA EM SUÍNOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL POR MÉTODOS IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES.”, Protocolo n.º 18/2018, sob responsabilidade da Professora Simone Perecmanis foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Sus scrofa domesticus* (1793). A presente aprovação é válida pelo período de: 10/07/2018 a 29/02/2020.




Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UnB)


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 17 de dezembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEPACIVÍRUS E FLAVIVÍRUS EM SUÍNOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL**", Protocolo n.º 111/2019, sob responsabilidade da Profa. Dra. Simone Perecmanis, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Sus scrofa domesticus* (28 animais). A presente aprovação é válida pelo período de 01/01/2020 a 29/02/2020.


Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA - UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

10.3 Anexo 3

Animais utilizados no estudo identificados por sexo, idade em meses e local de nascimento

Identificação	Sexo	Idade em Meses	Nascido na Propriedade
DF001	F	8	Sim
DF002	M	18	Sim
DF003	F	36	Sim
DF004	F	18	Sim
DF005	F	24	Sim
DF006	F	12	Sim
DF007	M	10	Sim
DF008	M	9	Sim
DF009	M	9	Sim
DF010	M	8	Sim
DF011	F	24	Sim
DF012	M	8	Sim
DF013	M	8	Sim
DF014	F	12	Sim
DF015	F	16	Sim
DF016	F	13	Sim
DF017	M	8	Sim
DF018	M	8	Sim
DF019	F	10	Sim
DF020	M	8	Sim
DF021	F	9	Sim
DF022	M	8	Sim
DF023	M	8	Sim
DF024	F	10	Sim
DF025	F	13	Sim
DF026	F	11	Sim
DF027	F	36	Sim
DF028	M	14	Sim
DF029	M	24	Sim
DF030	M	18	Sim
DF031	F	10	Sim
DF032	F	30	Sim
DF033	F	12	Sim
DF034	M	18	Sim
DF035	M	8	Sim
DF036	F	8	Sim
DF037	M	24	Sim
DF038	M	8	Sim
DF039	M	10	Sim

DF040	F	15	Sim
DF041	M	8	Sim
DF042	F	10	Sim
DF043	M	8	Sim
DF044	M	8	Sim
DF045	M	8	Sim
DF046	M	8	Sim
DF047	M	8	Sim
DF048	F	8	Sim
DF049	F	18	Sim
DF050	M	13	Sim
DF051	M	8	Sim
DF052	F	18	Sim
DF053	F	13	Sim
DF054	M	10	Sim
DF055	M	8	Sim
DF056	F	18	Sim
DF057	M	8	Sim
DF058	F	48	Sim
DF059	M	12	Sim
DF060	F	10	Sim
DF061	F	11	Sim
DF062	F	14	Sim
DF063	F	12	Sim
DF064	M	8	Sim
DF065	F	10	Sim
DF066	F	10	Sim
DF067	F	10	Sim
DF068	M	12	Sim
DF069	F	24	Sim
DF070	F	8	Sim
DF071	F	9	Sim
DF072	M	14	Sim
DF073	F	14	Sim
DF074	M	8	Sim
DF075	M	12	Sim
DF076	F	8	Sim
DF077	F	60	Sim
DF078	F	18	Sim
DF079	F	60	Sim
DF080	M	18	Sim
DF081	F	8	Sim
DF082	F	12	Sim
DF083	F	12	Sim
DF084	F	11	Sim

DF085	F	12	Sim
DF086	F	24	Sim
DF087	F	8	Sim
DF088	F	36	Sim
DF089	M	8	Sim
DF090	F	9	Sim
DF091	F	12	Sim
DF092	M	8	Sim
DF093	F	15	Sim
DF094	F	18	Sim
DF095	M	9	Sim
DF096	M	10	Sim
DF097	F	14	Sim
DF098	M	10	Sim
DF099	F	8	Sim
DF100	F	8	Sim
DF101	M	8	Sim
DF102	M	8	Sim
DF103	M	10	Sim
DF104	F	12	Sim
DF105	M	10	Sim
DF106	F	8	Sim
DF107	M	8	Sim
DF108	F	8	Sim
DF109	F	8	Sim
DF110	M	10	Sim
DF111	M	12	Sim
DF112	M	10	Sim
DF113	M	10	Sim
DF114	M	8	Sim
DF115	F	8	Sim
DF116	M	12	Sim
DF117	F	18	Sim
DF118	M	12	Sim
DF119	M	12	Sim
DF120	F	12	Sim
DF121	M	8	Sim
DF122	F	12	Sim
DF123	F	12	Sim
DF124	F	8	Sim
DF125	M	12	Sim
DF126	F	8	Sim
DF127	M	8	Sim
DF128	F	8	Sim
DF129	M	8	Sim

