

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Aila Solimar Gonçalves Silva

**Deteccção das encefalites virais zoonóticas com ênfase no vírus do Nilo Ocidental
(WNV) em equídeos no Brasil**

Belo Horizonte

2021

Aila Solimar Gonçalves Silva

Deteção das encefalites virais zoonóticas com ênfase no vírus do Nilo Ocidental (WNV) em equídeos no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Érica Azevedo Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte

2021

S586d Silva, Aila Solimar Goncalves, 1987 -
Detecção das encefalites virais zoonóticas com ênfase no vírus do Nilo Ocidental (WNV) em equídeos no Brasil/ Aila Solimar Goncalves Silva. -2021.

177 f.:il

Orientadora: Érica Azevedo Costa

Coorientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Bibliografias: f. 71 a 81; f. 112 a 117; f. 142 a 145; f. 153 a 155 e f. 169 a 172.

Anexos: f: 175 a 177.

1. Equino – Doenças - Teses - 2. Vírus do herpes em animais - Teses - 3. Ciência animal - Teses - I. Costa, Érica Azevedo – II. Martins, Nelson Rodrigo da Silva - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636 089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

AILA SOLIMAR GONÇALVES SILVA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 08 de junho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Érica Azevedo Costa
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins

Dr.(a). Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira Santos

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Dr.(a). Lilian Silva Catenacci

Dr.(a). Bruno Divino Rocha



Documento assinado eletronicamente por Erica Azevedo Costa, Professora do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira Santos, Professora do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 14:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Membro de comitê, em 08/06/2021, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Bruno Divino Rocha, Usuário Externo, em 14/06/2021, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior, em 14/06/2021, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Lilian Silva Catenacci, Usuário Externo, em 15/06/2021, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0745112 e o código CRC 85833D23.

Aos meus pais por toda dedicação

Ao meu Guilherme, pela amizade, amor e apoio incondicional.

“Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças a Deus por estar trabalhando, embora lentamente, por dentro de mim próprio, para chegar, um dia, a ser o que devo ser”

Francisco Cândido Xavier

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade de uma existência cercada de muito amor e carinho. O doutorado não foi fácil, mas chegamos até aqui.

Aos meus pais, Tânia e Vilson, por nunca desistirem. Obrigado por serem incansáveis na minha evolução moral e intelectual. Sem vocês, nada seria possível.

Aos meus irmãos Sheila, Alcione e Junior pelas boas risadas, paciência e cuidados.

Ao meu namorado Guilherme por todo amor, amizade e carinho nos momentos mais difíceis. Obrigada por nunca soltar a minha mão.

As minhas queridas amigas Aninha, Lu, Mel e Joy pelas doces palavras me encorajando a seguir em frente. Aos amigos Filipe e Carlos pelo carinho de sempre.

Aos amigos Mario, Marcus e Jorge pelos ensinamentos, amoroso apoio e paciência.

Aos colegas que se tornaram amigos e verdadeiros confortos na pós-graduação: Thaís, Brendhal, Salene (Sasá), Mari (minha Mazama) e Marquinho.

As queridas Marcia e Fernanda pelo carinho e cuidados nesta última etapa.

Aos colegas e companheiros de pós-graduação Alê, Amanda, Carol, Rebeca, Bruna, Telissa, Thithi, Rafael, Aninha F., Diogo, Aninha Doyle, Gil e Jojo.

Ao meu grupo de orientação professora Érica Costa, professor Nelson Rodrigo e Izabelle Silva pela paciência.

A professora Érica pela orientação e incansável dedicação para que todo o trabalho fosse realizado. A trajetória não foi fácil, mas conseguimos chegar ao final.

Ao professor Nelson por todo conhecimento e gentileza. Agradeço os mais de 10 anos de caminhada no qual o senhor me proporcionou bons momentos que ficarão guardados para sempre.

Aos professores da graduação, professor Iran, professor Monteiro...e todos os outros que sempre me trataram com muito respeito e carinho. Ao professor Marc que sempre teve palavras de incentivo e carinho durante as nossas conversas na cantina.

Ao professor Jenner que gentilmente me proporcionou bons momentos com um simples bom dia todas as manhãs.

A equipe do LPVA muito obrigada pela paciência e ensinamentos.

Ao meu amado LabAves e toda sua equipe por proporcionarem meus melhores momentos na escola de veterinária.

Ao corpo técnico do departamento de preventiva: Ritinha, André, Grazi, Agda, Aninha, Liu...sem vocês o trabalho não seria possível!

As professoras da clínica de equinos (Raffaela e Renata) e toda equipe de residentes se empenharam na realização deste trabalho com muita paciência e gentileza.

Ao professor Felipe Pierezan e toda equipe de residentes (Sostenes, Luis, Carlos Eduardo) e alunos (em especial a Deisy) do departamento de patologia da EV-UFMG meus agradecimentos pela paciência, gentileza e dedicação.

As faxineiras da EV-UFMG pelo carinho e empenho durante todo o meu trabalho!

Aos professores João Cunha e Rafael por toda paciência e ajuda neste último momento do trabalho.

A querida Eunice Botelho pelo incansável apoio neste final na luta contra o desânimo e a depressão.

A querida professora Tânia Raso por acreditar quando ninguém mais acreditava.

Aqueles que buscaram este trabalho para leitura, meus agradecimentos pelo reconhecimento.

Aos animais que participaram deste estudo e foram essenciais para que o trabalho fosse possível.

Resumo

As doenças neurológicas nos equídeos constituem importantes causas de óbitos nestes animais. Entre as diversas etiologias das afecções neurológicas o vírus do Nilo Ocidental (do inglês *West Nile virus-WNV*), se destaca como importante agente zoonótico responsável por graves epidemias em todo mundo. Este arbovírus (*arthropod borne virus*) está amplamente distribuído pelos continentes e mantém seu ciclo de transmissão através da relação entre mosquito vetor e aves reservatório/amplificadoras. Os equídeos, assim como o ser humano, são hospedeiros terminais não desenvolvendo viremia suficiente para transmissão ao vetor. Contudo, estes animais são considerados sentinelas, indicando a presença deste e de outros importantes arbovírus em uma região. A rápida expansão do WNV no continente americano, após sua entrada nos EUA em 1999, representou um desafio no diagnóstico deste vírus nos rebanhos equídeos. Evidências sorológicas indicam a presença do WNV no Brasil desde 2009. O país possui hoje um dos maiores rebanhos equídeos do mundo, apresentando condições ideais, além do clima, presença dos vetores e espécies de aves susceptíveis, para a epidemiologia de WNV e de outras importantes arboviroses. No presente estudo, foi padronizada uma técnica de *nested* RT-PCR, utilizando primers específicos direcionados à parte da região NS5 do WNV, com a finalidade de aumentar a sensibilidade do teste de diagnóstico molecular e, a partir dessa padronização, investigou-se a etiologia de quadros neurológicos em quatro equídeos (dois equinos e dois asininos) que vieram a óbito com encefalomielite aguda no Estado do Espírito Santo. Obteve-se então a primeira identificação do RNA de WNV em território nacional (capítulo 2). Após, a partir da parceria com o órgão de defesa animal do Estado de Minas Gerais, Laboratório de Sanidade Animal (Instituto Mineiro de Agropecuária, LSA-IMA), foram realizados novos estudos em 76 amostras de sistema nervoso central de equídeos com síndrome neurológica, todas negativas para o vírus da raiva, objetivando o diagnóstico das principais encefalites equinas virais através de técnicas moleculares. O diagnóstico diferencial incluiu o Herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1- *equine herpesvirus type 1*); vírus do gênero Flavivirus, como WNV e Encefalite de Saint Louis (SLEV- *saint louis encephalitis virus*) e os vírus do gênero Alphavirus, como o vírus da encefalite equina do leste (EEEV- *eastern equine encephalitis virus*), o vírus da encefalite equina do oeste (WEEV- *western equine encephalitis virus*) e o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV- *venezuelan equine encephalitis virus*). As análises incluíram também histopatologia do SNC e de outros órgãos em 16 amostras. Os dados dos Formulários de Solicitação de Exame de Síndrome Neurológica enviados também foram avaliados quanto a parâmetros relacionados aos animais e as amostras. Como resultado, todas as amostras foram negativas para os flavivírus e alfavírus testados e 5% das amostras foram positivas para EHV-1. Contudo, foram constatadas diversas questões quanto à coleta, conservação e entrega ao laboratório, além da ausência de informações fundamentais, com apenas 43% dos formulários devidamente preenchidos (capítulo 3). Assim, com o objetivo de orientar e auxiliar os médicos veterinários quanto à adequada coleta e conservação de amostras de equídeos com síndrome neurológica, bem como na anamnese e exame clínico, orientações foram elaboradas para contribuir no diagnóstico das doenças neurológicas em equídeos (capítulo 5). Além disso, como estratégia alternativa no diagnóstico da infecção pelo WNV em equídeos, a investigação do vírus nas hemácias de um cavalo com síndrome neurológica resultou na detecção de um animal positivo na região sudeste do país (capítulo 4). Os resultados deste trabalho poderão auxiliar nas estratégias de diagnóstico das encefalites virais nos equídeos e na vigilância epidemiológica de WNV no Brasil, podendo ser valiosas no contexto da Saúde Única.

Palavras chaves: encefalites virais, equídeos, diagnóstico molecular, WNV

Abstract

Neurological diseases in equidae are important causes of death in these animals. Among the various etiologies of neurological disorders, the West Nile virus-WNV, stands out as an important zoonotic agent responsible for serious epidemics worldwide. This arbovirus (arthropod borne virus) is widely distributed across continents and maintains its transmission cycle through the relationship between vector mosquito and reservoir / amplifying birds. Equidae, like humans, are terminal hosts not developing enough viremia to transmit to the vector. However, these animals are considered sentinels, indicating the presence of this and other important arboviruses in a region. The rapid expansion of WNV in the American continent, after its entry into the USA in 1999, represented a technical challenge in the diagnosis of infection in equine herds. In Brazil, one of the largest equine herds in the world, serological evidence indicated the presence of WNV since 2009. The country has ideal climate conditions for WNV transmission, as well as other arboviruses, with presence of vectors and the potential avian reservoirs species. In the present study, a *nested* RT-PCR technique was standardized, using specific primers directed to the NS5 gene of the WNV. The new technique was standardized investigating four equids (two horses and two donkeys) who died with neurologic signs of acute encephalomyelitis in the state of Espírito Santo. The study resulted in the first identification of WNV RNA in Brazil (chapter 2). Afterwards, based on the partnership with the animal defense agency of the State of Minas Gerais, through the Animal Health Laboratory (Instituto Mineiro de Agropecuária, LSA-IMA), further studies were carried out with 76 CNS samples from equines with neurological syndrome, all shown negative for rabies, aiming at the diagnosis of the main viral equine encephalitis through molecular techniques. The differential diagnosis included equine herpesvirus type 1 (EHV-1); viruses of the genus Flavivirus, such as WNV and Saint Louis Encephalitis (SLEV) and viruses of the Alphavirus genus, such as the Eastern Equine Encephalitis Virus (EEEV), the West Equine Encephalitis Virus (WEEV) and the Equine Encephalitis Virus Venezuelan (VEEV). The analyzes also included histopathology of the CNS and other organs in 16 samples. The Neurological Syndrome Examination Request Forms data sent were also evaluated for parameters related to animals and samples. As a result, all samples were negative for the flaviviruses and alphaviruses tested and 5% of the samples were positive for EHV-1. However, several issues were noted concerning the collection, conservation and delivery to the laboratory, and the absence of key information, with only 43% of forms properly filled (chapter 3). Thus, with the objective of guiding and assisting veterinarians in the field regarding the adequate collection and conservation of samples from equines with neurological syndrome, as well as aspects such as anamnesis and clinical examination, guidelines were developed to contribute to the diagnosis of neurological diseases in equines (chapter 5). In addition, as an alternative strategy in the diagnosis of WNV infection in equidae, the investigation of the virus in the red blood cells of a horse with neurological syndrome resulted in the detection of a positive animal in the southeastern region of the country (chapter 4). The results of this work may assist in the diagnostic strategies for viral encephalitis in equines and in the epidemiological surveillance of WNV in Brazil, which can be valuable in the context of One Health

Keywords: viral encephalitis, equidae, molecular diagnosis, WNV

LISTA FIGURAS

Figura 1. Vírion envelopado, esférico, aproximadamente 50 nm em diâmetro. As glicoproteínas do envelope estão arranjadas em interligação, resultando em simetria semelhante à icosaédrica.	25
Figura 2. Os vírions se ligam à superfície de uma célula hospedeira e, subsequentemente, entram na célula por endocitose mediada por receptor (1, 2). A acidificação da vesícula endossômica desencadeia mudanças conformacionais no vírion, fusão das membranas viral e celular e consequente desmontagem das partículas (3). Uma vez que o genoma é liberado no citoplasma, o RNA de sentido positivo é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e do hospedeiro. A cópia do genoma ocorre no citoplasma (4, 5, 6 e 7). A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático rugoso (ER) quando as proteínas estruturais e o RNA recém-sintetizado brotam no lúmen do ER (8). As partículas virais imaturas resultantes são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN). As partículas imaturas do vírion são clivadas por proteases resultando em partículas infecciosas maduras (9). Vírions maduros são subsequentemente liberados por exocitose (10). (Adaptado de SUTHAR et al., 2013)	28
Figura 3. Distribuição do complexo <i>Culex pipiens</i> no mundo. Azul: <i>Cx. p. pipiens</i> ; Verde: <i>Cx. p. pipiens</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> híbrido; Amarelo <i>Cx. quinquefasciatus</i> ; Cinza: <i>Cx. p. pallens</i> ; Laranja: <i>Cx. quinquefasciatus</i> e <i>Cx. p. pallens</i> híbridos; Faixas vermelhas sobrepostas (região da Austrália): <i>Cx. globocoxitus</i> ; Vermelho com pontos amarelos (região da Austrália): <i>Cx. australicus</i> . (Adaptado de CIOTA; KRAMER, 2013).....	37
Figura 4. Identificação de WNV em equídeos no mundo. Verde: identificação por sorologia e/ou RNA viral. Cinza: áreas ainda sem identificação de WNV (Baseado em publicações de artigos, notificação OIE, PROMED e Boletim anual da ECDC).	45
Figura 5. Situação epidemiológica de WNV no Brasil de janeiro de 2014 a junho de 2019 (Fonte: “Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental no Brasil, 2014 a 2019”; informe nº 1; Julho de 2019, Secretária de Vigilância em Saúde; BRASIL, 2019).....	68
Figura 6. Dispersão do WNV no Brasil. Estão representados a detecção do vírus (detecção sorológica e/ou viral), estado e ano de amostragem. Os estados são indicados por cores diferentes de acordo com a espécie hospedeira diagnosticada, equídeos (marrom), humanos (rosa), aves (estrela amarela) e sem detecção (verde). As setas vermelhas indicam a possível rota de disseminação do WNV no Brasil. (Adaptado de BAYEUX et al., 2019).....	70
Figura 7. Áreas de ocorrência dos casos neurológicos em equídeos no Espírito Santo, Brasil. O mapa ampliado mostra as quatro cidades com casos relatados. Os círculos brancos indicam a localização das fazendas de onde foi confirmada a infecção por WNV associada à encefalite equídea. A localização geográfica das fazendas com infecção pelo WNV confirmada é: NV 01/18 (18.6883713 S; 40.4082043 W); NV 40/18 (18,702494 S; 40,329336 W); BG 42/18 e BG 43/18 (19.3993 S; 40.9167 W).....	86
Figura 8. Localização da Reserva Biológica de Sooretama no Estado do Espírito Santo (ES). Os municípios do estudo estão sinalizados com símbolo vermelho (Fonte: Google maps)	86
Figura 9. A. Animal BG43/18 em decúbito lateral. B. Animal BG42/18 apresentando prostração e relutância em caminhar	88
Figura 10. Fluxograma apresentando esquema de escolha dos primers.....	90
Figura 11. Resultado do teste de padronização da Ta °C do primer. Seta branca vertical: indicando a melhor temperatura (56 °C). C-: controle negativo; Ladder 100 pb DNA RTU, KASVI.....	93

Figura 12. Árvore filogenética gerada a partir de sequências de nucleotídeos de WNV de diferentes países e construída com o método de máxima verossimilhança usando o software IQ-TREE 2.0, com seleção automática de modelo de substituição de nucleotídeos. Para a avaliação do suporte dos ramos, foram realizadas 1000 repetições de bootstrap sendo que na figura estão representados apenas os valores maiores ou igual a 80. As sequências deste estudo estão representadas em negrito. Os respectivos hospedeiros e continentes das sequências utilizadas estão apresentados na árvore de acordo com a legenda (canto esquerdo). A linhagem ao qual a sequência pertence está representada nos ramos iniciais.	100
Figura 13. Tronco encefálico - manguito linfocítico e histiocítico (seta) e infiltração de linfócitos, neutrófilos (asterisco na figura de inserção - 400 ×) e células gliais proliferadas no neurópilo adjacente (cabeça de seta)	101
Figura 14. Resultado no cultivo celular da amostra NV01/18 em vero. A. Cultivo celular vero sem inoculação (controle negativo) 7 dias após inoculação (coloração May-Grunwald-Giemsa) aumento de 200x; B. Cultivo de vero 7 dias após inoculação (NV01/18) evidenciando ampla destruição da camada (coloração May-Grunwald-Giemsa) aumento de 100x; C e D. Cultivo 6 dias após inoculação do material NV01/18 com mudança de morfologia das células (ponta de seta preta em C) e vacúolos no citoplasma das células (ponta seta preta D) (coloração May-Grunwald-Giemsa) aumento de 40x. E e F. Cultivo de vero 7 dias após inoculação do material NV01/18 com destruição da camada celular (E) e mudança de morfologia das células (ponta de seta preta em F) (coloração Cristal Violeta) aumento de 200x e 40x.	103
Figura 15. Resultado da IFA. A. Controle negativo (100x). B. Cultivo amostra sem diluir (100x). C. Cultivo amostra sem diluir (200x). D. Cultivo amostra diluída 1:10 (200x). E. Cultivo amostra sem diluir (100x) F. Cultivo amostra sem diluir (200x).	104
Figura 16. Mapa de Minas Gerais e a quantidade de amostras enviadas por Mesorregião.	128
Figura 17. Número de equídeos avaliados por faixa etária.	129
Figura 18. Distribuição temporal do óbito dos equídeos avaliados em relação aos meses do ano.	130
Figura 19. Gráfico representativo dos fragmentos de tecidos do SNC dos equídeos avaliados enviados com e sem medula	132
Figura 20. Resultados da avaliação histopatológica. A. Infiltrado linfoplasmocitário (marginação leucocitária – seta preta) moderado nas meninges sobre o córtex telencefálico (amostra UFMG 13). B. Infiltrado inflamatório linfo-histoplasmocitário perivascular acentuado (seta preta) em um vaso sanguíneo da substância cinzenta da medula espinhal (amostra UFMG 13) C; D. Infiltrado inflamatório linfo-histoplasmocitário acentuado (seta preta) ao redor de um vaso sanguíneo da substância cinzenta da medula espinhal (amostra UFMG 13). E. Infiltrado inflamatório linfocitário discreto (seta preta) ao redor de vasos sanguíneos da substancia cinzenta do córtex telencefálico (amostra UFMG 6). F. Infiltrado inflamatório linfocitário discreto (seta preta) ao redor de vasos sanguíneos da substancia cinzenta do córtex telencefálico (amostra UFMG 16).	134
Figura 21. Gel de agarose 1% demonstrando resultado da 2ª reação da nested-RT-PCR específica para WNV. Ladder 100 pb, Kasvi. C+ controle positivo; C- controle negativo; P plasma; H hemácias; L leucócitos	151
Figura 22. Estados brasileiros onde a presença de WNV foi reportada, por sorologia ou RT-PCR, em aves, equídeos e/ou humanos. Região Centro-Oeste (MT- Mato Grosso; MS- Mato Grosso do Sul); Região Sudeste (ES – Espírito Santo; Minas Gerais – MG; SP- São Paulo); Região Nordeste (CE – Ceará; PB – Paraíba; PI – Piauí).	158

Figura 23. Ciclo de transmissão do vírus de West Nile	159
Figura 24. Passo a passo das etapas de coleta, acomodação e envio das amostras para o laboratório e procedimento após a necropsia. Fonte: Fotos 1, 3 e 5 - Manual Pan Americano de coleta - Mapa/OPAS, 2010; Foto 2 – imagem cedida pelo veterinário Marcos Antônio Correia Rodrigues da Cunha; Foto 4 - Manual Técnico de Controle de raiva dos Herbívoros – MAPA, 2009.	169

LISTA TABELA

Tabela 1– Identificação dos animais avaliados no estudo	87
Tabela 2- Primers utilizados no estudo.....	91
Tabela 3- Condições de temperatura e ciclagem testadas na nested PCR para WNV ...	93
Tabela 4- Parâmetros avaliados nos formulários.....	122
Tabela 5 - Informações das amostras enviadas para avaliação histopatológica	126
Tabela 6- Quantidade de amostras encaminhadas por mesorregião de Minas Gerais..	127
Tabela 7- Raça dos equinos com amostras coletadas e enviadas para diagnóstico	129
Tabela 8- Vacinas registradas e número de equídeos avaliados vacinados.....	130
Tabela 9. Modo de conservação das amostras encaminhadas para diagnóstico inicial de raiva.	131
Tabela 10– Testes diagnósticos aplicados para amostras coletadas de equídeos antes e após o óbito.....	161
Tabela 11. Sequências avaliadas para escolha dos primers utilizados no estudo.....	175

LISTA ABREVIATURAS

CDC: Centers for Disease Control and Prevention,
CE: Ceará
CHIKV: Chikungunya Virus
DEET: dietil-meta-toluamida
DENV: Dengue Virus
DNA Ácido desoxirribonucleico
ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control
ECP: Efeito Citopático
EEEV: Eastern Equine Encephalitis Virus
EHV-1: Equine Herpesvirus type 1
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ES: Espírito Santo
EUA: Estados Unidos da América
FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FORM SN: Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica
HI: Inibição da Hemoaglutinação
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia
ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IFA: Imunofluorescência
IFD: Imunofluorescência direta
IgA: Imunoglobulina A
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IHQ: Imunohistoquímica
IMA: Instituto Mineiro de Agropecuária
IN: Instrução Normativa
INF: Interferon
IU: Unidade Internacional
LACEN: Laboratório Central
LCR: líquido cefalorraquidiano
LFDA: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
LPVA: Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal
LSA-IMA - Laboratório de Saúde Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária
MAC-ELISA: IgM antibody capture *Enzyme-linked immunosorbent assay*
MAFFT: Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
MAPA: Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDBK: *Madin-Darby Bovine Kidney*
MEM: Meio Essencial Mínimo
MG: Minas Gerais
MgCl₂ Cloreto de Magnésio
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
ml: Mililitro
MP-NAT: Mini pools *Nucleic Acid Testing*
MS: Mato Grosso do Sul
MT: Mato Grosso;

NAT: *Nucleic Acid Testing*
nested PCR; nPCR: *nested* transcription polymerase chain reaction
nested RT-PCR; nRT-PCR: *nested* Reverse transcription polymerase chain reaction
OIE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL
p/v: peso/volume
PB: Paraíba
PBS: Tampão fosfato-salino
PCR: transcription polymerase chain reaction
PI: Piauí
PNCERH: Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras encefalopatias
PRNT: *plaque reduction neutralization test*
PROMED: Program for Monitoring Emerging Diseases
RABV: *Rabies virus*
RNA Ácido ribonucleico
RT-nPCR
RT-PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase precedida da Transcrição Reversa
SFB: Soro Fetal bovino
SINDAN: Sindicato Nacional de Produtos para Saúde Animal
SLEV: Saint Louis Encephalitis virus
SNC: Sistema Nervoso Central
SP: São Paulo
SRD: Sem Raça Definida
SVO: Serviço Veterinário Oficial
TBE: Tris-borato-EDTA
TCID₅₀: *tissue culture infective dose 50%*
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
VEEV: Venezuelan Equine Encephalitis Virus
VERO: *African Green Monkey*
WEEV: Western Equine Encephalitis Virus
WNV: West Nile Virus
YFV: *Yellow Fever Virus*
ZIKV: Zika Virus
µg: Micrograma
µL: Microlitros

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	15
1.Introdução geral.....	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos.....	22
3. Capítulo 1. Vírus do Nilo Ocidental (<i>West Nile virus</i> – WNV): revisão de literatura	23
3.1.-Classificação.....	23
3.2 - Estrutura do vírus e ciclo celular.....	25
3.3 - Patogenia.....	29
3.4 - Epidemiologia de WNV.....	34
3.4.1 Transmissão.....	35
3.4.2. Vetores.....	36
3.4.3 Aves.....	39
3.4.4 Mamíferos: homem e equídeo.....	41
3.4.5 Outros hospedeiros.....	42
3.5 - Infecção por WNV nos equídeos.....	42
3.5.1. Relação histórica – 61 anos de WNV nos rebanhos equídeos.....	42
3.5.2 Infecção experimental – Definição do papel dos equídeos no ciclo epidemiológico de WNV.....	46
3.5.3. Características da infecção de WNV nos equídeos.....	47
3.5.4 - A relação de WNV com asininos e muares.....	49
3.5.5. Sinais clínicos.....	50
3.5.6 Diagnóstico de WNV nos equídeos.....	53
3.5.5.1 Desafios do diagnóstico.....	62
3.6 - Controle e prevenção.....	63
3.7 Vigilância e identificação de WNV – Brasil.....	67
3.8 Referências.....	71
4. Capítulo 2 – Vírus de <i>West Nile</i> (WNV) associado a encefalite em equídeos no Brasil.....	82
4.1. Introdução.....	82
4.2. Material e métodos.....	84

4.2.1. Descrição do surto e localização	84
4.2.2. Descrição dos casos clínicos: animais encaminhados para diagnóstico	86
4.2.3 – Extração do ácido nucleico viral (DNA e RNA).....	88
4.2.4 – <i>Primers</i> utilizados no estudo	89
4.2.5 - Desenho e padronização do <i>primer</i> para WNV	92
4.2.6 – Reação de PCR para Herpes vírus equino 1 (EHV1).....	93
4.2.7– Reação de RT-PCR para <i>Alphavirus</i>	94
4.2.8 - Reação de RT-PCR para <i>Flavivirus</i>	95
4.2.9 - Análise dos produtos da RT-PCR e PCR.....	96
4.2.10 - Sequenciamento	96
4.2.11 - Análise filogenética	96
4.2.12 - Avaliação histopatológica.....	97
4.2.13- Inoculação em cultivo celular	97
4.2.14 – Imunofluorescência (IFA).....	98
4.2.15- Titulação viral	99
4.3. Resultados.....	99
4.3.1 - PCR.....	99
4.3.2 – Análise das sequências	99
4.3.3 - Avaliação na necropsia e histopatológica.....	101
4.3.4 - Isolamento em cultivo celular	101
4.4. Discussão	105
4. 5. Conclusões	111
4.6 Referências.....	112
5. Capítulo 3 – Avaliação do perfil epidemiológico das amostras de sistema nervoso central de equídeos com síndrome neurológica.....	118
5.1. Introdução	118
5.2 Material e métodos.....	121
5.2.1 Amostragem	121
5.2.2 Levantamento de dados	121
5.2.3 Análise dos dados coletados.....	122
5.2.4. Extração do ácido nucleico viral (DNA e RNA).....	122
5.2.5 Reação <i>nested</i> PCR – Herpes vírus equino tipo 1 (EHV-1).....	123
5.2.6 Reação <i>nested</i> RT-PCR – <i>Alphavirus</i>	124

5.2.7 Reação <i>nested</i> RT-PCR – <i>Flavivirus</i>	124
5.2.8 Análise dos produtos da RT-PCR e PCR	125
5.2.9 Histopatologia	125
5.3. Resultados	126
5.3.1 Parâmetros avaliados dos animais	127
5.3.2 Parâmetros avaliados nas amostras enviadas	131
5.3.3 Resultados diagnóstico molecular	133
5.3.4 Resultados da avaliação histopatológica	133
5.4. Discussão	135
5.5 Conclusões	142
5.6 Referência	142
6. Capítulo 4 - Detecção do vírus de <i>West Nile</i> (WNV) em hemácias de equino no Brasil	146
6.1. Introdução	146
6.2. Material e métodos	148
6.2.1. Descrição do caso clínico	148
6.2.2. Processamento do material e extração do DNA/RNA	149
6.2.3 - Reação de <i>nested</i> PCR para EHV-1	149
6.2.4 – Reação <i>nested</i> RT-PCR para WNV	150
6.2.5. Sequenciamento e análise das sequências	150
6.3. Resultados e discussão	151
6.4. Conclusões	153
6.5 Referências	153
7. Vírus de <i>West Nile</i> (WNV) em equídeos no Brasil: um novo desafio para os médicos veterinários	156
7.1- Introdução	156
7.2- WNV no Brasil	157
7.3- Etiologia e o ciclo de transmissão de WNV	158
7.4- Ocorrência da WNV nos equídeos	159
7.5- Diagnóstico de WNV	160
7.5.1. Coleta de material	162
7.5.2. Como enviar o material para o laboratório?	163
7.5.3. Destinação de carcaças e resíduos	165

7.6 - Controle de WNV – Importância do médico veterinário	166
7.7- Considerações finais	168
7.8 Referências.....	169
8.Considerações finais	173
9. Trabalhos e publicações.....	174
ANEXO 1	175

1.Introdução geral

Os equídeos (equinos, asininos e muares) possuem importante papel na história da humanidade, com relevante contribuição no crescimento e surgimento de muitas civilizações. Estes animais estão incluídos em diversas atividades desde o transporte de cargas, lazer, locomoção, produção de antitoxinas, atividades agrícolas e/ou agropecuárias, entre outras ocupações que auxilia o homem no seu trabalho. (CARNEIRO *et al.*, 2018; MAPA, 2016).

O contingente populacional destes animais no Brasil é bastante expressivo. Atualmente, o país possui o 4º maior rebanho mundial de equinos que ultrapassa 5 milhões de cabeças, sendo esse efetivo concentrado principalmente na região sudeste. Em relação aos rebanhos de asininos e muares, o Brasil ocupa a 5ª posição mundial, com mais de 1 milhão de cabeças sendo o maior rebanho destes animais na América do Sul (CARNEIRO *et al.*, 2018; IBGE, 2020).

Nos equídeos, as doenças neurológicas são enfermidades quase sempre fatais e responsáveis por grande parte dos óbitos (CHAPMAN *et al.*, 2017; KUMAR; PATIL, 2017; RECH; BARROS, 2015; OLADUNNI *et al.*, 2019). Embora muitos dados sobre os aspectos sanitários do rebanho equídeo brasileiro sejam desconhecidos, as encefalites constituem importante causa de óbito destes animais no país (BRASIL, 1988; COSTA *et al.*, 2015a; CUNHA *et al.*, 2016; PIMENTEL *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011;)

Diferentes condições podem estar associadas às afecções do SNC dos equídeos como, por exemplo, traumas, neoplasias, agentes infecciosos de origem viral, parasitária, bacteriana, micotoxinas, intoxicação, encefalopatia hepática, entre outras etiologias (FURR; REED, 2008; KUMAR; PATIL, 2017). Dentre as encefalites de origem viral estão importantes zoonoses como o vírus da raiva (RABV), os vírus das encefalites Equina do Leste (EEEV), Oeste (WEEV) e Venezuelana (VEEV), o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) e, o vírus de West Nile (WNV) WNV (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; CHAPMAN *et al.*, 2018; KUMAR; PATIL, 2017; RECH; BARROS, 2015; ROSA *et al.*, 2013).

No Brasil, o ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) atua em colaboração com o Ministério da Saúde na investigação de epizootias nestes animais (BRASIL, 2019a). A raiva, assim como as encefalites equinas e WNV, constituem agravos de notificação obrigatória (IN n° 50/2013) e o diagnóstico é precedido no SNC dos equídeos encontrados mortos e/ou com síndrome neurológica (MAPA, 2013; MAPA, 2009). Assim, o SNC do equídeo com alteração neurológica e negativo para raiva deve ser encaminhado para diagnóstico das demais encefalites virais que assumem importância zoonótica como EEEV, WEEV, VEEV, SLEV e WNV (MAPA, 2009; BRASIL, 2019a).

Neste sentido, o WNV destaca-se como um importante patógeno responsável por graves epidemias em aves susceptíveis, equídeos e na população humana em todo o mundo (PFEFFER; DOBLER, 2010; BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019; HABARUGIRA *et al.*,

2020a). Este arbovírus mantém seu ciclo de transmissão através de vetores invertebrados, dípteros hematófagos (mosquitos) principalmente do gênero *Culex*, que se alimentam em aves silvestres (ciclo enzoótico) (KOMAR *et al.*, 2003; CIOTA; KRAMER, 2013; PELLO; OLSEN, 2013). Acidentalmente, equídeos e seres humanos também podem ser infectados, porém, são considerados hospedeiros terminais e apresentam baixa viremia, a qual é insuficiente para a manutenção do ciclo no mosquito (CASTILLO-OLIVARES ; WOOD 2004; COLPITTS *et al.*, 2012).

A infecção nos equídeos é, em sua maioria, assintomática, sendo que apenas um pequeno percentual (8-10%) destes animais apresenta sinais clínicos neurológicos representados por fraqueza, ataxia leve a moderada e, em casos encefálicos mais graves, decúbito, fasciculação muscular, entre outros (CASTILLO-OLIVARES; WOOD 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Contudo, são considerados sentinelas auxiliando na detecção precoce do WNV em uma região pois, geralmente, os casos clínicos nestes animais antecedem os casos na população humana (PETROVIĆ *et al.*, 2018; YOUNG *et al.*, 2019).

Desde sua identificação em humanos na década de 1930, em Uganda, o WNV vem se espalhando rapidamente em vários continentes, sendo atualmente um problema de saúde pública global (HABARUGIRA *et al.*, 2020a; PIERSON; DIAMOND, 2020). Os primeiros casos de infecção nos equídeos foram observados na década de 1950 no Egito, sendo posteriormente reportados na Europa, África, Ásia, América e Oceania (SCHMIDT; MANSOURY, 1963; MURGUE *et al.*, 2002; VENTER *et al.*, 2009; CHANCEY *et al.*, 2015).

Após a introdução do WNV nos EUA em 1999, uma epidemia de grande magnitude foi observada e, entre 1999 a 2006, 23 mil equinos foram acometidos e uma taxa de mortalidade de 38 a 57% foi reportada (ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004; BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019). Uma rápida progressão foi então observada no continente americano, com identificação do vírus em alguns países da América Central e América do Sul (DUPUIS *et al.*, 2003; MATTAR *et al.*, 2005; MORALES-BETOULLE *et al.*, 2006; BOSCH *et al.*, 2007; BARRERA *et al.*, 2008; HOBSON-PETERS *et al.*, 2011; ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA, 2013; MAZZEI *et al.*, 2013).

Consequente a esta expansão, em 2003 foi implementado no Brasil o Sistema Nacional de Vigilância do WNV, objetivando sua detecção precoce para adoção de medidas de controle e prevenção (BRASIL, 2019b). Em 2009, a presença do vírus foi descrita pela primeira vez no Brasil, através da detecção de anticorpos contra WNV em cavalos na região do pantanal, Mato Grosso do Sul (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011). Após, novos inquéritos sorológicos identificaram anticorpos contra o vírus em aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*), humanos no Estado do Piauí e equídeos de outras regiões do país (MELANDRI *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2015). Consequentemente, houve uma intensificação da vigilância buscando a detecção precoce deste arbovírus (BRASIL, 2019b).

Nos últimos 61 anos (1959 a 2020), o vírus foi responsável por perdas significativas de animais em rebanhos de todo o mundo, indicando a necessidade urgente da adoção de medidas de prevenção e controle mais eficazes por meio de métodos de diagnóstico sensíveis e de programas de vigilância (MURGUE *et al.*, 2002, 2006; ANGENVOORT *et al.*, 2013; BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019). Acompanhando este crescimento de casos nos equídeos, óbitos de aves susceptíveis e perdas na população humana também ocorreram, gerando preocupações quanto a emergência e reemergência do vírus em diversos países (MURGUE *et al.*, 2002, 2006; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

O diagnóstico do WNV em equídeos é efetuado através da associação dos sinais clínicos neurológicos e testes laboratoriais (OIE, 2018a). Devido à baixa viremia, característica da infecção nestes animais, a detecção direta do vírus é preferencialmente realizada nos tecidos do SNC como cérebro, tronco encefálico e, principalmente, medula, onde se tem uma probabilidade de títulos virais maiores comparativamente ao sangue do animal (BUNNING *et al.*, 2002; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004). No entanto, a coleta e conservação inadequadas das amostras biológicas dificultam a detecção e o isolamento do vírus (CANTILE *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

A presente tese será apresentada em capítulos, sendo o capítulo 1 uma revisão sobre todos os aspectos da infecção por WNV abordando características como replicação, patogenicidade, transmissão, controle e aspectos clínicos, principalmente nos equídeos.

O segundo capítulo, aborda o desenho dos primers e desenvolvimento da *nested* RT-PCR que resultou na primeira identificação do RNA viral de WNV associado a desordem neurológica em equídeos no Brasil.

No terceiro capítulo, o perfil das amostras enviadas para diagnóstico das encefalites virais foi avaliado quanto as características dos equídeos que vieram a óbito e aspectos de coleta e envio das amostras.

Considerando as dificuldades no diagnóstico precoce de WNV e com o objetivo de contribuir quanto ao conhecimento da patogenicidade viral, o capítulo 4 aborda a aplicação da técnica *nested* RT-PCR para WNV no sangue total, com ênfase nas hemácias, de um equino com desordem neurológica.

Por fim, objetivando orientar os médicos veterinários quanto aos procedimentos de coleta, conservação e envio de amostras biológicas de equídeos com síndrome neurológica, o capítulo 5 apresenta um guia elaborado para auxiliar na obtenção de um diagnóstico conclusivo que inclui desde a coleta de material, bem como descarte de resíduos e carcaça.

Como último item da tese, considerações finais serão apresentadas sobre todo o trabalho.

2. Objetivos

2.1 – Geral

Aprimorar técnicas de diagnóstico molecular para aumentar a sensibilidade na detecção das encefalites virais, com ênfase no vírus do Nilo Ocidental (WNV), em amostras de SNC de equídeos, auxiliando nos programas de vigilância animal e de saúde pública.

2.2 Específicos

Padronizar a técnica de *nested* RT-PCR para diagnóstico do WNV no SNC de equídeos com síndrome neurológica

Avaliar o perfil das amostras de SNC dos equídeos que vieram a óbito com distúrbios neurológicos enviadas para diagnóstico das encefalites virais e coletadas a campo.

Desenvolver técnicas de detecção de WNV em amostra de hemácias de equídeos coletadas durante os episódios de manifestação neurológica, para auxiliar no monitoramento epidemiológico do vírus.

Auxiliar na capacitação dos médicos veterinários de campo em procedimentos relacionados ao diagnóstico de síndromes neurológicas, através da produção de caderno técnico específico e divulgação em revistas de educação continuada do Conselho de Medicina Veterinária.

3. Capítulo 1. Vírus do Nilo Ocidental (*West Nile virus* – WNV): revisão de literatura

3.1.-Classificação

A família *Flaviviridae* tem como membros os gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus* (ICTV, 2021). O gênero *Flavivirus* possui mais de 50 espécies de vírus classificados em 12 grupos de acordo com os complexos antigênicos segundo ensaios sorológicos (CALISHER *et al.*, 1989; CASTILLO-OLIVARES; WOOD 2004). Neste gênero estão incluídos vírus que causam doenças emergentes e reemergentes de importância na medicina veterinária bem como na saúde humana (PFEFFER; DOBLER, 2010).

Entre os flavivírus está o vírus do Nilo Ocidental (WNV) responsável por graves quadros de encefalite em aves susceptíveis, equídeos e seres humanos (HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Outros membros do gênero são o vírus da Dengue (DENV), Zika vírus (ZIKV) e o vírus da Febre amarela (*yellow fever* - YFV), sendo este último o protótipo do gênero (KUNO, 1998; ICTV, 2021).

WNV está inserido no complexo do vírus da Encefalite Japonesa (JEV) que possui oito espécies incluindo outros vírus de importância em saúde pública, como os vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e vírus da encefalite de Murray Valley (MVEV) (SIMMONDS *et al.*, 2017; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Existem nove linhagens (L1 a L9) de WNV de acordo com fatores como patogenicidade, evolução, biologia e localização (FALL *et al.*, 2017; PÉREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017). No entanto, embora seja considerada distinta, a linhagem 5 é comumente classificada dentro do clado da sub linhagem 1c (LANCIOTTI *et al.*, 2002; KRAMER *et al.*, 2008; FALL *et al.*, 2017). Dentre estas linhagens, a L1 e L2 são consideradas as mais virulentas sendo atribuída a estas a ocorrência de graves surtos com doenças neurológicas e óbitos na população humana e animal (LANCIOTTI *et al.*, 2002; VENTER *et al.*, 2009; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Os isolados da linhagem 1 (L1) já foram identificados em todo mundo desde o continente africano, Ásia, Austrália, Europa bem como no continente Americano (MACKENZIE *et al.*, 1994; LANCIOTTI *et al.*, 1999; CANTILE *et al.*, 2001; FABBRI *et al.*, 2014; FALL *et al.*, 2017; SICONELLI *et al.*, 2021). A L1 é dividida em sub-linhagens denominadas 1a, 1b e 1c (FALL *et al.*, 2017). Os primeiros surtos no continente americano ocorreram nos Estados Unidos (EUA) sendo atribuídos à sub linhagem 1a o grande número de casos de desordens neurológicas, bem como óbitos em seres humanos, equinos e aves (LANCIOTTI *et al.*, 2002).

No entanto, a primeira estirpe de WNV identificada na década de 1930 associada à enfermidade em uma mulher, pertence a L2 (FALL *et al.*, 2017). Posteriormente, L2 foi associada à doença neurológica em equinos pela primeira vez em 2009, com identificação e isolamento viral na África do Sul (VENTER *et al.*, 2009). Embora considerada endêmica na África subsaariana e Madagascar, L2 tem se expandido sendo detectada em países da Europa como Hungria, Áustria, Grécia e Itália, acometendo equinos, aves e a população humana (KUTASI *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.*, 2014; VENTER *et al.*, 2017; VEO *et al.*, 2019).