DF130	M	10	Sim
DF131	M	10	Sim
DF132	F	8	Sim
DF133	F	10	Sim
DF134	F	10	Sim
DF135	F	12	Sim
DF136	M	12	Sim
DF137	F	9	Sim
DF138	F	12	Sim
DF139	F	12	Sim
DF140	F	12	Sim
DF141	M	36	Sim
DF142	F	9	Sim
DF143	M	12	Sim
DF144	M	18	Sim
DF145	F	10	Sim
DF146	F	24	Sim
DF147	M	12	Sim
DF148	M	9	Sim
DF149	M	18	Sim
DF150	M	10	Sim
DF151	M	12	Sim
DF152	M	24	Sim
DF153	F	36	Sim
DF154	F	12	Sim
DF155	F	24	Sim
DF156	F	30	Sim
DF157	F	18	Sim
DF158	M	10	Sim
DF159	F	25	Sim
DF160	F	12	Sim
DF161	F	12	Sim
DF162	F	12	Sim
DF163	F	10	Sim
DF164	M	36	Sim
DF165	F	12	Sim
DF166	M	12	Sim
DF167	F	8	Sim
DF168	F	12	Sim
DF169	M	9	Sim
DF170	F	12	Sim
DF171	M	16	Sim
DF172	M	12	Sim
DF173	M	9	Sim
DF174	F	12	Sim

DF175	F	20	Sim
DF176	F	10	Sim
DF177	F	12	Sim
DF178	F	36	Sim
DF179	F	12	Sim
DF180	M	18	Sim
DF181	F	18	Sim
DF182	F	18	Sim
DF183	F	12	Sim
DF184	F	18	Sim
DF185	M	9	Sim
DF186	F	36	Sim
DF187	F	12	Sim
DF188	M	9	Sim
DF189	M	18	Sim
DF190	F	12	Sim
DF191	M	9	Sim
DF192	M	9	Sim
DF193	F	12	Sim
DF194	F	12	Sim
DF195	F	15	Sim
DF196	F	12	Sim
DF197	F	12	Sim
DF198	M	18	Sim
DF199	M	9	Sim
DF200	F	12	Sim
DF201	F	18	Sim
DF202	F	12	Sim
DF203	M	9	Sim
DF204	F	12	Sim
DF205	F	12	Sim
DF206	F	7	Sim
DF207	F	10	Sim
DF208	M	14	Sim
DF209	F	11	Sim
DF210	F	12	Sim
DF211	M	8	Sim
DF212	F	10	Sim
DF213	F	24	Sim
DF214	M	8	Sim
DF215	F	24	Sim
DF216	F	12	Sim
DF217	F	18	Sim
DF218	M	8	Sim
DF219	F	7	Sim

DF220	M	9	Sim
DF221	M	24	Sim
DF222	F	7	Sim
DF223	F	22	Sim
DF224	F	18	Sim
DF225	F	10	Sim
DF226	M	8	Sim
DF227	M	7	Sim
DF228	M	12	Sim
DF229	M	12	Sim
DF230	F	18	Sim
DF231	M	10	Sim
DF232	F	24	Sim
DF233	M	12	Sim
DF234	M	8	Sim
DF235	F	18	Sim
DF236	M	12	Sim
DF237	F	7	Sim
DF238	F	12	Sim
DF239	M	10	Sim
DF240	M	8	Sim
DF241	F	8	Sim
DF242	F	9	Sim
DF243	F	8	Sim
DF244	F	18	Sim
DF245	F	7	Sim
DF246	F	6	Sim
DF247	M	9	Sim
DF248	F	12	Sim
DF249	F	14	Sim
DF250	M	14	Sim
DF251	F	8	Sim
DF252	M	6	Sim
DF253	M	8	Sim
DF254	M	8	Sim
DF255	M	11	Sim
DF256	F	10	Sim
DF257	M	18	Sim
DF258	M	8	Sim
DF259	M	18	Sim
DF260	F	28	Sim
DF261	F	10	Sim
DF262	M	10	Sim
DF263	M	8	Sim
DF264	F	30	Sim

DF265	F	9	Sim
DF266	M	9	Sim
DF267	M	8	Sim
DF268	F	8	Sim
DF269	F	8	Sim
DF270	F	12	Sim
DF271	F	16	Sim
DF272	F	12	Sim
DF273	F	12	Sim
DF274	M	60	Sim
DF275	F	18	Sim
DF276	M	8	Sim
DF277	F	9	Sim
DF278	F	9	Sim
DF279	F	8	Sim
DF280	F	8	Sim
DF281	F	24	Sim
DF282	F	8	Sim
DF283	F	10	Sim
DF284	M	10	Sim
DF285	F	10	Sim
DF286	F	24	Sim
DF287	M	9	Sim
DF288	F	9	Sim
DF289	F	9	Sim
DF290	F	13	Sim
DF291	F	10	Sim
DF292	F	10	Sim
DF293	M	16	Sim
DF294	F	12	Sim
DF295	F	9	Sim
DF296	F	8	Sim
DF297	M	9	Sim
DF298	F	10	Sim
DF299	F	12	Sim
DF300	F	8	Sim
DF301	F	18	Sim
DF302	F	16	Sim
DF303	F	25	Sim
DF304	F	24	Sim
DF305	M	13	Sim
DF306	F	12	Sim
DF307	F	18	Sim
DF308	M	8	Sim
DF309	F	8	Sim

DF310	F	16	Sim
DF311	M	14	Sim
DF312	F	18	Sim
DF313	F	20	Sim
DF314	F	14	Sim
DF315	M	12	Sim
DF316	F	18	Sim
DF317	F	13	Sim
DF318	F	12	Sim