As demais linhagens são, ao que tudo indica, menos virulentas quando comparadas às supracitadas, sendo L3 e L4, aparentemente, não patogênicas para seres humanos e equídeos, não desencadeando doença nestes hospedeiros (ANGENVOORT *et al.*, 2013; PÉREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017). As linhagens 3 a 9 possuem poucos isolados tendo sido descritos na República Checa, Rússia, Índia, Espanha, Senegal e Áustria, respectivamente (FALL *et al.*, 2017; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Adicionalmente, além da diferença de patogenicidade entre as linhagens, observa-se uma variação também entre as estirpes dentro de uma mesma linhagem. Cantile e colaboradores (2001) avaliando 10 cavalos (4 dos EUA e 6 da Itália) com encefalite causada pela linhagem 1 de WNV, observaram diferenças na avaliação histopatológica do SNC dos animais, onde os cavalos norte-americanos apresentavam lesões mais extensas no tecido nervoso. Além disso, sugere-se que as estirpes isoladas no surto de WNV nos EUA, são mais patogênicas para aves, sendo semelhantes às que acometeram gravemente espécies aviárias em Israel (STEELE *et al.*, 2000; LANCIOTTI *et al.*, 2002). No entanto, comparativamente, os isolados da Itália se assemelham aos isolados responsáveis por quadros de encefalite em 94 equídeos no Marrocos em 1996 (CANTILE *et al.*, 2001; KRAMER *et al.*, 2008).

Desta forma, pequenas variações nas sequências de nucleotídeos que determinam mudanças de aminoácidos (não sinonímias), podem contribuir para o aumento de virulência da estirpe, como foi observado em espécies de aves silvestres nos EUA e na Europa (GAMINO; HÖFLE, 2013).

Além da classificação taxonômica mencionada, WNV integra o grupo dos arbovírus (*arthropod borne viruses*), juntamente com os importantes flavivírus já mencionados (WNV, DENV, ZIKV, YFV) e outros patógenos como os vírus da encefalite equina do leste (EEEV), da encefalite equina do oeste (WEEV), da encefalite equina da Venezuela (VEEV) e Chikungunya (CHIKV), todos do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Os arbovírus são mantidos na natureza por ciclos complexos, envolvendo hospedeiros invertebrados (mosquitos, carrapatos) e hospedeiros vertebrados, como mamíferos e aves silvestres e, embora esta não seja uma classificação taxonômica, é uma denominação muito utilizada pelo significado comum em transmissibilidade (CHARREL, 2016; LAMBERT; LANCIOTTI, 2016).

Mais de 500 arbovírus já foram reconhecidos mundialmente, no entanto, estudos sugerem que esse número pode representar apenas 1% do total e, atualmente, cerca de 150 destes vírus causam enfermidades em seres humanos. A maioria dos arbovírus de relevância na saúde humana e animal estão incluídos nas famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae* (YOUNG, 2018). Esses vírus são agentes globais causadores de taxas significativas de morbidade e mortalidade na população humana e nos animais domésticos (PFEFFER; DOBLER, 2010). WNV, assim como muitos outros arbovírus, são importantes agentes de zoonoses, ou seja, são responsáveis por doenças naturalmente transmissíveis entre os animais e seres humanos (World Health Organization, 1959).

Atualmente, WNV encontra-se presente em todo mundo caracterizando um potencial problema de saúde pública global (HABARUGIRA *et al.*, 2020a; PIERSON; DIAMOND, 2020).

3.2 - Estrutura do vírus e ciclo celular

A partícula viral de WNV é esférica, com aproximadamente 50 nm de tamanho e envolvida por uma camada lipídica, o envelope (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003) (Figura 1). O vírion maduro possui em sua superfície proteínas estruturais sendo estas a glicoproteína de membrana (M) localizada no envelope juntamente com a glicoproteína do envelope (E) e, mais internamente, está a proteína do capsídeo (C). Estas glicoproteínas possuem inúmeras funções, entre elas a formação da partícula viral dentro da célula do hospedeiro durante a replicação do vírus. Assim como os demais vírus do gênero, WNV possui duas formas durante seu ciclo replicativo, a forma imatura com a glicoproteína prM em sua superfície e a partícula madura, onde essa proteína se encontra como a proteína M, já mencionada (BRINTON, 2014; VALIAKOS *et al.*, 2013).

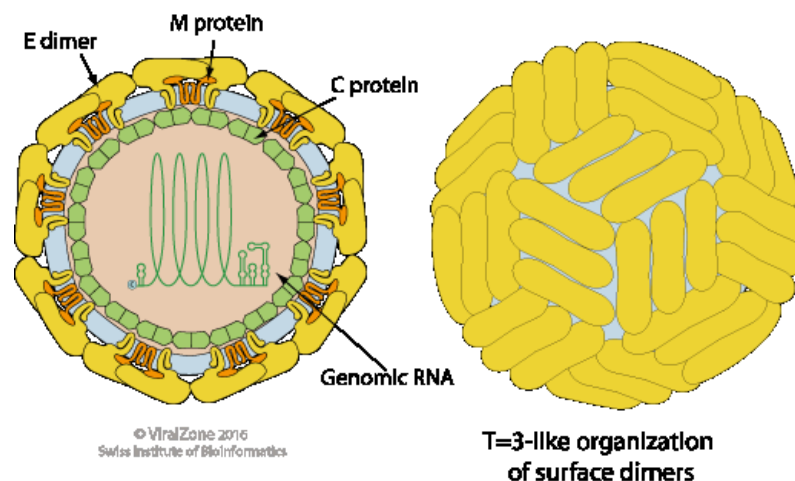


Figura 1. Vírion envelopado, esférico, aproximadamente 50 nm em diâmetro. As glicoproteínas do envelope estão arranjadas em interligação, resultando em simetria semelhante à icosaédrica.

Retirado de https://viralzone.expasy.org/43?outline=all_by_species

Internamente, envolvido pelo capsídeo, está o núcleo com o ácido nucleico genômico. O genoma viral é formado por uma cadeia simples de RNA sentido positivo, tamanho aproximado de 11 kb e uma única ORF que irá codificar uma poliproteína que será a precursora das proteínas estruturais já mencionadas (C, E e prM/M) e as proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4a, NS4B e NS5) do vírus (BRINTON, 2014; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

As proteínas não-estruturais são importantes principalmente para a replicação do vírus, porém também estão envolvidas em outros processos. Inicialmente, a proteína NS1 atua como cofator na replicação do genoma, na maturação do vírus e, quando secretada na superfície da célula infectada, antagoniza o sistema de complemento do hospedeiro atuando na evasão do sistema imune. Além disso, é uma proteína importante para o diagnóstico sendo identificada na corrente sanguínea na fase aguda da infecção (DE FILETTE *et al.*, 2012; VALIAKOS *et al.*, 2013; BRINTON, 2014).

Adicionalmente, a NS5, uma RNA polimerase dependente de RNA, apresenta-se como a proteína não-estrutural mais conservada e desempenha funções muito importantes para replicação do ácido nucleico viral, bem como na relação do sistema imune do hospedeiro com a infecção por WNV. Neste último caso, esta proteína atua na evasão do sistema imune inato através do antagonismo ao Interferon (IFN) (ZIEGLER *et al.*, 2012; BRINTON, 2014; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

A proteína NS3 por sua vez possui funções de protease e helicase sendo sua atividade dependente da proteína NS2B. As funções das demais proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B ainda estão sendo estudadas, porém estão relacionadas com a replicação do vírus, rearranjo da membrana viral, cofator para atuação de outras proteases, montagem da partícula do vírus, bem como atuação na resposta do sistema imune com mecanismos de evasão como inibição da ativação e atuação do INF (ANGENVOORT *et al.*, 2013; BRINTON, 2014; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

As proteínas estruturais, além da função de estruturação da partícula viral, estão relacionadas com ligação do vírus a receptores celulares, resposta imune do hospedeiro e patogênica da infecção viral. Entre elas destaca-se a glicoproteína E do envelope, uma proteína imunogênica com importante função na entrada do vírus na célula alvo e também está relacionada com resposta imune dos hospedeiros sendo alvo dos anticorpos neutralizantes (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003; ROEHRIG, 2009; VALIAKOS *et al.*, 2013).

Embora a prM não componha a partícula madura, essa proteína possui funções importantes na replicação assim como na montagem da partícula viral. Antes da maturação do vírion e sua consequente saída da célula infectada, esta glicoproteína atua na proteína E impedindo que a partícula formada saia da célula por exocitose prematuramente. Enquanto que na partícula madura, a proteína M atua na fusão do vírus na célula do hospedeiro (HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Outra proteína estrutural, a proteína C integra o capsídeo viral que protege o material genético do vírus e está relacionada com efeitos citotóxicos que vão resultar na morte da célula (BRINTON, 2014; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Na estrutura do genoma, além do segmento que codifica as proteínas mencionadas, nas suas extremidades estão as regiões 3' UTR e 5' UTR, com 337 a 649 e 96 nucleotídeos, respectivamente. Embora chamadas de “regiões não-codificantes” ou “não-traduzíveis”, estudos demonstraram que estes trechos do genoma exercem múltiplas funções na replicação viral, regulação da tradução e na patogênese de WNV (ROBY *et al.*, 2014; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Além disso, são regiões muito conservadas entre os diversos vírus do gênero *Flavivirus* (BRINTON, 2014).

Todo ciclo replicativo do vírus ocorre no citoplasma da célula alvo no hospedeiro (Figura 2). Inicialmente, a partícula viral se liga aos receptores celulares ocorrendo uma endocitose receptor mediada. A proteína viral responsável por essa ligação é a glicoproteína E, que possui três domínios diferentes (DI, II e III) e será importante também na resposta imune do hospedeiro (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003).

Entretanto, as proteínas celulares que atuam como receptores para entrada do vírus nestas células ainda não foram bem caracterizadas. Algumas proteínas como as integrinas, moléculas de adesão específicas das células dendríticas (DC-SIGN, DC-SIGN-R), molécula de manose e lectinas do tipo C, são sugeridas através de estudos *in vitro* como moléculas alvos da glicoproteína E (VALIAKOS *et al.*, 2013; PIERSON; DIAMOND, 2020).

As pesquisas *in vitro* indicam que o vírus se replica em muitas culturas de células, sugerindo que mantêm receptores celulares conservados, inclusive entre os diferentes hospedeiros (CHU *et al.*, 2006; RICHARDS *et al.*, 2010). Entretanto, também existe a possibilidade da versatilidade do vírus em usar diferentes proteínas celulares para esta interação (BRINTON, 2014).

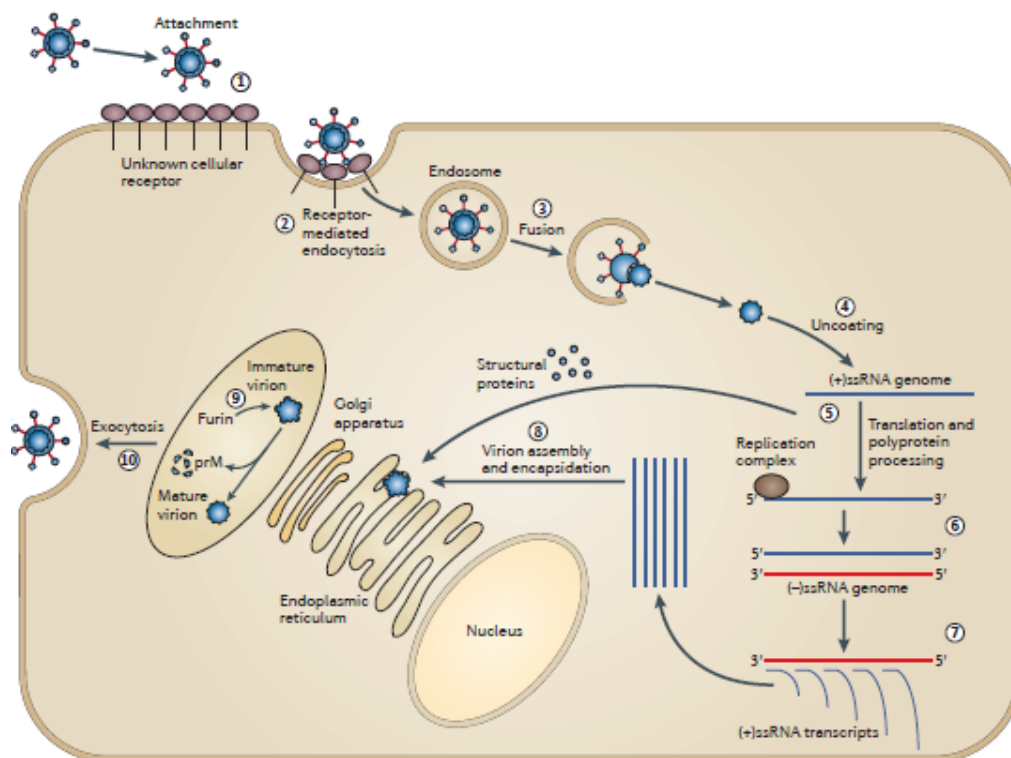


Figura 2. Os vírions se ligam à superfície de uma célula hospedeira e, subsequentemente, entram na célula por endocitose mediada por receptor (1, 2). A acidificação da vesícula endossômica desencadeia mudanças conformacionais no vírion, fusão das membranas viral e celular e consequente desmontagem das partículas (3). Uma vez que o genoma é liberado no citoplasma, o RNA de sentido positivo é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e do hospedeiro. A cópia do genoma ocorre no citoplasma (4, 5, 6 e 7). A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático rugoso (ER) quando as proteínas estruturais e o RNA recém-sintetizado brotam no lúmen do ER (8). As partículas virais imaturas resultantes são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN). As partículas imaturas do vírion são clivadas por proteases resultando em partículas infecciosas maduras (9). Vírions maduros são subsequentemente liberados por exocitose (10). (Adaptado de SUTHAR *et al.*, 2013)

Os aspectos da interação do vírus com os receptores celulares são determinantes da patogenicidade. WNV possui como alvo as células do sistema monofagocitário (monócitos, macrófagos), neutrófilos, células do SNC (células gliais, neurônios), células dendríticas e, mais recentemente, sua ligação às hemácias foi demonstrada (GARCIA-TAPIA *et al.*, 2006; RIOS *et al.*, 2006, 2007; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Após internalização na célula, ocorre a formação do endossoma, uma vesícula contendo a partícula viral. A mudança do pH dentro deste endossoma promove a acidificação que vai resultar na alteração da conformação da glicoproteína E, com consequente dissociação do capsídeo e liberação do RNA viral no citoplasma da célula. Todo o processo de

tradução, replicação e também a montagem de novos vírus vai ocorrer no retículo endoplasmático (VALIAKOS *et al.*, 2013; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Neste processo, o RNA genômico é diretamente traduzido pelos ribossomos, por ser de sentido positivo (equivalente a mRNA) originando uma poliproteína, que será clivada em pontos específicos em toda sua extensão pela NS3 protease e também com auxílio de proteases do hospedeiro. Assim, as proteínas não estruturais e estruturais são formadas para compor a partícula viral (PIERSON; DIAMOND, 2020; VALIAKOS *et al.*, 2013).

Ao mesmo tempo que o RNA genômico de sentido positivo é traduzido em toda sua extensão no retículo endoplasmático, novas cópias de RNA subgenômicos de sentido negativo são formadas objetivando a produção da progênie viral (VALIAKOS *et al.*, 2013). As partículas virais recém-formadas serão liberadas da célula por exocitose. Entretanto, antes deste processo, ocorrem mudanças em sua estrutura com a clivagem da glicoproteína prM por proteases presentes no complexo de Golgi, sucedendo a transição de partícula imatura para madura (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

Embora todas as etapas sejam seguidas para liberação de uma partícula viral madura, pode ocorrer a liberação de partículas imaturas. Porém, a presença do vírion imaturo parece não interferir negativamente no processo infeccioso, pelo contrário, estudos sugerem que há participação destas partículas virais na infecção (COLPITTS *et al.*, 2011). Contudo, há necessidade de pesquisas adicionais para determinar qual a função, bem como, em média, quantas partículas imaturas podem estar envolvidas na infecção pelo WNV.

Além disso, embora o processo de replicação seja semelhante, a heterogeneidade genética e fenotípica que caracteriza mudanças estruturais deve ser considerada. Assim, no hospedeiro infectado por estes vírus existem diferentes partículas virais circulando e, conseqüentemente, os locais de interação do vírus com a célula alvo pode ser variáveis. Sugere-se que essa diversidade seja responsável pelo tropismo viral por diferentes tecidos, além da infecção em diferentes hospedeiros (REY *et al.*, 2017).

Adicionalmente, WNV, assim como os outros integrantes de *Flavivirus*, produz um pequeno fragmento de RNA subgenômico durante a replicação, derivado da extremidade 3'UTR e que irá exercer funções importantes na patogênese, bem como atuar na modulação da resposta imune do hospedeiro (ROBY *et al.*, 2014).

3.3 - Patogenia

Muitos aspectos da patogênese da infecção por WNV precisam ser elucidados. No entanto, a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, é possível sugerir o trajeto do vírus no hospedeiro, sendo aqui apresentada a patogenia em mamíferos, com ênfase nos seres humanos.

A entrada do vírus ocorre através da picada do mosquito infectado durante seu repasto sanguíneo. A princípio, para auxiliar na infecção viral inicial, substâncias presentes na saliva do mosquito, além dos anticoagulantes, atuam de forma a inibir a resposta imune contra o vírus através da redução de linfócitos T no local e diminuição da atividade de interleucinas (SCHNEIDER *et al.*, 2010; COLPITTS *et al.*, 2012). Em seguida, a replicação viral ocorre inicialmente nos queratinócitos, células em maior abundância na epiderme (80%) e nas células dendríticas. Desta forma, as células dendríticas constituem o primeiro alvo de WNV no organismo (PETERSEN *et al.*, 2013; VALIAKOS *et al.*, 2013; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

A infecção nas células dendríticas permite a propagação viral através da migração destas para os linfonodos, onde estas células apresentam antígenos aos linfócitos, constituindo assim a viremia primária. Nos gânglios linfáticos, a replicação viral ocorre também nos linfócitos B e T. Desta forma, as células mononucleares do sistema imune são também alvos da replicação viral WNV(GARCIA-TAPIA *et al.*, 2006; RIOS *et al.*, 2006).

Esta multiplicação viral ativa o sistema imune, que atua nas células infectadas e partículas virais livres na circulação, através da fagocitose e apresentação de antígeno pelos macrófagos (COLPITTS *et al.*, 2012; PETERSEN *et al.* 2013). Assim, os macrófagos constituem um componente muito importante contra a infecção por WNV sendo responsáveis pela resposta inicial (COLPITTS *et al.*, 2012).

Contudo, Rios e colaboradores (2006) avaliando a susceptibilidade de monócitos/macrófagos à infecção por WNV *in vitro*, encontraram replicação viral intensa com produção de partículas virais. Desta forma, estas células de defesa possuem relevância na propagação da infecção viral no organismo, sendo também relacionadas com a transmissão do vírus através da transfusão de sangue (RIOS *et al.*, 2006, 2007).

Além das células do sistema mononuclear fagocitário, WNV parece também se ligar às hemácias, porém sem replicação nestas últimas. Estudo comparando a presença de WNV no plasma e nas hemácias, demonstrou que o vírus pode ser encontrado no sangue de doadores principalmente associado às hemácias. Além disso, a capacidade infectante dos vírions foi comprovada com a visualização de efeito citopático (ECP) em cultivo de células Vero, confirmando a associação de WNV com estas células e o seu possível potencial de infecção via transfusão sanguínea (RIOS *et al.*, 2007).

A adsorção às hemácias é vista na patogenia de diversos outros agentes, como o Parvovirus B19 e o vírus da língua azul (BTV), que se ligam a receptores nos eritrócitos durante o processo patogênico (LEE *et al.*, 2011; BREWER; MACLACHLAN, 1994). Entretanto, para WNV, os receptores ao qual o vírus se liga nas células, assim como nas hemácias, ainda são desconhecidos e novos estudos são necessários para determinar a natureza dessa interação (HABARUGIRA *et al.*, 2020a; RIOS *et al.*, 2007).

Continuamente a propagação do patógeno, o WNV produz viremia via leucócitos (macrófagos, neutrófilos) e atinge vísceras, como rins e baço onde se multiplica em

células epiteliais e macrófagos teciduais, respectivamente, constituindo a segunda viremia (PETERSEN *et al.*, 2013).

No entanto, a interação do vírus com o hospedeiro bem como o tropismo celular de WNV apresentam complexidade e parece variar entre os hospedeiros (VALIAKOS *et al.*, 2013). Enquanto nos mamíferos a replicação viral ocorre em órgãos como baço e rins, nas aves o vírus pode ser encontrado em diversos tecidos como no do fígado, rins, pulmão, coração, pele, adrenais, intestinos, pâncreas, ovários, olho e cérebro (STEELE *et al.*, 2000; GAMINO; HÖFLE, 2013; PELLO; OLSEN, 2013).

Adicionalmente, a detecção da eliminação viral na urina em pacientes humanos meses após o início da infecção sugere que os rins podem ser possíveis sítios de persistência de WNV no organismo. Além disso, essa persistência do vírus pode sugerir também uma contínua fonte de infecção viral e, conseqüentemente, uma maior preocupação no controle da doença em relação à saúde pública (BARZON *et al.*, 2013; MURRAY *et al.*, 2017).

Porém, o tropismo renal é menos observado nos equídeos quando comparados com seres humanos, sendo escassa a descrição na literatura (BYAS; EDEN, 2020). Desta forma, a compreensão da patogenia da infecção por WNV nos rins assim como nos demais órgãos nestes animais, requer mais estudos para ser melhor elucidada.

A conseqüente invasão do SNC resulta na forma neuroinvasiva da infecção de WNV e vai depender de fatores como intensidade e duração da viremia, bem como imunidade do hospedeiro (LIM *et al.*, 2011; OUDAR *et al.*, 1971; VALIAKOS, 2013). O caráter neurotrópico do vírus foi observado em aves, equídeos e seres humanos, resultando em graves sequelas ou óbito (SMITHBURN *et al.*, 1940; STEELE *et al.*, 2000; CANTILE *et al.*, 2000; KOMAR *et al.*, 2003; DAVIS *et al.*, 2006).

No entanto, o mecanismo pelo qual o vírus consegue atravessar a barreira hematoencefálica ainda não foi elucidado. Desta forma, diversas hipóteses já foram sugeridas envolvendo caminhos via neurônio ou via hematogênica para entrada de WNV. Entre os possíveis mecanismos sugeridos estão a passagem passiva de partículas virais pela barreira hematoencefálica devido a um aumento da permeabilidade vascular decorrente do processo inflamatório, passagem por diapedese através da junção endotelial de células infectadas do sistema imune como macrófagos (conhecido como mecanismo “cavalo de troia”) e rota de invasão via neurônios através do transporte axonal (CANTILE *et al.*, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2011; SUEN *et al.*, 2014; MUSTAFÁ *et al.*, 2019; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Após invasão do SNC, o WNV infecta neurônios, células gliais, principalmente do rombencéfalo, mesencéfalo e da medula espinhal (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; BOURGEOIS *et al.*, 2011). Conseqüentemente, ocorre necrose de neurônios, gliose e a presença do vírus induz uma intensa resposta inflamatória caracterizada por

infiltrado inflamatório principalmente de células mononucleares (CANTILE *et al.*, 2000; BYAS; ENDEL, 2020).

Desta forma, o vírus parece ter como alvos de replicação as células dendríticas, células mononucleares do sistema imune, monócitos/macrófagos circulantes e teciduais (sistema mononuclear fagocitário), neutrófilos, células do SNC como células gliais e neurônios (LIM *et al.*, 2011; SUTHAR *et al.*, 2013; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Em adição, ocorre também uma ligação de WNV com eritrócitos, mas não como sítios de replicação (RIOS *et al.*, 2007).

Assim como em outras infecções virais, ocorre intenso processo inflamatório, com liberação de citocinas e outros fatores que agravam ainda mais a situação do hospedeiro infectado (SUTHAR *et al.*, 2013).

O combate a infecção causada por WNV parece ser semelhante nos hospedeiros mamíferos, o homem e os equídeos. A infecção viral induz uma resposta imune inata, seguida pela imunidade adaptativa (COLPITTS *et al.*, 2012; AHLERS; GOODMAN, 2018). A infecção nos diferentes segmentos do SNC e a viremia nos equídeos, por exemplo, parecem estar relacionadas com esta resposta imune do indivíduo (JOUBERT *et al.*, 1971).

A imunidade inata contra o vírus é formada principalmente pela produção de interferons (INFs), que induzem à expressão de genes de centenas de proteínas antivirais, assim como as citocinas (SUTHAR *et al.*, 2013). Além disso, também atuam células de defesa como os macrófagos, como já mencionado, que são essenciais para a defesa contra o vírus agindo também nos tecidos do SNC (COLPITTS *et al.*, 2012).

Inicialmente, em resposta à infecção nas células dendríticas, ocorre produção de INFs, com destaque para INF tipo 1, que induzem cascatas de sinais para a tradução e proteínas antivirais, objetivando interferir no ciclo viral (COLPITTS *et al.*, 2012). Adicionalmente, sugere-se que modificações no gene OAS1 produzidos na resposta do INF frente ao vírus pode estar relacionado com a susceptibilidade dos equinos a infecção viral (ANGENVOORT *et al.*, 2013; AHLERS; GOODMAN, 2018).

A imunidade adaptativa, subdividida em humoral e celular, representa maior relevância na defesa contra a infecção viral devido à memória. Na resposta imune do tipo celular tem-se a atuação de linfócitos T citotóxicos reconhecendo células infectadas através da interação com MHC classe I, na citotoxicidade promovida por células CD8, além de outros múltiplos mecanismos (COLPITTS *et al.*, 2012; NETLAND; BEAV, 2013).

Contudo, a imunidade humoral também possui papel essencial se destacando na defesa do organismo contra WNV. A estimulação dos linfócitos B pelas células portadoras de antígenos virais, estimula a produção das imunoglobulinas IgM, IgA e IgG (ROEHRIG, 2009).

Dos anticorpos produzidos os mais importantes são os neutralizantes que atuam de forma a impedir a ligação do vírus com os receptores da célula e assim inibir a endocitose. Estes anticorpos se ligam às proteínas localizadas na superfície do envelope viral e, neste caso, principalmente sobre a proteína E do vírus, especificamente no domínio DIII desta glicoproteína (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003; ROEHRIG 2009; VALIAKOS *et al.*, 2013).

Embora o sistema imune atue de forma a inibir o estabelecimento da infecção, o vírus possui mecanismos para evadir das diversas ações do organismo. Estudos indicam que o vírus apresenta pelo menos 6 mecanismos de escape da atuação dos IFNs (SUTHAR *et al.*, 2013; VALIAKOS *et al.*, 2013). Além disso, os genótipos de WNV parecem atuar de forma diferente na sinalização da resposta do INF, interferindo na atividade desta resposta imune (SUTHAR *et al.*, 2013).

Desta forma, a multiplicação viral e a intensa resposta imune resultam em alterações patológicas que serão refletidas clinicamente (CAMPBELL *et al.*, 2002; CANTILE *et al.*, 2000; GAMINO; HÖFLE, 2013).

A replicação viral nas células alvo, a viremia primária e a resposta inicial do sistema imune resultam nos sinais clínicos primários que ocorrem após o período de incubação (2-14 dias no homem; 3-15 dias nos equídeos; variável nas aves) (KOMAR *et al.*, 2003; ANGENVOORT *et al.*, 2013; GAMINO; HÖFLE, 2013; SUTHAR *et al.*, 2013; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). A apresentação clínica é variável entre as diferentes espécies hospedeiras. A gravidade da infecção pelo WNV vai ser determinada por fatores como imunidade, espécie do hospedeiro, a linhagem e estirpe do vírus, presença de coinfeções, entre outros (CANTILE *et al.*, 2001; MONTGOMERY; MURRAY, 2015; PÉREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

No ser humano a maioria dos casos é assintomática, porém, cerca de 25% dos infectados podem desenvolver quadro clínico semelhante a infecções por outros arbovírus como por exemplo, DENV, ZIKV e CHIK (PETERSEN *et al.*, 2013; PAHO, 2017). Desta forma, os sinais clínicos observados podem ser febre (acima de 38 °C), náuseas, mialgia e cefaleia (DAVIS *et al.*, 2006; COLPITTS *et al.*, 2012; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Manifestações cutâneas como exantema e erupção, podem também ocorrer na infecção por WNV (BAYES; EBEL, 2020; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

A replicação de WNV nos rins pode resultar em uma insuficiência renal aguda (BARZON *et al.*, 2013). Além disso, alterações oculares como hiperemia conjuntival, coriorretinite (monofocal e multifocal), vasculite na retina, neuroretinite e neuropatia ótica podem ser observadas em pacientes com WNV. O acometimento ocular com alterações similares pode ocorrer em recém-nascido, conseqüente de infecção intrauterina (ALPERT *et al.*, 2003; MERLE *et al.*, 2018).

A forma neuroinvasiva constitui a forma mais grave da infecção por este vírus e, embora seja observada em uma pequena porcentagem (1%) dos casos nos humanos pode resultar

em graves sequelas ou no óbito do hospedeiro (DAVIS *et al.*, 2006; OSTLUND *et al.*, 2000). Nestes casos, o indivíduo pode apresentar sinais como paralisia flácida de um ou mais membros, confusão mental, letargia, entre outros. Dentre as possíveis decorrências da doença nos pacientes está a observação de déficits cognitivos, tremores relacionados com Parkinson, problemas auditivos, dificuldades de locomoção, entre outros (DAVIS *et al.*, 2006).

Os sinais neurológicos observados nos equídeos são semelhantes àqueles observados em seres humanos, sendo variável entre os indivíduos (BOURGEOIS *et al.*, 2011). A caracterização clínica será detalhada a seguir, no item 3.5., infecção por WNV em equídeos.

Nas aves, hospedeiros naturais do ciclo de transmissão, a susceptibilidade varia entre as diferentes espécies que podem ser assintomáticas ou apresentar sinais clínicos neurológicos seguidos de morte. Na maioria das aves sintomáticas podem ser observadas alterações inespecíficas como desidratação, anorexia, apatia e eriçamento das penas. Os sinais clínicos neurológicos podem ser dificuldade de manter a postura ou voar, movimentos anormais da cabeça, paralisia, desorientação, nistagmo, convulsões, parestesia e tremores (GAMINO; HÖFLE, 2013; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Embora a infecção de WNV em répteis necessite ser melhor conhecida, sinais clínicos relacionados com alteração gastrointestinal como distensão abdominal ou neurológica apresentando ataxia, tremores e espasmos foram reportados em crocodilos (HABARUGIRA *et al.*, 2020b).

3.4 - Epidemiologia de WNV

A cadeia epidemiológica de um patógeno é determinada pelas variáveis relacionadas com fonte de infecção, via de transmissão, via de eliminação e susceptibilidade dos hospedeiros. Na transmissão de um arbovírus, a espécie do artrópode vetor (mosquito ou carrapato) será definida pela capacidade do vírus infectar e replicar neste invertebrado. Enquanto o(s) hospedeiro(s) será definido inicialmente pela preferência alimentar do vetor, entre outros fatores. Além disso, outros importantes aspectos do vetor também são importantes como seu alcance geográfico, as condições ambientais em que ocorre e capacidade de transmitir o vírus para diferentes hospedeiros (COLPITTS *et al.*, 2012; CIOTA; KRAMER, 2013).

O ciclo epidemiológico de transmissão de WNV é mantido por vetores invertebrados, principalmente mosquitos do gênero *Culex* e espécies de aves susceptíveis (ciclo enzoótico). Ocasionalmente, mamíferos como o ser humano e os equídeos são infectados, porém, são considerados hospedeiros terminais não sendo capazes de contaminar os vetores novamente, caracterizando o ciclo como epizoótico. Eventualmente, outros vertebrados também podem ser infectados pelo vírus, mas não apresentam, até o momento, importância no ciclo epidemiológico da doença (HAYES *et al.*, 2005; PELLO; OLSEN, 2013; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

3.4.1 Transmissão

A transmissão de WNV ocorre através da picada do mosquito infectado no hospedeiro vertebrado. Quando infectadas, as fêmeas transmitem o vírus presente na saliva durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (HAYES *et al.*, 2005). Além da infecção durante sua alimentação, ocorre também transmissão do vírus para a prole (transovariana). Em ambas situações, uma vez infectado, o inseto é portador do vírus por toda sua vida, sendo um reservatório natural (CIOTA; KRAMER, 2013; BRASIL, 2019a).

Embora a transmissão seja primariamente vetorial, foram observados casos humanos de infecção iatrogênica através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos, assim como por amamentação e transplacentária (PEALER *et al.*, 2003; IAWAMOTO *et al.*, 2003; HAYES; O'LEARY, 2004; RIOS *et al.*, 2007).

A primeira identificação de transmissão via transfusão foi em 2002, durante a epidemia de WNV nos EUA, com a confirmação de 23 pacientes que adquiriram o vírus após o procedimento (PEALER *et al.*, 2003). A transmissão através do transplante de órgãos foi observada no mesmo período após pacientes transplantados apresentarem febre e desordem neurológica (IAWAMOTO *et al.*, 2003).

Em 2003, a transmissão viral via transplacentária ocorreu em uma mulher que apresentou quadro de paresia resultante da infecção por WNV, dois meses antes do parto. Como consequência da infecção intrauterina, foram observadas no recém-nascido má formação do SNC e problemas oculares devido a alterações na retina (ALPERT *et al.*, 2003).

Além disso, a detecção do vírus em amostras de urina de pacientes humanos sugere outra provável fonte de contaminação, porém mais estudos são necessários para esclarecer o papel epidemiológico do vírus na urina (BARZON *et al.*, 2013; MURRAY *et al.*, 2017).

A transmissão sem atuação do vetor também foi descrita em uma espécie de crocodilo (*Crocodylus porosus*). Neste caso, a transmissão horizontal ocorreu, aparentemente, por contato através de lesões na pele dos animais (HABARUGIRA *et al.*, 2020b). Nas espécies de aves susceptíveis, pode também ocorrer contaminação horizontal sem vetor através de contato com feridas contaminadas, por exemplo, além da transmissão por ingestão de presas contaminadas (KOMAR *et al.*, 2003; GAMINO; HÖFLE, 2013; PELLO; OLSEN, 2013).

Komar e colaboradores (2003) realizaram uma infecção experimental utilizando vinte e cinco espécies de aves silvestres pertencentes a diferentes ordens (Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Gruiformes, Passeriformes, Piciformes, Psittaciformes e Strigiformes) para avaliar a infecção por WNV. Os autores identificaram a ocorrência de transmissão por contato em quatro espécies, bem como via oral em cinco espécies, indicando diferentes formas de transmissão nestes animais. Contudo, a relevância dessas vias de infecção nestes

hospedeiros, comparativamente à infecção vetorial, ainda precisa ser definida no ciclo epidemiológico do vírus.

Adicionalmente, a transmissão relacionada com risco ocupacional merece destaque, principalmente entre os profissionais que trabalham na saúde humana em contato direto com pacientes, veterinários que manipulam material de animais hospedeiros, bem como os que trabalham com diagnóstico do vírus em laboratório (VONESCH *et al.*, 2019; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Além disso, os trabalhadores do campo, como agricultores também são considerados grupo de risco, devido à proximidade com condições favoráveis como a presença do vetor, bem como, em algumas regiões, de aves susceptíveis (VIEIRA *et al.*, 2015; VONESCH *et al.*, 2019).

Embora a viremia nos equídeos seja caracterizada por baixa carga viral, os profissionais que manipulam o sistema nervoso de animais positivos devem ter cuidado durante todo o processo de necropsia e diagnóstico. No ano de 2010 na África do Sul, transmissão após contato com o SNC de um cavalo positivo durante a necropsia do animal foi identificada em um estudante de veterinária. Sinais clínicos como febre, mialgia, cefaleia e mal-estar foram observados seis dias após o procedimento e posterior confirmação através de testes moleculares identificaram WNV no soro do paciente e em material coletado (cérebro) após inoculação em camundongo (VENTER *et al.*, 2010)

Complementarmente, estudos sorológicos também na África do Sul identificaram anticorpos em 10 dos 123 veterinários avaliados através do teste ELISA, indicando a necessidade da aplicação de medidas protetivas e de controle entre os profissionais considerados grupo de risco na contaminação viral (VAN EEDEN *et al.*, 2014).

O conhecimento das rotas de transmissão de WNV permitirá que medidas de controle e prevenção sejam adotadas de forma adequada. As diferentes formas de transmissão do vírus observadas nos hospedeiros vertebrados, indicam a necessidade de medidas protetivas mais abrangentes, que vão além do controle do vetor.

3.4.2. Vetores

A fêmea da espécie de mosquito competente torna-se infectada após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado virêmico. No vetor, a amplificação viral ocorre no intestino e, posteriormente, nas glândulas salivares, para ser inoculado no hospedeiro vertebrado durante a hematofagia (HAYES *et al.*, 2005; COLPITTS *et al.*, 2012; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Contudo, a identificação do vírus em outros tecidos do vetor, como sistema nervoso, e adiposo, indica que a replicação viral nestes invertebrados não ocorre apenas no intestino médio (GIRARD *et al.*, 2004). Entretanto, o WNV não ocasiona doença no mosquito, que constitui importante reservatório natural do vírus (HAYES *et al.*, 2005; COLPITTS *et al.*, 2012).

Os mosquitos do gênero *Culex*, como já mencionado, são considerados os principais vetores no ciclo de transmissão e na manutenção do vírus na natureza (CANTILE *et al.*,

2000; CIOTA; KRAMER, 2013; HAYES *et al.*, 2005). Os culicídeos são ornitofílicos e estão amplamente distribuídos em todo o mundo (Figura. 3), principalmente em regiões de clima tropicais e subtropicais onde a temperatura (25 a 30 °C) e umidade favorecem sua atividade e proliferação (HAYES *et al.*, 2005; ECDC, 2013).

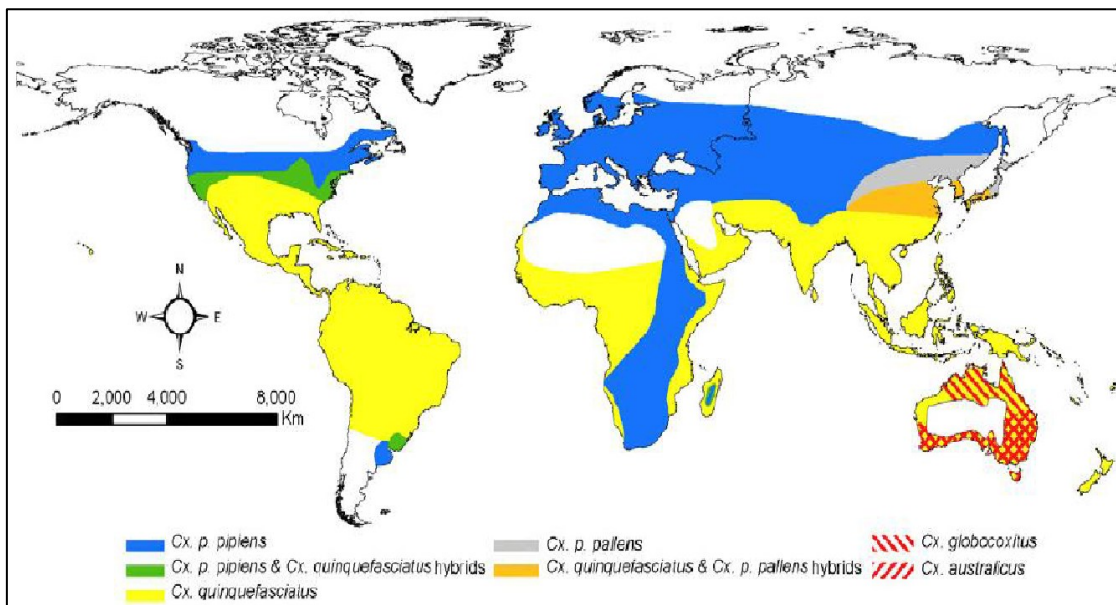


Figura 3. Distribuição do complexo *Culex pipiens* no mundo. Azul: *Cx. p. pipiens*; Verde: *Cx. p. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* híbrido; Amarelo *Cx. quinquefasciatus*; Cinza: *Cx. p. pallens*; Laranja: *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. p. pallens* híbridos; Faixas vermelhas sobrepostas (região da Austrália): *Cx. globocoxitus*; Vermelho com pontos amarelos (região da Austrália): *Cx. australicus*. (Adaptado de CIOTA; KRAMER, 2013).

A atividade de diapausa, que consiste em uma diminuição da atividade fisiológica e de comportamento, pode ser visto na fase larvária e adulta, sendo um mecanismo de sobrevivência durante períodos de condições ambientais adversas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; NASCI *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2019). Este estado de “dormência” foi identificado em espécies do gênero *Culex*, *Cx. pipiens* e *Cx. tarsalis*, por exemplo, sugeridas como as responsáveis pela manutenção de WNV durante o período de inverno nos EUA (NASCI *et al.*, 2001; CIOTA; KRAMER, 2013).

Desta forma, os mosquitos uma vez contaminados durante a alimentação no hospedeiro ou através da transmissão vertical, são reservatórios do vírus e a diapausa permite que eles sobrevivam durante o inverno, voltem a atividade com o aumento das temperaturas e, conseqüentemente, efetuem a transmissão do vírus em uma região. Assim, um aumento de casos deste arbovírus logo no final do inverno e início da primavera são comumente observados em alguns países (CIOTA; KRAMER, 2013; NASCI *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001).

A diversidade de espécies de *Culex* observada como competentes para transmissão de WNV é muito ampla, assim como a sua localização nos continentes. Na década de 50, no Egito, pesquisa com *pool* de mosquitos *Culex* spp. demonstrou positividade nas espécies

Culex antennatus, *Cx. pipiens* e *Cx. univittatus* (TAYLOR *et al.*, 1956). Na Europa, os mosquitos incluídos no complexo *Cx. pipiens* como *Cx. pipiens*, *Cx. Quinquefasciatus* e *Cx. australicus*, parecem ser os principais responsáveis pela transmissão do vírus no continente. Contudo, outras espécies também estão relacionadas com eventos do vírus nos países europeus, como o *Cx. modestus*, reportado como responsável pela ocorrência dos casos em Camargue na França na década de 60 (OUDAR *et al.*, 1971; ANGENVOORT *et al.*, 2013; ECDC, 2013).

Além de *Cx. pipiens*, outras espécies como *Cx. fatigans*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui*, *Cx. bitaeniorhynchus* e *Cx. perexiguus* foram relacionadas com o vírus em diversos países asiáticos (MURGUE *et al.*, 2001a; WEINBERGER *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Na África, o vírus já foi identificado em *Cx. antennatus*, *Cx. univittatus*, *Cx. theileri*, *Cx. neavei*, *Cx. poicilipes*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. neavei* (MURGUE *et al.*, 2001a; HAYES *et al.*, 2005; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). O *Cx. quinquefasciatus* assim como *Cx. australicus* e *Cx. squamosus* já foram identificados como vetores competentes para WNV na Austrália, porém sugere-se que a espécie *Cx. annulirostris* seja o principal vetor no país e responsável pela transmissão da variante Kujin (HAYES *et al.*, 2005; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

No continente americano, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* e *Cx. Interrogator* também foram associadas ao vírus (ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA, 2013). Nos EUA após o surto de WNV em 1999, o vírus foi encontrado em mais de 52 espécies de mosquitos deste gênero, entretanto, o maior número de mosquitos positivos e que possivelmente estavam relacionados com a infecção na população, foram das espécies *Cx. pipiens*, *Cx. tarsalis* e *Cx. quinquefasciatus* (BERNARD *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005).

No Brasil, a ocorrência da espécie *Cx. quinquefasciatus* é muito comum, principalmente nas áreas urbanas, sendo popularmente conhecido como pernilongo (BRASIL, 2011; VIEIRA *et al.*, 2015). A ocorrência de WNV tem aumentado no país desde 2018 indicando a necessidade de mais estudos nesta espécie de mosquito bem como em outras espécies competentes para transmissão viral e residentes no território (BAYEUX *et al.*, 2019).

O gênero *Culex* constitui vetor não apenas para o WNV, mas também para outros importantes arbovírus como JEV, SLEV, WEEV, entre outros (CONWAY *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2020). Desta forma, o diagnóstico diferencial para WNV na população de *Culex* deve incluir outros vírus transmissíveis por estes mosquitos.

Espécies de mosquitos incluídos em outros gêneros, como *Aedes* e *Anopheles*, já foram positivos para o vírus e podem também atuar como vetores de WNV (MURGUE *et al.*, 2001a; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). *Aedes albopictus*, por exemplo, foi utilizado com sucesso na infecção experimental em equinos e sua competência como vetor foi demonstrada (BUNNING *et al.*, 2002; HOLICK *et al.*, 2002). Além disso, o cultivo celular

proveniente desta espécie é amplamente utilizado para replicação de WNV *in vitro* (CHU *et al.*, 2006; SINGH, 1972). Outras espécies do mesmo gênero, como *Ae. cantans*, *Ae. capsius* e *Ae. exerudans* foram associadas a transmissão do vírus na Rússia (MURGUE *et al.*, 2002)

Adicionalmente, WNV já foi isolado em carrapatos, porém a competência na transmissão do vírus por estes artrópodes não foi comprovada (CANTILE *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005). Em infecção experimental com *Ornithodoros savignyi* e *Or. erraticus*, por exemplo, estes foram capazes de adquirir infecção ao se alimentar de cobaias positivas, porém não conseguiram transmitir o vírus (TAYLOR *et al.*, 1956).

3.4.3 Aves

As aves, como já mencionado, são hospedeiros naturais no ciclo epidemiológico de WNV sendo amplificadores virais contribuindo para manutenção do vírus na natureza. No entanto, entre as diversas espécies aviárias, a susceptibilidade, quadro clínico e mortalidade é variável (JUPP, 2001; KOMAR *et al.*, 2003; PELLO; OLSEN, 2013).

Há diferenças na susceptibilidade entre as espécies de aves domésticas. As galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e perus (*Meleagris gallopavo*) podem se infectar naturalmente pelo vírus não apresentando doença clínica ou mortalidade, porém, podem atuar como sentinelas na detecção viral em uma região por apresentarem anticorpos anti-WNV (HEALY *et al.*, 2015; TOLSÁ *et al.*, 2018). Contudo, mortalidade foi observada em gansos domésticos (*Anser anser domesticus*) em Israel indicando uma alta susceptibilidade desta espécie ao vírus (BIN *et al.*, 2001; GAMINO; HÖFLE, 2013).

As espécies silvestres, por sua vez, são consideradas mais relevantes no ciclo natural de transmissão do vírus. Embora o conhecimento da patogenia nas aves selvagens não seja amplamente conhecido, mais de 300 espécies já foram descritas como susceptíveis à infecção por WNV (CDC, 2013; PELLO; OLSEN, 2013). Contudo, a expressão clínica em aves silvestres é muito variável. Algumas espécies apresentam alta susceptibilidade com alta carga viral e taxas de mortalidade significativas, outras são acometidas de forma mediana com doença clínica, mas baixa mortalidade e há espécies de aves consideradas reservatórios-naturais de WNV, mas que não apresentam morbidade e/ou mortalidade (KOMAR *et al.*, 2003; GAMINO; HÖFLE, 2013; PELLO; OLSEN, 2013).

Espécies como o corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*), o grackle comum (*Quiscalus quiscula*), gaio-azul (*Cyanocitta cristata*), tentilhão doméstico (*Carpodacus mexicanus*) e o pardal (*Passer domesticus*) incluídas na ordem Passeriforme e as espécies borrelho-de-dupla-coleira (*Charadrius vociferus*) e gaviota-de-bico-manchado (*Larus delawarensis*) da ordem Charadriiforme, estão entre as aves com alta susceptibilidade ao vírus WNV, apresentando carga viral e taxas de mortalidades significativas (STEELE *et al.*, 2000; EIDSON *et al.*, 2001; KOMAR *et al.*, 2003; PELLO; OLSEN, 2013).

No surto inicial em 1999 nos EUA, o WNV foi isolado de aves residentes em zoológicos e também aves de vida livre no Estado de Nova York, sendo que possivelmente as

espécies de corvídeos estiveram particularmente envolvidas na rápida transmissão e disseminação do vírus no país (EIDSON *et al.*, 2001; STEELE *et al.*, 2000). Em *Passer domesticus*, espécie amplamente distribuída em diversos continentes, infecção experimental demonstrou persistência do vírus em baço e rins por até 43 dias indicando relevância da espécie como amplificador viral (NEMETH *et al.*, 2009).

Algumas espécies oligossintomáticas ou mesmo assintomáticas, podem apresentar altos títulos virais. Na África, por exemplo, cerca de 30 espécies de aves são hospedeiros do vírus apresentando altos títulos, porém, aparentemente elas não apresentam doença clínica e mortalidade associada à infecção (JUPP, 2001).

Sintomatologia clínica e/ou mortalidade com consequente identificação do vírus também já foram observados em espécies das ordens Falconiformes, Columbiformes, Anseriformes, Piciformes, entre outras (KOMAR *et al.*, 2003; PELLO; OLSEN, 2013). Além disso, anticorpos anti-WNV já foram identificados em espécies de Psittaciformes que possuem maior proximidade com o homem no ambiente doméstico, tais como a calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e o papagaio cinza-africano (*Psittacus erithacus*), porém aspectos como susceptibilidade e participação destas espécies na transmissão do vírus ainda não foram elucidados (PELLO; OLSEN, 2013).

Algumas das espécies de aves silvestres identificadas como reservatórios em potencial do vírus como *Falco sparverius*, *Charadrius vociferus* e *Larus delawarensis*, possuem comportamento migratório (KOMAR *et al.*, 2003). Estudos apontam que a movimentação de aves pode ter sido responsável pela introdução do vírus na Europa, bem como por sua dispersão entre os Estados nos EUA, indicando a importância das aves migratórias na epidemiologia do vírus (RAPPOLE; HUBÁLEK, 2003; ROEHRIG, 2013).

No Brasil, embora a detecção até o momento tenha sido apenas por técnicas sorológicas em aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*), o país apresenta espécies silvestres que podem ser potenciais reservatórios de WNV bem como de outros importantes arbovírus (FIGUEIREDO, 1998; MELANDRI *et al.*, 2012). Destaca-se a ocorrência de muitas espécies positivas para WNV em outros países e que possuem caráter migratório como a Garça-real-européia (*Ardea cinerea*), Garça-moura (*Ardea cocoi*), o Gavião-de-asa-larga (*Buteo platypterus*), Maçarico-branco (*Calidris alba*), Vira-pedra (*Arenaria interpres*), Bacurau-norte-americano (*Chordeiles minor*) e Mariquita-boreal (*Seiurus noveboracensis*), bem como a ampla distribuição do pardal (*Passer domesticus*) no país (ARAÚJO *et al.*, 2004; PETRY *et al.*, 2006).

Devido à grande diversidade de espécies aviárias susceptíveis ao WNV e a extensa variabilidade no quadro clínico, viremia, mortalidade, entre outros aspectos, são necessários mais estudos para entender a atuação das diferentes espécies nativas no ciclo epidemiológico deste arbovírus, bem como a estreita relação destas espécies com o acometimento da população humana.

Além disso, como as aves também constituem hospedeiros de outros arbovírus, é necessário estabelecer o diagnóstico diferencial para outros patógenos como EEEV, WEEV e SLEV (WEAVER., 2005).

3.4.4 Mamíferos: homem e equídeo

Os equídeos e os seres humanos são hospedeiros terminais, ou seja, não desenvolvem viremia suficiente para uma transmissão ao mosquito vetor e consequente continuidade do ciclo de transmissão viral (BUNNING *et al.*, 2002; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; COLPITTS *et al.*, 2012; HAYES *et al.*, 2005).

Adicionalmente, destaca-se que embora os equídeos (equinos, asininos e muares) sejam colocados como hospedeiros de WNV, os estudos até o momento são direcionados para os equinos com poucas publicações nos demais, asininos e muares (SCHMID; MANSORY 1963; MURGUE *et al.*, 2001; SALAZAR *et al.*, 2004; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2012). Porém, sugere-se que todos eles podem ser susceptíveis a infecção por WNV (MURGUE *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2019).

No ser humano alguns fatores que debilitam o sistema imune constituem elementos que podem favorecer a infecção por WNV. Pessoas com idade avançada, transplantados, hipertensos e imunossuprimidos são considerados grupo de risco sendo mais susceptíveis a infecção (MONTGOMERY; MURRAY, 2015).

Embora a morbidade nestes hospedeiros seja relativamente baixa, o vírus pode ocasionar graves desordens neurológicas, em 8 -10% dos equídeos e 1% da população humana, que pode resultar no óbito do hospedeiro (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; DAVIS *et al.*, 2006; ANGENVOORT *et al.*, 2013).

No surto inicial de WNV nos EUA, de 1999 a 2006, um total de 9.843 pessoas apresentaram doença neurológica e foi registrado óbito de 962 pacientes acometidos pelo vírus (KRAMER *et al.*, 2008). Neste mesmo período, mais de 23 mil casos de WNV e taxa de mortalidade de 38 a 57% no rebanho equino americano foram reportados (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019).

Na Europa, onde casos humanos por WNV se iniciaram na década de 50, no período de 2013 a 2017, foram reportados 847 pessoas e 553 equinos acometidos pelo vírus em 13 países (Áustria, Bulgária, Croácia, Chipre, França, Grécia, Hungria, Itália, Portugal, Espanha, República Checa, Romênia e Eslovênia) (YOUNG *et al.*, 2019).

Além dos impactos com a mortalidade, perdas econômicas decorrentes dos surtos deste e de outros arbovírus constituem entraves na saúde pública (PETERSEN, 2019). Após os primeiros casos de WNV e a crescente ocorrência de eventos na população nos EUA, mais de 20 milhões de dólares foram destinados para o contingenciamento do vírus com investimentos em pesquisas e diagnóstico (ROERING, 2013).

Adicionalmente, pode-se observar prejuízos também na equideocultura com gastos milionários com serviços veterinários, produção e viabilização de vacinas bem como menor disponibilização dos animais no uso para trabalho e outras atividades (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019).

3.4.5 Outros hospedeiros

Além dos hospedeiros mencionados, WNV já foi identificado em uma ampla gama de espécies de animais domésticos como cães, gatos, vacas, camelos e também selvagens como esquilos, espécies de morcegos, rinocerontes, lêmures, leopardos, elefantes, roedores, bugios, algumas espécies de mamíferos marinhos, anfíbios, jacarés, entre outras (TAYLOR *et al.*, 1956; HAYES *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2017; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

No entanto, nenhuma das espécies citadas desenvolve alta viremia e assim não podem ser considerados importantes reservatórios bem como fonte de infecção de WNV para o vetor. Desta forma, somente espécies de aves, aparentemente, são hospedeiros capazes de perpetuar a infecção viral após a picada do mosquito vetor (HAYES *et al.*, 2005; HABARUGIRA *et al.*, 2020a)

A infecção por WNV nos répteis parece resultar em viremia mais significativa devido a transmissão horizontal descrita entre espécies de crocodilo marinho (*Crocodylus porosus*) (HABARUGIRA *et al.*, 2020b). Porém, mais estudos são necessários para elucidar a contribuição de répteis no ciclo epidemiológico de WNV.

3.5 - Infecção por WNV nos equídeos

3.5.1. Relação histórica – 61 anos de WNV nos rebanhos equídeos

Embora a primeira descrição de infecção por WNV tenha ocorrido em seres humanos em 1937 em Uganda, os primeiros casos de infecção nos equídeos foram observados na década de 1950 no delta do Nilo no Egito. Em 1959, estudo com 436 equídeos (cavalos, burros e mulas) encontraram mais de 50% de animais positivos na sorologia e o vírus foi isolado de um dos cavalos avaliados que apresentava desordem neurológica e veio a óbito 60 horas após início dos sinais clínicos. Adicionalmente, infecções experimentais foram realizadas nestes animais avaliando a participação dos equídeos no ciclo de transmissão de WNV (SCHMID; MONSORY, 1963). Estes achados corroboraram com estudos de sorologia realizados em aves e na população humana no Egito no mesmo período, indicando a alta circulação do vírus na região (TAYLOR, 1956; MURGUE *et al.*, 2002).

Posteriormente, em 1962, WNV voltou a ser identificado em equinos na região de Camargue, na França, em que cerca de 80 cavalos que apresentaram alterações neurológicas e taxas de mortalidades de 25% a 30% (MURGUE *et al.*, 2001). Na mesma década, estudos sorológicos foram realizados e identificaram anticorpos contra o vírus em animais saudáveis e com sinais clínicos sugestivos da doença. Além disso, em 1965,

o vírus foi isolado da medula de um dos cavalos com sinais neurológicos e que veio a óbito (MURGUE *et al.*, 2002).

O próximo surto foi observado no Marrocos em 1996 com acometimento de 94 cavalos e mortalidade de 44% (MURGUE *et al.*, 2002). Adicionalmente, o vírus voltou a ser identificado também na Europa em 1998, com o acometimento de 14 cavalos na Itália (CANTILE *et al.*, 2000; AUTORINO *et al.*, 2002). Além do isolamento viral em dois dos animais que vieram a óbito, um estudo de soroprevalência com 282 cavalos identificou que 38% dos equinos avaliados eram positivos para WNV na região italiana estudada (AUTORINO *et al.*, 2002).

Paralelamente, cavalos com síndrome neurológica apresentaram anticorpos contra WNV em Israel, indicando a circulação do vírus no país (MURGUE *et al.*, 2001). Além disso, no mesmo período foi observada mortalidade de gansos domésticos (*Anser anser domesticus*) positivos para o vírus (BIN *et al.*, 2001; MURGUE *et al.*, 2002).

Na década de 90 os casos de WNV não eram mais esporádicos e o número de surtos da doença, assim como a gravidade dos casos, cresceu nos equídeos, bem como na população humana e nas aves (CASTILLO OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Consequentemente, o vírus que já havia sido identificado na Europa, Ásia, África e Oceania, alcançou uma extensão quase que global chegando ao continente americano.

A primeira identificação de casos positivos para WNV em cavalos nos EUA ocorreu em Nova York simultaneamente aos primeiros casos de encefalite na população humana e mortalidade de corvídeos. Em 1999, foram identificados inicialmente 20 cavalos positivos para o WNV (TROCK *et al.*, 2001). Posteriormente, 60 cavalos apresentaram resultados positivos em sete estados diferentes até o ano 2000, enquanto que, em 2001, mais de 700 animais foram positivos nos testes laboratoriais (OSTLUND *et al.*, 2001; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004).

A disseminação do vírus nos rebanhos equinos americanos foi muito rápida: foram reportados mais de 23 mil casos de 1999 a 2005, sendo mais de 14 mil somente em 2002 (ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004; BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019). Desta forma, a progressão de casos nos EUA alcançou uma proporção jamais descrita anteriormente nos surtos de WNV nos outros continentes. Consequentemente, em 2003, a vacinação foi implementada em algumas regiões do país como medida de prevenção e controle da expansão do vírus nos rebanhos (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019).

Nos anos 2000, foi observado aumento do número de casos nos rebanhos de equídeos de diferentes países caracterizando em alguns casos emergência, bem como reemergência do patógeno. Na França, após 35 anos da detecção no rebanho equídeo, 131 animais (129 cavalos e 2 burros) apresentaram alterações neurológicas e a infecção por WNV foi identificada em 76 animais (MURGUE *et al.*, 2001). Assim como na França, a reemergência deste arbovírus também foi observada em Israel nos anos 2000, com 76 cavalos acometidos neurologicamente, 20% de mortalidade e isolamento viral em quatro dos animais doentes (STEINMAN *et al.*, 2002)

Seguindo o processo de expansão, WNV foi identificado em rebanhos equídeos em outros países do continente americano. Em 2001 o vírus foi detectado nos rebanhos equinos do Canadá (WEESE *et al.*, 2003; CHANCEY *et al.*, 2015). No ano seguinte, casos de encefalite foram observados em equinos no México com detecção sorológica, bem como isolamento viral nestes animais. Além disso, também em 2002, cavalos em Guadalupe foram positivos para o vírus em testes sorológicos (ELISA) (QUIRIN *et al.*, 2004; ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA 2013).

Após, ocorreu a identificação de anticorpos neutralizantes contra WNV em rebanhos equinos em países da América Central: Guatemala, Belize, El Salvador, Cuba, Trinidad e Tobago (2003) e Costa Rica (2004) (MORALES-BETOULLE *et al.*, 2006; PUPO *et al.*, 2006; HOBSON-PETERS *et al.*, 2011; ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA 2013).

Paralelamente, a identificação na América do Sul teve início na Colômbia em 2004, com detecção de anticorpos para o vírus em cavalos (MATTAR *et al.*, 2005). Em 2004 e novamente em 2006, anticorpos para WNV foram relatados em aves e cavalos na Venezuela (BOSCH *et al.*, 2007; ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA 2013). No entanto, o primeiro isolamento do vírus ocorreu na Argentina em 2006, em três cavalos com doença neurológica grave (MORALES *et al.*, 2006).

Desta forma, com o crescente aumento de detecção do vírus no continente americano, inquéritos sorológicos foram realizados em 2009 no Brasil resultando na identificação de 5 cavalos positivos demonstrando evidência da circulação de WNV no país (PAUVOLLID-CORREA *et al.*, 2011). Posteriormente, em 2011, estudos sorológicos também identificaram cavalos positivos nos testes PRNT (teste de neutralização por redução na contagem de placas) na Bolívia (MAZZEI *et al.*, 2013).

Enquanto o vírus se expandia por rebanhos equídeos nas Américas, inúmeros surtos foram reportados no continente europeu, na África, Ásia e Oceania (HABARUGIRA *et al.*, 2020a) No Irã inquéritos sorológicos realizados (2008 – 2009) em mais de 1000 equídeos (844 cavalos, 9 mulas e 201 burros) identificaram anticorpos neutralizantes para WNV em 23,7% dos animais (AHMADNEJAD *et al.*, 2011).

De 2004 a 2010, foram reportados casos de encefalite em equídeos em Portugal, Grécia, Hungria, Itália, Romênia e Espanha (BARROS *et al.*, 2011; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2011; CHANCEY *et al.*, 2015). Além disso, em 2010 a identificação de WNV associado a rebanhos equinos foram observados na África do Sul e Madagascar (VENTER *et al.*, 2017). Em 2011, a variante Kujin, linhagem 1 de WNV foi associada a doença neurológica em cavalos na Austrália (CHANCEY *et al.*, 2015; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Atualmente, WNV é endêmico em várias regiões do mundo (HABARUGIRA *et al.*, 2020; KRAMER *et al.*, 2019). Assim, casos deste arbovírus em equídeos continuam a emergir e reemergir e são continuamente reportados (figura 4). Na Europa 553 casos de equinos positivos foram observados em 8 países (Áustria, Bulgária, França, Espanha,

Grécia, Hungria, Itália e Portugal), de 2013 a 2017, e nos EUA mais de 28 mil casos já haviam sido reportados ao serviço de vigilância animal no final de 2017 (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019; YOUNG *et al.*, 2019).

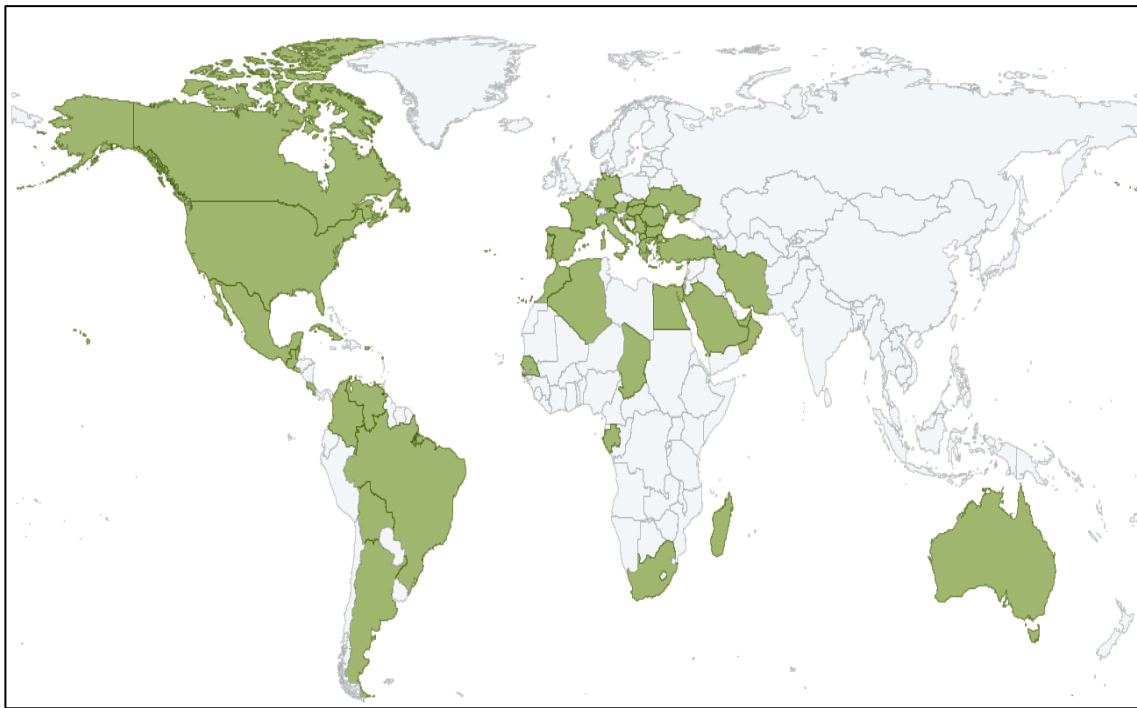


Figura 4. Identificação de WNV em equídeos no mundo. Verde: identificação por sorologia e/ou RNA viral. Cinza: áreas ainda sem identificação de WNV (Baseado em publicações de artigos, notificação OIE, PROMED e Boletim anual da ECDC).

Em 2013 foi identificada a primeira evidência sorológica de WNV em cavalos na Ucrânia (ZIEGLER *et al.*, 2013). Posteriormente, no ano de 2018 a primeira epizootia de WNV envolvendo cavalos e aves foi identificada na Alemanha indicando a circulação do vírus no país (ZIEGLER *et al.*, 2019, 2020).

Recentemente, também em 2018, WNV foi identificado em quatro equídeos com quadro de infecção neurológica grave no Brasil. O diagnóstico constituiu a primeira detecção direta e isolamento do vírus no país (MARTINS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

As epizootias nos equídeos em diversos países foram atribuídas a linhagem 1 do vírus (KRAMER *et al.*, 2008). No entanto, em 2009 a identificação da linhagem 2 em cavalos no sul da África demonstrou a susceptibilidade destes animais a mais uma linhagem (VENTER *et al.*, 2009). Além disso, desde de 2010, a linhagem 2 também tem sido associada a casos de WNV em humanos e cavalos em países europeus, como Romênia, Grécia, Itália e Hungria (KUTASI *et al.*, 2011; HÉRNANDEZ-TRIANA, 2014; VEO *et al.*, 2019; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Diferentes fatores podem estar relacionados com a ocorrência e expansão mundial do WNV. Dentre eles, estão a presença de vetores competentes que favorece a transmissão viral, assim como a de aves susceptíveis (CIOTA; KRAMER, 2013). Sugere-se que a entrada do vírus em países considerados endêmicos, ocorreu através de aves migratórias (RAPPOLE; HUBALEK, 2003). Adicionalmente, na avaliação de sequências de vírus dos EUA e Israel, por exemplo, foi observada similaridade indicando uma conexão entre os surtos e assim a possível origem israelita do vírus para o continente americano (LANCIOTTI *et al.*, 2002; ROERHING, 2013).

3.5.2 Infecção experimental – Definição do papel dos equídeos no ciclo epidemiológico de WNV

Para compreender o desenvolvimento da infecção de WNV nos equídeos bem como a atuação destes animais no ciclo de transmissão viral, diversos estudos de infecção experimental foram realizados. Inicialmente, em experimento ao final da década de 50 com 3 cavalos e 6 burros com inoculação via subcutânea e intravenosa, não houve reprodução da doença clínica em grande parte dos animais, embora uma viremia quase indetectável foi constada na maioria destes através de inoculação e passagens seriadas em camundongos. Apenas dois asininos apresentaram algum sinal de infecção após inoculação, com pirexia branda, não reproduzindo com fidelidade o quadro clínico identificado nos animais a campo. Assim, diante dos resultados de pouca evidência de doença clínica, viremia baixa e transitória bem como resposta imune pouco responsiva, identificada através de testes de neutralização e inibição de hemaglutinação (HI), os autores sugerem que estes animais, embora hospedeiros de WNV, não possuem papel relevante no ciclo epidemiológico viral (SCHMIDT; MANSORY, 1963).

Posteriormente, no final da década de 60 um grupo de pesquisa na França através de avaliação clínica, histopatológica, isolamento viral e de sorologia, observaram resultados neurológicos leves após inoculação experimental em 10 equídeos (1 burro e 9 cavalos). Os sinais clínicos de febre e ataxia foram observados, aproximando mais do quadro apresentado na infecção natural. Porém, uma viremia de baixa intensidade também foi observada nos animais. Além disso, estes experimentos avaliaram diferentes vias de inoculação (subcutânea, intravenosa e intracerebral) sendo que a última via resultou em efeitos mais graves que as demais vias de aplicação, com um óbito mais precoce. Contudo, foi observada neste mesmo animal uma viremia ainda mais baixa e efêmera que os demais (JOUBERT *et al.*, 1971; OUDAR *et al.*, 1971).

Entretanto, em outro experimento de infecção experimental foram possíveis resultados mais elaborados. Nos anos 2000, Bunning e colaboradores (2002) buscaram reproduzir a infecção natural por WNV através da inoculação de estirpe viral (BC787 e NY99-6625 isolados de NY99 linhagem 1 de WNV) via mosquitos *Aedes albopictus* infectados.

Os animais eram avaliados clinicamente duas vezes ao dia nos primeiros 10 dias pós infecção (PI) e uma vez ao dia até 28 dias PI, além disso coleta de sangue bem como swab

oral e retal foram efetuadas no mesmo esquema da análise clínica. Fragmentos do SNC (cérebro e medula) foram obtidos em necropsia após a eutanásia. Para as análises, as metodologias utilizadas foram técnicas como ELISA com captura de IgM, ensaio de neutralização, bem como a quantificação viral por ensaio de unidades formadoras de placa em cultivo celular (Vero) nas amostras do SNC coletadas dos equinos e saliva dos insetos.

Como resultado, dos 12 equinos expostos aos mosquitos infectados, sete apresentaram viremia de $10^{1,0}$ a $10^{3,0}$ PFU/mL que foi detectada no soro no período de 1 a 6 dias após infecção. Contudo, apenas um animal desenvolveu um quadro de encefalite apresentando título viral maior nos tecidos do SNC (10^4 a $10^{6,8}$ PFU/tecido) (BUNNING *et al.*, 2002).

Além disso, objetivando responder sobre a relação dos vetores com cavalos infectados, 652 mosquitos da espécie *Aedes albopictus* negativos para o vírus foram colocados em contato com os cavalos positivos do experimento e, como resultado, nenhum dos vetores se contaminou com o vírus indicando que a carga viral (viremia) dos animais não foi capaz de promover a infecção dos mesmos (BUNNING *et al.*, 2002).

Desta forma, as infecções experimentais mencionadas demonstraram baixa e transitória viremia, sugerindo assim os equídeos como hospedeiros terminais do ciclo de transmissão de WNV. No entanto, a manifestação clínica mais grave observada nas infecções naturais pelo vírus nestes animais não foi caracterizada nestes trabalhos.

Adicionalmente, destaca-se que estes estudos pioneiros trabalharam com estirpes da linhagem 1 de WNV, que é a mais comumente observada no mundo. Contudo, devido ao número crescente de casos com a linhagem 2 de WNV na Europa e África, sugerem-se que novas pesquisas sejam conduzidas com a linhagem emergente para avaliar sua patogenicidade nestes animais (VENTER *et al.*, 2009; HÉRNANDEZ-TRIANA *et al.*, 2014).

3.5.3. Características da infecção de WNV nos equídeos

A infecção por WNV nos equídeos é caracterizada por uma viremia transitória e com baixa carga viral, de caráter neurotrópico sendo sua ocorrência na forma subclínica mais comum. A taxa de morbidade nestes animais é em torno de 50%, porém apenas uma pequena parcela pode desenvolver sinais clínicos mais graves (CANTILE *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2000; BUNNING *et al.*, 2002; CATILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004)

Após a picada do mosquito vetor infetado, o período de incubação é de 3 a 15 dias (OIE, 2018). Posteriormente, a fase virêmica se estende até o início dos sinais clínicos sendo dificilmente detectada no animal (CATILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGEVOORT *et al.*, 2013). Sugere-se que o período de viremia seja em torno de 1 a 6 dias, porém já foi observada em períodos ainda mais curtos, 1 a 3 dias, nas infecções experimentais (SCHMIDT; MANSOURY, 1963; BUNNING *et al.*, 2002; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Adicionalmente, a febre, quando presente, é geralmente

de caráter efêmero nos animais afetados, corroborando com o indicativo de uma viremia de curta duração (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2001; SCHULER *et al.*, 2004; SALAZAR *et al.*, 2004).

A baixa carga viral nos equídeos foi observada em infecções experimentais, como já mencionado, e natural pelo vírus (SCHMIDT; MANSOURY, 1963; JOUBERT *et al.*, 1971; OUDAR *et al.*, 1971; BUNNING *et al.*, 2002; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Estudos desenvolvidos durante o surto de WNV em 1999 nos EUA identificaram títulos virais abaixo de $10^{2,5}$ TCID₅₀/mL nos cavalos enquanto que, uma infecção experimental em equinos observou títulos de no máximo 10^3 PFU/mL no soro dos animais desafiados (BUNNING *et al.*, 2002). Comparativamente, pesquisas com a espécie *Culex tarsalis*, indicaram que mais de 70% dos mosquitos se tornaram infectados após consumo de sangue com título viral acima de $10^{7,1}$ PFU/mL. Desta forma, a carga viral no sangue de um equídeo positivo, assim como o ser humano, não seria o suficiente para transmitir este arbovírus para o vetor (HAYES *et al.*, 2005).

A idade avançada é considerada um fator de risco para agravamento da infecção por WNV nos seres humanos, porém, nos equídeos, a doença, aparentemente, não ocorre com maior gravidade nos animais idosos. A exemplo dos surtos neurológicos nestes animais descritos em todo mundo, vê-se o acometimento de animais muito jovens até idosos, não sendo, portanto, a idade um fator de risco nestes hospedeiros (OSTLUND *et al.*, 2000,2001; CANTILE *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2019; SCHVARTZ *et al.*, 2020). Adicionalmente, o primeiro isolamento deste vírus em equídeos ocorreu no Egito em um cavalo com encefalite de 12 anos de idade enquanto que o isolamento do vírus na França foi em um equino, também com encefalite, porém mais jovem com 6 meses de idade (HAYES, 2001; MURGUE *et al.*, 2001).

Em relação ao sexo, embora em alguns trabalhos o acometimento de fêmeas foi superior aos machos da espécie, o sexo do animal parece também não ter relação direta com a susceptibilidade ao vírus, não sendo encontrada qualquer correlação até o momento (CANTILE *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2006).

A raça dos animais também não foi considerada como fator de risco para o desenvolvimento da infecção e doença (OSTLUND *et al.*, 2000). Adicionalmente, a imunidade prévia é considerada fator de proteção, obtida por exemplo por vacinação, sendo a ausência de vacinação fator que pode contribuir para desenvolvimento da doença clínica e possível óbito do animal (WARD *et al.*, 2006).

A espécie é sugerida como um fator de risco para desenvolvimento da infecção com a possibilidade dos asininos e muares serem, comparativamente aos equinos, mais resistentes a infecção e doença por WNV (SALAZAR *et al.*, 2004; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2012).

3.5.4 - A relação de WNV com asininos e muares

A população de asininos (*Equus asinus*) e muares (*E. caballus* x *E. asinus*) corresponde mais de 58 milhões em todo mundo, porém é menos expressiva quando comparada à população de equinos em cada país. Além disso, o rebanho destes animais está mais concentrado no continente asiático bem como em alguns países da África e América do Sul (FAO, 2020).

A utilização destes animais está diretamente relacionada com uso para carga e tração, sendo mais associado às famílias de renda mais baixa (CARNEIRO *et al.*, 2018; CÂMARA *et al.*, 2020). Estas espécies são susceptíveis a diversas infecções virais, incluindo vírus encefálicos classificados nos gêneros *Varicellovirus*, *Alphavirus* e *Flavivirus*. Entre os flavivírus está WNV, um arbovírus emergente e de importância na sanidade dos equídeos (CASTLLO-OLIVARES; WOOD, 2004; CÂMARA *et al.*, 2020).

A infecção por WNV é observada nos asininos e muares desde o final da década de 50 com testes sorológicos e infecção experimental no Egito. Nas técnicas sorológicas foram identificados anticorpos para o vírus em 67% de cavalos, 47% dos burros e 44% das mulas avaliadas, sendo os títulos de anticorpos encontrados nestes animais superiores aos da população humana estudada (SCHMIDT; MANSORY 1963; TAYLOR *et al.*, 1956). A inoculação experimental, por sua vez, resultou em um quadro febril brando nos dois burros inoculados (SCHMIDT; MANSORY, 1963). Posteriormente, nova infecção experimental foi realizada no final da década de 60 na França, resultando em manifestação clínica quase imperceptível no asinino (JOUBERT *et al.*, 1971; OUDART *et al.*, 1971).

Com o crescimento dos casos de WNV em diversos continentes, estudos foram implementados para auxiliar na vigilância epidemiológica do vírus. Continuamente aos estudos de soroprevalência em asininos e muares na década de 50, pesquisas posteriores encontraram anticorpos para o vírus na prevalência de 16,7% (2/12) em soros de mulas e 50% (2/4) em burros no México em 2009, de 0,6% (1/156) em mulas no Brasil em 2009, 9,6% (8/83) em mulas e 4,9% (4/82) em burros no sul da Espanha em 2012, 14,4% (32/222) em burros na Argélia em 2014, 1,28% (3/234) e 20% (14/70) para amostras de soro de burros na Turquia em 2016 e 2018 respectivamente e 12,7% (19/150) no Egito em 2019 (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2009; GARCÍA-BOACANEGRA *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; MEHMET *et al.*, 2016; LAFRI *et al.*, 2017; YILDIRIM *et al.*, 2018; SELIM *et al.*, 2020).

Grande parte destas pesquisas de sorologia foram desenvolvidas em animais clinicamente saudáveis, embora demonstrando a circulação do vírus nestes rebanhos. Desta forma, Garcia-Bocanegra e colaboradores (2012) sugerem o uso destes equídeos como sentinelas nas regiões onde foi adotada vacinação para os rebanhos equinos auxiliando no monitoramento epidemiológico de WNV. Adicionalmente, com a observação dos poucos resultados de estudos com estes animais, alguns autores sugerem que estas espécies são

mais resistentes a infecção por este arbovírus, apresentando um quadro subclínico ou brando da doença (SALAZAR *et al.*, 2004; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2012).

Entretanto, manifestação clínica semelhante ao que ocorre nos cavalos foi observada em asininos. A primeira identificação do vírus através de técnicas moleculares no Brasil ocorreu em cavalos e burros que apresentaram quadros de encefalite aguda (SILVA *et al.*, 2019). Além disso, Murgue e colaboradores (2001) descreveram quadro de desordem neurológica com ataxia e paralisia em um burro positivo para WNV na França.

Recentemente a linhagem 1 de WNV foi associada a um quadro neurológico progressivo em um burro (*Equus africanus asinus*) de 30 anos de idade (SCHVARTZ *et al.*, 2020). Desta forma, a possível resistência destes animais à infecção por WNV não foi comprovada até o momento.

Contudo, os estudos abordando a infecção de WNV nos asininos e, principalmente, muares ainda é escasso em comparação com as pesquisas na população de equinos. Como justificativa, sugere-se que o fato de o rebanho destes animais não ser expressivo comparativamente ao dos cavalos e estar mais concentrado em determinados países, contribua para a existência de poucos trabalhos e pesquisas nestes animais.

O trabalho de Salazar e colaboradores (2004) é um dos poucos, se não o único, estudos publicados nos EUA sobre WNV que incluíram asininos e muares. Os autores sugerem que o baixo número de animais destas espécies no estudo pode ser atribuído a uma possível falta de atendimento veterinário, devido a práticas de manejo a que estas espécies são direcionadas. Além disso, o rebanho de asininos e muares não é expressivo nos EUA, sendo maior o contingente de equinos (SALAZAR *et al.*, 2004).

Desta forma, embora tenha sido cogitada diferença em susceptibilidade à infecção por WNV nestas espécies, os estudos são escassos em asininos/muares e mais pesquisas devem ser conduzidas para esclarecer aspectos como morbidade, mortalidade, bem como a patogenia da infecção por WNV. O Brasil possui hoje um dos maiores rebanhos de asininos e muares da América do Sul e assim, constitui possível palco para avaliação epidemiológica de WNV e o papel destes animais (CARNEIRO *et al.*, 2018).

Embora este subtópico tenha sido direcionado apenas para asininos e muares buscando esclarecer alguns pontos da literatura, adiante ao longo da presente revisão, todas as abordagens sobre os aspectos da infecção viral de forma mais ampla e simplificada se refere a todos os equídeos.

3.5.5. Sinais clínicos

A maioria dos casos de infecção por WNV nos equídeos são assintomáticos. Estima-se que cerca de 8 a 10% dos animais infectados desenvolvem doença neurológica, sendo caracterizada por alterações resultantes do acometimento de partes do SNC como

mesencéfalo, rombencéfalo e medula espinhal (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; BOURGEOIS *et al.*, 2011; ANGENVOORT *et al.*, 2013).

Clinicamente, o animal pode apresentar ataxia, fraqueza generalizada ou dos membros, paresia ou paralisia dos membros, fasciculações ou tremores musculares, rigidez ou relutância em caminhar, marcha hipermétrica ou cambaleante, déficits proprioceptivos, movimentos de pedalagem, postura anormal da cabeça, ranger de dentes, convulsões, decúbito e/ou incapacidade de se levantar (CANTILE *et al.*, 2000; 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; MURGUE *et al.*, 2001; TROCK *et al.*, 2001; AUTORINO *et al.*, 2002; WEESE *et al.*, 2003; SALAZAR *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2006; SCHULER *et al.*, 2004; VENTER *et al.*, 2009; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2011). Além disso, mudanças comportamentais como apatia, sonolência, prostração, animal não responsivo e letargia também podem ser observadas em alguns casos (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2000; WARD *et al.*, 2006; ANGENVOORT *et al.*, 2013).

Embora alterações oculares não sejam frequentes, cegueira e fotofobia já foram descritas em alguns casos de infecção por WNV (OSTLUND *et al.*, 2001; SALAZAR *et al.*, 2004; SCHULER *et al.*, 2004; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2011).

Além disso, a febre que é característica de muitas infecções é observada em poucos casos não sendo um sinal clínico pertinente a todos os animais. Quando presente, pode ocorrer de forma intermitente, com registro de temperaturas acima de 38,5°C e 40°C, por exemplo (JOUBERT *et al.*, 1971; OSTLUND *et al.*, 2000; MURGUE *et al.*, 2001).

No entanto, sugere-se que esse baixo índice de febre observado nos casos clínicos de WNV pode estar relacionado com o momento da aferição da temperatura. Salazar e colaboradores (2004) avaliando a descrição clínica de afecção neurológica em mais de 480 equídeos observaram que cerca de 95% dos animais a temperatura retal foi aferida após a medicação de anti-inflamatórios e isso poderia justificar o baixo índice de febre entre os animais clinicamente afetados. Contudo, mesmo nos estudos experimentais o quadro de febre não foi reportado na maioria dos animais assim como é observado na infecção natural (SCHMIDT; MONSORY, 1963; CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2001; BUNNING *et al.*, 2002; SCHULER *et al.*, 2004; SALAZAR *et al.*, 2004).

Embora os animais acometidos podem apresentar uma amplitude de sinais clínicos, a ataxia constitui uma alteração comum na maioria, se não em todos, os casos de infecção pelo vírus descritos na literatura variando apenas quanto ao acometimento de membros anteriores e/ou posteriores, bem como a intensidade (CANTILE *et al.*, 2000; MURGUE *et al.*, 2001; TROCK *et al.*, 2001; SALAZAR *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2006; SCHULER *et al.*, 2004; VENTER *et al.*, 2009; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2011; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Em cavalos norte-americanos positivos para WNV e sintomáticos, por exemplo, a ataxia de membros posteriores foi mais comumente observada enquanto que, na primeira detecção do vírus em equídeos com encefalite aguda no Brasil, os animais apresentavam ataxia de membros anteriores nas primeiras 24 horas

evoluindo para uma paralisia dos membros pélvicos seguido de óbito (OSTLUND *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2019).

No entanto, a ataxia ocorre em diversas doenças do SNC dos equídeos e pode estar presente nas infecções virais por Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) e nas encefalites equinas, nas meningites bacterianas, mieloencefalites por protozoários como *Sarcocystis neurona*, e em outras causas não infecciosas como osteomielite vertebral, por exemplo (FURR; REED, 2008). Desta forma, embora comum aos casos de infecção por WNV, não deve ser considerada como alteração característica, assim como os demais sinais clínicos.

Complementarmente, a duração dos sinais clínicos também apresenta variação. Assim, podem ser observados desde casos agudos (1 a 5 dias) a casos em que o acometimento clínico foi mais prolongado (15 a 22 dias) (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Além disso, a progressão da doença varia entre os animais, não sendo possível determinar o curso e a gravidade da infecção. No entanto, observa-se geralmente que as infecções de caráter agudo apresentam maior gravidade resultando no óbito ou na necessidade de eutanásia do animal, enquanto que infecções com curso clínico mais prolongado pode resultar em posterior recuperação (OSTLUND *et al.*, 2000; CANTILE *et al.*, 2000; AUTORINO *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2004; VENTER *et al.*, 2009).

Adicionalmente, quando o animal progride para decúbito, por exemplo, as taxas de sobrevivência diminuem drasticamente (WARD *et al.*, 2006). Corroborando com essa conclusão, Salazar e colaboradores (2004), após avaliação de casos clínicos de 480 equídeos, sugerem que a chance de óbito de um animal que se encontra em decúbito e/ou com dificuldade de se levantar é cerca de 78 vezes maior do que de um animal que ainda não perdeu essa capacidade. Desta forma, a presença de decúbito aumenta as chances de óbito do animal (SALAZAR *et al.*, 2004; SCHULER *et al.*, 2004).

A taxa de mortalidade resultante da infecção por WNV pode ser de 20 a 45% com a possibilidade de ser maior (CANTILE *et al.*, 2001; TROCK *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; MURGUE *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2004; SCHULER *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2006; VENTER *et al.*, 2009). Contudo, a taxa de recuperação é geralmente maior, sendo observadas na literatura taxas de 50 a 80% de sobrevivência nos diferentes casos clínicos descritos (CANTILE *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004; SCHULER *et al.*, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Embora a recuperação completa seja comumente vista, alguns animais demoram meses para se recuperar totalmente para a condição anterior à enfermidade (VENTER *et al.*, 2009; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Além disso, em alguns casos podem-se observar sequelas como perda de peso e condição corporal, diminuição da força e vigor do animal bem como déficits de nervos cranianos refletidos em orelhas e lábios caídos (SALAZAR *et al.*, 2004).

Os sinais clínicos e progressão da doença podem variar entre as diferentes linhagens de WNV nos hospedeiros. No entanto, as linhagens 1 e 2 até o momento descritas nos equídeos parecem não apresentar diferenças na gravidade e manifestação clínica nestes animais. Desta forma, os sinais neurológicos observados nos cavalos infectados com WNV linhagem 2 foi semelhante ao observado em outros estudos de infecção pela linhagem 1 do vírus nestes animais (VENTER *et al.*, 2009; VENTER *et al.*, 2017).

3.5.6 Diagnóstico de WNV nos equídeos

O diagnóstico de WNV nos equídeos é baseado na associação da suspeita clínica, exame após o óbito (necropsia) e testes laboratoriais confirmatórios (OSTLUND *et al.*, 2000; 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; PAHO, 2017; OIE, 2018).

A maioria dos equídeos são assintomáticos, como já mencionado. Porém, quando apresentam acometimento clínico, os sinais clínicos são semelhantes com outras enfermidades do sistema nervoso central, que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Diversas condições infecciosas e não infecciosas podem ser responsáveis por desordem neurológica nestes animais (FURR; REED, 2008). Dentre os patógenos de etiologia viral estão importantes vírus zoonóticos como os arbovírus SLEV, EEEV, WEEV e VEEV, o vírus da raiva (RABV; *rabies virus*) e o bornavírus (BoDV; *Borna disease virus*) (KUMAR; PATIL 2017; CHAPMAN *et al.*, 2018; OIE, 2018a; NILLER *et al.*, 2020). Além destes, o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1; *equine herpesvirus-1*), embora não zoonótico, é responsável por alterações neurológicas nestes animais e está amplamente distribuído em todo mundo, representando importantes perdas econômicas na indústria equina (OLADUNNI *et al.*, 2019).

Além dos sinais clínicos semelhantes, alguns patógenos ocorrem endemicamente em uma mesma região dificultando o diagnóstico inicial. A identificação concomitante do protozoário *Sarcocystis neurona* causador de EPM e de EEEV nos equinos com síndrome neurológica durante o surto inicial de WNV nos EUA, demonstrou a sobreposição de vários agentes etiológicos em uma mesma região (OSTLUND *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004).

No entanto, a associação do histórico do animal pode auxiliar no direcionamento da suspeita inicial. Animais que residem em áreas com diagnóstico laboratorial da presença de WNV na população humana, em aves, mosquitos e/ou outros equídeos sugerem que este vírus pode ser a causa (KLEIBOEKER *et al.*, 2004; CDC, 2013). Além disso, a observação da presença e proliferação do mosquito vetor também é um fator importante na composição do diagnóstico (OSTLUND *et al.*, 2000; HAYES *et al.*, 2005).

Adicionalmente, os exames auxiliares são ferramentas importantes na avaliação clínica do animal. Nos cavalos com infecção por WNV na Itália um aumento de bilirrubina total sérica foi observado em alguns casos, mas os autores não indicaram uma possível associação desta alteração à infecção viral (CANTILE *et al.*, 2000). Além destes, um aumento na contagem de neutrófilos foi observado em 3 cavalos acometidos clinicamente

pela linhagem 2 do vírus (KUTASI *et al.*, 2011). Contudo, os exames hematológicos bem como o perfil bioquímico dos animais não apresentam alterações significativas que sugiram o diagnóstico da infecção viral (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2000).

No exame de avaliação do LCR (líquido cefalorraquidiano) dos animais acometidos pode ser encontrado mudanças na cor, aumento da quantidade de proteínas bem como células de defesa (GOEHRING, 2008; LONG, 2014). No entanto, não são alterações específicas da infecção por WNV (KUTASI *et al.*, 2020).

Para os animais que vieram a óbito ou foram submetidos a eutanásia, a necropsia constitui etapa importante no diagnóstico. Nos equinos doentes por WNV, hemorragia caracterizada por petéquias foi descrita na medula espinhal, tálamo e tronco cerebral caudal assim como presença de edema submeníngeo (OSTLUND *et al.*, 2000; CANTILE *et al.*, 2001). Outras alterações observadas foram lesões musculares e escoriações, tipicamente geradas por traumas resultantes do decúbito do animal (OSTLUND *et al.*, 2000). Além disso, há relatos de acometimento de outros tecidos como cardíaco e renal refletidos em hemorragia e miocardite, respectivamente, porém sem identificação do agente viral nestes órgãos (CANTILE *et al.*, 2001).

No entanto, as lesões macroscópicas na maioria dos casos de infecção por WNV estão ausentes nestes animais, não sendo comumente encontradas (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2001). Porém, uma necropsia com observação detalhada pode dar subsídios para um diagnóstico presuntivo e assim direcionar os testes laboratoriais, sendo, portanto, uma ferramenta muito importante do diagnóstico (RECH; BARROS, 2015)

A necropsia exige a adequada proteção pessoal, com uso de avental/macacão impermeável e/ou descartável, botas plásticas, máscara, óculos e luvas, tendo em vista que todos os casos de encefalite incluem a suspeita de raiva, outra importante zoonose (ROBERTSON, 2008; MAPA/OPAS, 2010).

Adicionalmente, alguns procedimentos durante a necropsia do animal são determinantes para execução dos testes laboratoriais, que apresentarão bons resultados mediante uma coleta e conservação adequada do material a ser avaliado. Condições que favorecem o processo de autólise do tecido como temperaturas de armazenamento inadequadas ou mesmo tempo prolongado entre o óbito do animal e a coleta de material, resultam na diminuição da quantidade de vírus que poderia ser detectado nestes tecidos (KOTAIT *et al.*, 1992; NASCI *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Desta forma, deve-se proceder a necropsia do animal logo após o óbito assim como conservar imediatamente o tecido de acordo com o método diagnóstico. Além disso, os fragmentos de tecidos do SNC devem incluir a coleta de medula. A ausência de medula nos testes diagnósticos pode resultar em um animal falso negativo (CANTILE *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

As técnicas laboratoriais podem ser utilizadas para diagnóstico antes e/ou após o óbito do animal e são necessárias para confirmação e conclusão do diagnóstico (OIE, 2018a).

Um dos aspectos fundamentais no controle da transmissão, não apenas de WNV, mas também de outros arbovírus, é a sua detecção precoce ou a identificação do aumento da sua atividade (CHARREL, 2016). Esse monitoramento constante depende da disponibilidade dos métodos laboratoriais de diagnóstico para essas infecções e há uma busca por métodos cada vez mais eficientes assim como o aperfeiçoamento de técnicas já existentes.

Historicamente para o diagnóstico das arboviroses o estudo da soroprevalência e isolamento viral sempre foram métodos “padrão-ouro”, no entanto, com a emergência desses vírus nos últimos 30 anos, causando epidemias em todo mundo, testes mais sensíveis de resultado rápido foram sendo implementados nos sistemas de saúde de cada país (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016; PAHO, 2017; YOUNG 2018). Este avanço também se aplica para os animais domésticos, onde a integração com o serviço veterinário permite a identificação de importantes zoonoses que tem nestes animais como os equídeos, por exemplo, sentinelas que indicam a circulação de vírus como WNV (OSTLUND *et al.*, 2000; PETROVIC *et al.*, 2018; BOSCO; LAUGH, 2019; YOUNG, 2019).

Para diagnóstico laboratorial das infecções causadas por WNV existem diferentes métodos que podem ser utilizados. Estes podem ser métodos diretos, onde tem-se a detecção do agente, antígenos e/ou ácido nucleico do vírus ou métodos indiretos, com detecção dos anticorpos específicos contra o vírus (FLORES; FELIPETO, 2017).

Em razão da viremia curta e da baixa carga viral que entra em declínio com o início dos sinais clínicos, o diagnóstico de WNV nos equídeos é comumente realizado com a detecção de IgM específica, associada aos sinais clínicos e/ou identificação do RNA viral nos tecidos coletados após o óbito (ANGEVOORT *et al.*, 2013; OIE, 2018). Desta forma, a sorologia é uma das ferramentas primárias de diagnóstico de WNV nos equídeos (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). No surto inicial nos EUA, por exemplo, os métodos sorológicos foram amplamente utilizados, possibilitando trabalhar com um maior número de amostras, bem como realizar estudos epidemiológicos da disseminação do vírus (OSTLUND *et al.*, 2000).

A detecção dos anticorpos pode ser realizada no soro e/ou líquido cefalorraquidiano (LCR) dos animais (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Na investigação comparativa de WNV no soro e LCR de 60 cavalos, anticorpos contra o vírus foram identificados no soro de 59 animais e no LCR de todos os equinos avaliados, não sendo observada diferença significativa na investigação sorológica entre as duas amostras (OSTLUND *et al.*, 2001).

A eficiência dos testes sorológicos é influenciada pelo momento do estágio da infecção, se na fase inicial (aguda) ou no período de convalescência da doença, fase mais tardia (ANGENVOORT *et al.*, 2013; LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). Os anticorpos IgM para

WNV nos equídeos já são detectáveis 6-7 a 10 dias após infecção (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013; OIE, 2018).

Embora os níveis de IgM tendem a diminuir, entrando em declínio após as primeiras semanas de infecção, no caso de alguns arbovírus como WNV, tem-se observado a persistência dessa imunoglobulina por períodos prolongados, até mesmo meses após infecção (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). A persistência de IgM anti-WNV foi observada em equinos por um período de 2 a 3 meses após início da infecção e sugere uma resposta imune prolongada contra o vírus (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013).

Contudo, com a variação na detecção de anticorpos durante o curso da infecção, recomenda-se a avaliação de amostras pareadas, ou seja, coletadas em dois momentos, para interpretação dos resultados (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). Na avaliação de amostras de equinos com afecção neurológica, a amostra de soro coletada dois dias após início dos sinais clínicos apresentou resultado negativo no teste PRNT (*plaque reduction neutralization test* – teste de neutralização por redução na contagem de placas) sendo necessária uma segunda coleta com intervalo de 14 dias, resultando em título positivo no mesmo teste (OSTLUND *et al.*, 2001). Desta forma, a avaliação de uma única amostra pode não representar o resultado real e possui valor diagnóstico limitado, sendo necessário para confirmação no teste PRNT um aumento de 4 vezes do título de anticorpos em amostras coletadas com intervalo de 14 dias (KLEIBOEKER *et al.*, 2004; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004). Os testes sorológicos incluem os métodos clássicos como inibição da hemaglutinação (HI) e fixação do complemento (FC) que foram durante muitos anos testes de eleição para diagnóstico sorológico de arbovirose, e os mais recentes, como o ensaio imunoenzimático (ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*), imunofluorescência (IFA) e o PRNT já mencionado (SCHMIDT; MANSORY, 1963; OSTLUND *et al.*, 2000; LAMBERT; LANCIOTTI, 2016).

Nos EUA, após a indicação da entrada de WNV no país em 1999, o teste laboratorial empregado foi o PRNT associado também ao isolamento viral do SNC dos equinos que vieram a óbito sendo os testes diagnósticos primários na identificação deste arbovírus (OSTLUND *et al.*, 2000; 2001).

O PRNT é baseado na neutralização do aparecimento de placas de lise (efeito citopático) causadas pela replicação viral por soros imunes, e os resultados podem ser obtidos em um prazo de 6 a 7 dias. Através deste método, avalia-se a capacidade de uma amostra de soro em neutralizar o vírus e pode-se determinar em qual diluição o soro testado é capaz de promover a neutralização, sendo, portanto, qualitativo e quantitativo (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). No diagnóstico de WNV, o equídeo é considerado positivo neste teste de neutralização quando possui título positivo acima de 1:10 em uma amostra de soro coletada e um título 4 vezes maior em amostras pareadas, como já mencionado (OSTLUND *et al.*, 2001; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004).

Este método já foi considerado padrão ouro para detecção dos arbovírus, porém vem sendo substituído por outros testes sorológicos (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). Entretanto, ainda é um teste recomendável para confirmação de outros, como o ELISA, sendo considerado o mais específico entre os métodos sorológicos de detecção de WNV (OIE, 2018). Outro teste, o ELISA é amplamente utilizado e permite a detecção de imunoglobulinas específicas no soro do hospedeiro. Através deste método pode-se identificar os anticorpos IgM e IgG porém, a identificação do primeiro indica infecção recente e assim assume maior importância em termos de diagnóstico (ANGEVOORT *et al.*, 2013). Enquanto que a identificação de IgG é muito utilizada em estudos de vigilância do vírus em uma região, por exemplo (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004). Além disso, sugere-se que os anticorpos neutralizantes contra este arbovírus podem persistir por cerca de 15 meses nestes animais após a infecção (OSTLUND *et al.*, 2001).

Atualmente o teste MAC-ELISA têm sido o método de escolha para detecção da infecção pelos arbovírus (MARTIN *et al.*, 2000). Esse teste realiza a captura de anticorpos da classe IgM específicos para vírus na amostra de soro ou líquido cerebrospinal, através de anticorpo anti-IgM aderido a uma placa de microtitulação, seguido de adição de um anticorpo específico para o agente viral pesquisado (DOMINGO *et al.*, 2011). É um teste que tem boa sensibilidade sendo considerado um método eficaz na detecção de anticorpos contra WNV nos equídeos (OSTLUND *et al.*, 2001; BUNNING *et al.*, 2002; WARD *et al.*, 2006). No estudo de amostras de sangue de cavalos saudáveis e também com alterações neurológicas, maior prevalência de casos positivos ocorreu no teste ELISA para captura de IgM comparativamente à detecção do RNA viral através da RT-PCR, sendo considerado o MAC-ELISA o método de escolha para detecção da infecção antes do óbito do animal (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Além disso, após a padronização do MAC-ELISA, este foi amplamente utilizado e empregado juntamente com o teste PRNT para identificação de equinos positivos nos primeiros casos de WNV nos EUA (OSTLUND *et al.*, 2001).

Outro método sorológico que pode ser utilizado é a inibição da hemaglutinação (HI) (SCHMIDT; MANSORY, 1963). Entretanto, com o surgimento de técnicas mais sensíveis, o uso de HI foi diminuindo ao longo dos anos, sendo substituído pelo MAC ELISA e PRNT (LAMBERT; LANCIOTTI, 2016). Contudo, a escolha dos testes sorológicos como diagnóstico deve considerar exposição previa dos animais ao vírus bem como presença de vacinação contra WNV nos equídeos. Nestes casos, os animais serão positivos nos testes e a interpretação pode não ter valor diagnóstico (ANGENVOORT *et al.*, 2013; JOÓ *et al.*, 2017). Desta forma, é recomendável a aplicação de outros testes nos animais vacinados com pesquisa direta do agente etiológico como métodos moleculares por exemplo, principalmente quando está sendo realizada uma investigação epidemiológica de WNV em uma região (CDC, 2013). No entanto, considerando que as vacinas comerciais contra WNV utilizadas nos equídeos são em grande parte preparadas com as proteínas E e M do vírus, o teste ELISA desenvolvido para proteína NS1 pode ser uma alternativa na diferenciação de animais vacinados dos naturalmente infectados (DE FILETTE *et al.*, 2012; ANGENVOORT *et al.*, 2013; IYER; KOUSOLAS, 2013). Outro

importante aspecto é a reação cruzada que ocorre entre os integrantes de *Flavivirus*. Os vírus deste gênero possuem sítios antigênicos em comum e, conseqüentemente, pode resultar em falsos positivos nos testes sorológicos. Assim, a interpretação dos resultados exige cautela principalmente em regiões com circulação concomitante de outros flavivírus (LEDERMANN *et al.*, 2011; LUSTIG *et al.*, 2018). Desta forma, considerando os fatores mencionados, recomenda-se a associação dos testes sorológicos quando estes forem os métodos escolhidos para o diagnóstico (ANTÓN *et al.*, 2013; OSTLUND *et al.*, 2000). A associação do teste ELISA e PRNT resultou na primeira detecção de WNV em amostras de equinos no Brasil indicando a circulação do vírus no país (PAUVOLLID *et al.*, 2011).

As limitações como presença de reação cruzada nos testes e ausência de sinais clínicos que é comumente vista na infecção de WNV nos equídeos, refletem a importância da associação de outros métodos de diagnóstico para confirmação deste arbovírus como etiologia. Embora o trabalho desenvolvido por Ostlund e colaboradores (2001) tenha identificado muitos novos casos no início do surto de WNV em 1999/2000 nos EUA com uso do MAC-ELISA, os próprios autores sugerem a importância da aplicação de testes moleculares como *nested* RT-PCR para diagnóstico do vírus nos tecidos do SNC destes animais.

O diagnóstico molecular é importante para avaliação de tecidos dos animais que vieram a óbito sendo extremamente útil nos casos sem histórico clínico ou que foram encontrados mortos na propriedade, por exemplo. Além disso, são métodos complementares nos testes sorológicos de animais que vieram a óbito com suspeita de infecção viral por WNV, mas que apresentaram resultado negativo na produção de anticorpos contra o vírus (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), identificam o ácido nucleico viral. São métodos que possuem boa sensibilidade e especificidade sendo capaz de detectar quantidades pequenas do agente viral, assim como uma obtenção rápida dos resultados. Quando associadas ao sequenciamento de nucleotídeos do produto gerado (*amplicon*), são muito úteis para detecção de novos vírus assim como na identificação de agentes emergentes e, no caso de WNV, identificar a linhagem circulante. Além disso, a análise das estirpes emergentes permite estudar a dinâmica da evolução de WNV nos diferentes países de sua ocorrência e a relação entre eles (LANCIOTTI *et al.*, 2002; ANTÓN *et al.*, 2013; FALL *et al.*, 2017; BIALOSUKNIA *et al.*, 2019). Para diagnóstico de WNV nos equídeos recomenda-se a modalidade *nested* RT-PCR (nRT-PCR) que, comparativamente ao PCR convencional, possui maior sensibilidade e demonstrou ser eficiente na identificação de casos positivos do vírus em diversos estudos em amostras de campo (JOHNSON *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; OIE, 2018a; ZANA *et al.*, 2020). Na detecção das linhagens 1 e 2, até então conhecidas como as patogênicas para os equídeos, o teste *nested* atua bem na detecção de ambas, enquanto que a eficácia do teste convencional é desconhecida (OIE, 2018a).

A técnica utiliza oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) que amplificam determinada região do genoma do agente viral pesquisado. Considerando o potencial patogênico das linhagens 1 e 2 nos equídeos, a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores deve atender a identificação de ambas as linhagens. Desta forma, os primers utilizados para diagnóstico geralmente são direcionados para fragmentos conservados do genoma de WNV, como a região que codifica a proteína NS5 do vírus (LANCIOTTI *et al.*, 2002; VENTER *et al.*, 2009; HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

Adicionalmente, pode-se utilizar a PCR em tempo real (qRT-PCR), em que além da identificação do vírus é possível fazer a quantificação do mesmo na amostra testada e não é necessária a leitura do resultado em gel de agarose como no caso da PCR convencional. Além dos primers, são utilizadas sondas marcadas com fluorocromos ou em alguns casos, *Sybergreen* (SHI *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; OIE, 2018). Comparativamente ao qRT-PCR, *nested* RT-PCR apresenta a mesma sensibilidade de detecção do RNA de WNV (SHI *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

A detecção do RNA do agente viral bem como seu isolamento pode ser realizado no sangue, soro, LCR e/ou tecidos do animal (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004). Contudo, a utilização dos métodos mencionados (nRT-PCR e qRT-PCR) apresenta melhores resultados na avaliação dos fragmentos de tecidos do SNC (JOHNSON *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

A escolha de exame nos tecidos do SNC *post mortem* justifica-se pela probabilidade de títulos virais maiores serem encontrados nestes tecidos do que na avaliação do sangue do animal por exemplo, devido a viremia de curta duração característica de WNV nos equídeos (BUNNING *et al.*, 2002; KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Em estudo experimental, Bunning e colaboradores (2002) identificaram viremia com título máximo de 10^3 PFU/mL enquanto que no SNC foram encontradas quantidades maiores ($10^{6,8}$ PFU/mL) em um dos cavalos avaliados após inoculação.

A infecção de WNV de forma geral se restringe mais ao SNC dos equídeos, em oposição do que é visto nas aves (GAMINO; HÖFLE, 2013; BYAS; EBEL, 2020). Assim, os tecidos de escolha para diagnóstico são fragmentos como córtex, tronco encefálico, cerebelo, e, principalmente, medula (CANTILE *et al.*, 2000, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; RECH; BARROS, 2015).

WNV infecta principalmente a medula dos equídeos e desta forma a coleta de fragmentos dessa região é essencial para o diagnóstico (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; RECH; BARROS, 2015; SCHVARTZ *et al.*, 2020). Na avaliação de todas as partes do SNC por RT-PCR quantitativo (tempo real), a maior concentração do vírus foi detectada na medula dos equinos avaliados, sendo sugerido que a ausência deste segmento do SNC nos exames laboratoriais pode resultar em animais falsos negativos (KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Embora a infecção nos equídeos seja caracterizada por uma viremia de curta duração, e assim de difícil detecção, a identificação no sangue destes animais é possível de ser efetuada (KLEIBOEKER *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2021).

Após a confirmação de transmissão de WNV por transfusão de sangue, os estudos nos doadores de sangue cresceram substancialmente na população humana (LAI *et al.*, 2012; LANTERI *et al.*, 2014; LUSTIG *et al.*, 2016). Dentre os estudos, uma pesquisa desenvolvida com sangue de doadores identificou a associação de WNV com as hemácias através de qRT-PCR, indicando uma maior possibilidade de detecção do vírus nestas células sanguíneas, comparativamente à detecção no plasma (RIOS *et al.*, 2007).

Recentemente, o mesmo princípio da técnica de Rios e colaboradores (2007) foi utilizado, resultando na identificação de WNV associado às hemácias de equídeos com e sem síndrome neurológica no Brasil (COSTA *et al.*, 2021 pre print). Desta forma, esta técnica pode ser uma alternativa de vigilância de WNV nestes animais comparativamente ao uso dos testes sorológicos que ainda são a escolha para o diagnóstico antes do óbito (OSTLUND *et al.*, 2000; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Contudo, é importante observar que a detecção positiva do RNA viral no sangue do animal saudável não resulta necessariamente em um posterior quadro encefálico. Além disso, a determinação do momento de coleta é de difícil escolha. Na avaliação do sangue total dos animais por nRT-PCR, várias coletas foram efetuadas sem resultado positivo em todas. Neste sentido, os autores sugerem que a detecção é influenciada pela janela imunológica em resposta à presença de WNV (KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Além disso, a identificação do vírus nos tecidos ainda é superior à detecção no sangue dos animais e, desta forma, também é o material de escolha para o isolamento de WNV (BUNNING *et al.*, 2002; KLEIBOEKER *et al.*, 2004)

Assim, outro método de identificação deste vírus consiste em seu isolamento que pode ser feito em cultivo celular e/ou utilizando um modelo animal, como embrião de galinha, por exemplo (COX, 1952; ROSSI *et al.*, 2005; CRESPO *et al.*, 2009). Além disso, é possível o estudo da patogenicidade e infecciosidade do vírus isolado através destas técnicas (WATSON *et al.*, 1943).

O isolamento do agente viral em cultivo de células pode ser utilizado no diagnóstico, assim como método de propagação viral. Após inoculação do material suspeito, a replicação do vírus pode ser vista através da produção de efeito citopático (ECP) e/ou pela detecção do ácido nucleico e proteínas virais (RICHARDS *et al.*, 2010).

WNV multiplica satisfatoriamente em cultivos de linhagens de mamífero (BHK21, Vero) e em linhagens de mosquito (C6/36). O cultivo em células Vero é considerado o de escolha para o isolamento de amostras positivas (sangue, LCR e/ou tecidos), nas quais WNV produz efeito citopático (ECP) como apoptose e mudança de morfologia das células em resposta a multiplicação viral (CHU; NG, 2003; RICHARDS *et al.*, 2010;

CDC, 2013; OIE, 2018). Além dos cultivos supracitados, as culturas formadas por células do sistema imune (monócitos, linfócitos) dos equinos, podem ser utilizadas para replicação do vírus, mas principalmente para testes com possíveis antivirais (GARCÍA-TAPIA *et al.*, 2006)

A confirmação do isolamento em cultivo celular pode ser efetivada através de ferramentas de diagnóstico como marcação do antígeno viral através do uso de anticorpos monoclonais específicos pela técnica de imunofluorescência, assim como técnicas moleculares como RT-PCR (JOHNSON *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; GARCÍA-TAPIA *et al.*, 2006; OIE, 2018).

O isolamento de vírus em embriões de galinha é um modelo de baixo custo, em que muitos vírus são adaptados e multiplicam com facilidade, podendo ser utilizado como modelo comparativo à patogenicidade no mamífero, como nos experimentos com Zika vírus e, além disso, constitui uma alternativa para produção de vacinas humanas bem como veterinárias (GERDIL, 2003; THAWANI *et al.*, 2018). WNV multiplica bem em ovos embrionados de galinha por diferentes vias de inoculação, sendo um modelo animal alternativo para estudo do comportamento viral (WATSON, 1943; COX, 1952; CRESPO *et al.*, 2009). Essa multiplicação viral pode resultar no óbito dos embriões, com lesões hemorrágicas e compatíveis com infecção viral na avaliação histopatológica, acompanhadas de identificação viral por imuno-histoquímica (CRESPO *et al.*, 2009; PALMIERI *et al.*, 2011).

A avaliação histopatológica nos tecidos do SNC, principalmente da medula do equídeo auxilia no diagnóstico de infecção viral. As alterações encontradas são típicas de encefalomielite não supurativa leve a moderada, associada com células inflamatórias linfoplasmocíticas, degeneração neuronal e gliose, principalmente na medula espinhal e tronco encefálico. Ao contrário das aves susceptíveis, que têm lesões extra-neurais, em equinos não ocorrem lesões microscópicas em tecidos extra-neurais, sendo nestes as lesões mais restritas ao SNC (CANTILE *et al.*, 2000, 2001; OSTLUND *et al.*, 2000; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; RECH; BARROS, 2015)

No entanto, como as lesões são sugestivas de infecção viral e não patognômicas, há necessidade da detecção de WNV no tecido lesado, especialmente pela técnica de imunohistoquímica, com anticorpos anti-WNV marcados, por exemplo, por enzima, que permite a confirmação ao reagir com o substrato (CANTILE *et al.*, 2001).

Na técnica de IHQ tem sido recomendada a marcação das proteínas NS1 e NS3, associadas à replicação, pois assim pode-se comprovar a replicação viral no tecido avaliado (GARCIA-TAPIA *et al.*, 2006; HABARUGIRA *et al.*, 2020a). Contudo, outros estudos também obtiveram sucesso utilizando anticorpos direcionados para marcação da proteína E do vírus, por exemplo (CANTILE *et al.*, 2001). Consequentemente, na IHQ do sistema nervoso de um cavalo infectado, o antígeno pode ser visualizado no citoplasma de neurônios normais e em degeneração, células gliais, macrófagos bem como fibras

nervosas (CANTILE *et al.*, 2001). No entanto mesmo com estas lesões descritas no SNC, aparentemente a quantidade de vírus presente nesses tecidos é baixa mesmo nos tecidos com forte lesão inflamatória. Desta forma, comparativamente com o que ocorre nas infecções de WNV em aves e as infecções fatais em seres humanos, as lesões por esse vírus nos cavalos é encontrada com menor presença de antígeno associado (CANTILE *et al.*, 2001).

3.5.5.1 Desafios do diagnóstico

Inicialmente, o obstáculo no diagnóstico de WNV está relacionado com as características da infecção deste vírus nos equídeos. A baixa viremia, que declina com o início dos sinais clínicos, dificulta o diagnóstico de detecção direta do vírus no sangue. A maioria dos animais é assintomática e, quando clinicamente afetados, apresentam alterações confundíveis com outras patologias infecciosas ou não infecciosas do sistema nervoso (OSTLUND *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2002; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

A escolha dos testes sorológicos como diagnóstico *ante mortem* encontra dificuldades relacionadas com o período de coleta (6-7 dias após o início dos sinais clínicos), presença de vacinação na região, assim como a reação cruzada entre os vírus do gênero *Flavivirus*, que pode resultar em animais falso positivos nos testes (LEDERMAN *et al.*, 2011; LUSTIG *et al.*, 2018). Desta forma, a análise de amostras pareadas e associação com testes de neutralização confirmatórios auxiliam no diagnóstico dos animais (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Contudo, há descrição na literatura da dificuldade no acompanhamento de certos animais e assim não é possível a execução de coleta de uma segunda amostra (SCHMIDT; MANSORY, 1963).

Embora este arbovírus possui caráter neurotrópico, a quantidade de vírus nos tecidos do SNC é menor comparativamente a outros hospedeiros do vírus como espécies de aves susceptíveis (BUNNING *et al.*, 2002; KOMAR *et al.*, 2003). Desta forma, alguns autores sugerem que os tecidos do SNC avaliados podem apresentar quantidades mínimas e assim não detectáveis (JOHNSON *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Além disso, a carga viral no SNC é variável entre os animais. Em infecção experimental, o vírus foi isolado nos cavalos que apresentaram doença clínica e que foram submetidos à necropsia logo após eutanásia, realizada durante o período agudo, porém em quantidades variáveis entre os indivíduos (OUDAR *et al.*, 1971).

Adicionalmente, observa-se que em alguns trabalhos onde animais apresentaram quadro neurológico agudo com consequente coleta imediata dos tecidos do SNC, resultou na detecção do RNA viral (OUDAR *et al.*, 1971; CANTILE *et al.*, 2001; SCHVARTZ *et al.*, 2020). Sugere-se que estas condições parecem favorecer a identificação viral.

As condições de coleta e conservação das amostras são determinantes para execução das técnicas laboratoriais (OIE, 2018b). Condições que favorecem o processo de autólise do tecido, como temperaturas de armazenamento inadequadas, ou mesmo tempo prolongado entre o óbito do animal e a coleta de material, resultam na diminuição da sensibilidade

dos testes, com redução na detecção do vírus (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). A replicação bem-sucedida no cultivo de células está diretamente relacionada com a presença de vírions infecciosos e não defectivos para o isolamento viral (ROSSI *et al.*, 2005; RICHARDS *et al.*, 2010).

Portanto, o diagnóstico do WNV nos equídeos ainda encontra determinadas dificuldades, embora se mantenha uma busca por testes diagnósticos cada vez mais eficientes (HABARUGIRA *et al.*, 2020a).

3.6 - Controle e prevenção

O combate ao vetor é uma importante estratégia preventiva da transmissão de WNV. O uso de larvicidas, pulverização com inseticidas para combater mosquitos adultos e eliminação de focos de reprodução vetorial, têm demonstrado efeito satisfatório no controle da doença (LOTHROP *et al.*, 2008). No entanto, para que os princípios ativos utilizados como inseticidas apresentem eficácia, é indicado que a população de mosquitos seja avaliada periodicamente em testes de susceptibilidade (CDC, 2013; ATYAME *et al.*, 2019).

Além das medidas de proteção coletiva supracitadas, para proteção individual são indicados uso de repelentes que apresentem eficácia, como produtos à base de N-dietilmeta-toluamida (DEET), picaridina ou icaridina (KBR 3023) ou IR3535, por exemplo. Recomenda-se o uso de telas e roupas que conferem maior proteção, como calças e camisas de manga comprida em áreas com maior proliferação de mosquitos (CDC, 2013; EUCD, 2013; BRASIL, 2019a).

Adicionalmente, novas tecnologias têm sido empregadas no combate da proliferação dos vetores e consequente transmissão de importantes arboviroses. O uso de sistemas que buscam limitar a infecção de vetores competentes no ciclo de transmissão viral tem sido testado para o mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor do vírus da dengue. Neste caso, a infecção do vetor por bactéria do gênero *Wolbachia* (Rickettsiales) resulta em menor replicação do DENV e também do ZIKV, diminuindo assim a capacidade de transmissão viral (DUTRA *et al.*, 2016).

Entretanto, devido à possibilidade de transmissão por outras vias além da picada do mosquito, apenas estas medidas não são suficientes para evitar um surto de WNV (CDC, 2013). São necessárias amplas medidas preventivas para evitar a transmissão na população, principalmente entre as pessoas consideradas do grupo de risco como idosos, hipertensos e imunossuprimidos (MONTGOMERY; MURRAY, 2015). A possibilidade de infecção intrauterina inclui as grávidas no grupo de risco, exigindo maior atenção preventiva, principalmente em áreas geográficas de maior ocorrência de WNV (ALPERT *et al.*, 2003).

A transmissão via transfusão sanguínea reporta a necessidade de controle em bancos de sangue através de testes na triagem dos doadores. Rios e colaboradores (2007) detectaram WNV associado às hemácias, propondo assim que testes de análise individual como o

Nucleic Acid Testing (NAT), sejam mais empregados e, quando possível, associados a técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, devido ao grande número de doadores, a logística dos testes permite apenas testagens em grupo de 6 a 16 doadores, sendo realizados mini-pools (MP-NAT) tornando inviável a aplicação do teste individual, porém se mantém o controle nos bancos (EUCD, 2013; CDC, 2013).

Ademais os testes de triagem, outras medidas são sugeridas para que se evite a doação de sangue por pessoas infectadas assintomáticas. A avaliação dos doadores residentes de áreas de risco antes da doação, bem como o monitoramento após o procedimento através da notificação de qualquer alteração como febre, entre outros sinais e sintomas sugestivos de WNV em um período de 15 dias, são algumas das medidas sugeridas para se evitar a contaminação dos bancos de sangue (EUCD, 2013).

Além dos cuidados com bancos de sangue, testes diagnósticos como técnicas moleculares, também são executados para evitar a transmissão através do transplante de órgãos (IWAMOTO *et al.*, 2003; HAYES *et al.*, 2004).

Contudo, como já mencionado, existe a transmissão relacionada ao risco ocupacional, como no caso de técnicos de laboratório, bem como profissionais de saúde e veterinários (SPATARO *et al.*, 2008; VONESCH *et al.* 2019). Desta forma medidas protetoras com o uso de equipamentos adequados, como luvas, jalecos, mascaras e óculos de proteção, devem ser empregados por profissionais que são expostos ao vírus seja no laboratório, no atendimento clínico em hospitais bem como na coleta a campo (NIOSH, 2005; OPAS, 2010).

Adicionalmente, além destas medidas para a redução de risco, pode-se promover a inativação viral de superfícies, através da limpeza com detergentes e outros solventes lipídicos, assim como auxílio de luz UV (radiação ultravioleta) nos laboratórios. Além disso, o vírus é sensível a altas temperaturas bem como ao pH ácido (WIGGINTON *et al.*, 2012).

Outra medida de prevenção contra muitos agentes patogênicos consiste na vacinação da população e/ou animais susceptíveis. No caso de WNV, a vacina é utilizada nos equídeos como medida de controle da disseminação viral nos rebanhos destes animais em alguns países onde o vírus é considerado endêmico (DE FILETTE *et al.*, 2012; ANGENVOORT *et al.*, 2013; CDC, 2013).

As primeiras vacinas para uso veterinário foram licenciadas em 2003 nos Estados Unidos e em 2008 na Europa após os inúmeros surtos nos rebanhos equídeos. Atualmente a vacinação integra o programa de prevenção e controle deste arbovírus em ambas regiões (DE FILETTE *et al.*, 2012; EUCD, 2013; CDC, 2013; IYER; KOUSOLAS, 2013; ANGEVOORT *et al.*, 2013)

Embora muitas vacinas tenham sido desenvolvidas e aprovadas ao longo dos anos, somente quatro estão disponíveis comercialmente, sendo elas a WN Innovator[®]/WNVEquip(I), Vetera[®] WNV (II), Prestige[®]WNV (III) e Recombitek [®] Equine WNV[®]/Proteq West Nile[®](IV). Estas vacinas possuem diferentes tecnologias de

produção e imunização, sendo duas vacinas (I, II) compostas pelo vírus inativado, uma formada por uma quimera de proteínas (prM/E) do vírus de WNV associado a um outro flavivírus (YF17D) (III), enquanto que as vacinas recombinantes (IV) são formadas por um vírus *Canarypox* que expressa os genes que codificam as proteínas prM e E do vírus WN para a estimulação da resposta imune (KAISER; BARRET, 2019; ANGENVOORT *et al.*, 2013; IYER; KOUSOLAS, 2013).

Ademais as tecnologias utilizadas, estas vacinas em sua maioria são direcionadas para proteína E do vírus e conferem proteção contra a linhagem 1 e, no caso da vacina recombinante, a linhagem 2 do vírus (LONG, 2014). Conseqüentemente, estimulam a produção de anticorpos neutralizantes contra WNV induzindo então a formação de uma imunidade protetora (IYER; KOUSOLAS, 2013; ULBERT, 2019).

Nas áreas endêmicas, sugere-se a vacinação dos equídeos antes da estação de maior proliferação dos mosquitos objetivando reduzir o risco de infecção pelo vírus nestes animais (VENTER *et al.*, 2017). Além disso, ainda nestas áreas, como aparentemente a resposta imune em alguns animais pode não se prolongar por um ano, sugere-se a adoção da revacinação com intervalo de 6 meses entre as doses (DAVIDSON *et al.*, 2005).

A vacinação só pode ser utilizada segundo critérios técnicos estabelecidos pelos órgãos de saúde animal de cada país atendendo a exigência da ocorrência endêmica do vírus na região (OIE, 2018). Além disso, a implementação da vacinação deve considerar também a necessidade do uso dos equídeos para vigilância epidemiológica do vírus em uma região pois sua introdução interfere nos estudos de sorovigilância (CDC, 2013; PETROVIC *et al.*, 2018). O Brasil, por exemplo, não é considerado área endêmica para o vírus e assim não há liberação e comercialização legal da vacina no país (BRASIL, 2019a).

Desde o licenciamento das primeiras vacinas, a eficácia deste método de prevenção tem sido avaliada em diversos estudos. Alguns trabalhos avaliando casos clínicos de infecção por WNV em equídeos vacinados e não vacinados sugerem que a vacinação pode diminuir a chance de óbito destes animais. Schuler e colaboradores (2004) encontraram uma taxa de letalidade 20% maior nos cavalos não vacinados e concluíram que com a vacinação a probabilidade de a enfermidade evoluir para decúbito e, conseqüentemente, para o óbito é menor. Ward e colaboradores (2006) sugerem que o uso da vacina pode diminuir o risco de óbito do animal em um percentual de até 44%.

Contudo, embora uma diminuição dos casos clínicos nos rebanhos equinos após implantação da vacinação em 2003 foi observada, um número expressivo de animais com infecção por WNV até final de 2017 nos EUA ainda foi reportado (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019). Assim, a vacinação deve ser associada a outras medidas protetivas como, principalmente, o controle do vetor (DAVIDSON *et al.*, 2005).

Adicionalmente, embora não tenha liberação de vacinação comercial para aves, muitas vacinas usadas comercialmente para equídeos foram previamente testadas em aves (DE OYA *et al.*, 2019). Contudo, o uso de vacinas foi autorizado em gansos em Israel, com uso restrito (OIE, 2018a).

Existe atualmente vacinas em estudo para humanos, porém em fases de testes, incluindo algumas em testes 1 e 2 da fase clínica (IYER; KOUSOLAS, 2013; ULBERT, 2019). Muitas estratégias vacinais têm sido testadas em laboratório, objetivando aumentar a eficácia na proteção contra o vírus. Embora existam vacinas eficazes contra outros flavivírus, como vírus da febre amarela (YFV), há muitos desafios na produção de vacinas contra WNV para uso humano. Além dos fatores intrínsecos relacionados com a segurança de uma vacina destinada para população contra qualquer patógeno, fatores como criação de uma proteção de maior durabilidade para que seja necessária uma dose única bem como ausência de proteção cruzada contra outros flavivírus evitando interposição de respostas imunes, são importantes para obtenção de uma vacina eficaz (ULBERT, 2019). No entanto, sugere-se que a possível causa para ausência de uma vacina humana é econômica, pois até então não desperta grande interesse comercial, devido ao mercado restrito e custo benefício não atrativo (IYER; KOUSOLAS, 2013). Contudo, essa interpretação poderá mudar em poucos anos, tendo em vista a expansão geográfica do vetor *Culex pipiens*, em razão das mudanças climáticas (CIOTA; KRAMER, 2013).

As medidas de prevenção mencionadas constituem a proteção disponível atualmente contra o vírus, porém é importante que todas as medidas preventivas e protetivas sejam associadas pois isoladas não possuem resultado satisfatório (CDC, 2013). Além disso, todos estes esforços de medidas práticas por parte dos órgãos de saúde pública devem ser acompanhados de educação e diálogo com a população.

Ademais as medidas mencionadas, os sistemas de vigilância auxiliam no controle e prevenção da ocorrência de WNV em seres humanos. Através de estudos com detecção de anticorpos contra o vírus em animais susceptíveis bem como identificação viral em vetores competentes, é possível determinar o status de uma região quanto a presença do vírus e assim coordenar a aplicação de medidas de controle mais eficazes (CDC, 2013; LUSTIG *et al.*, 2018).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) determina que a detecção do antígeno ou RNA viral e/ou isolamento viral de um animal com sinais clínicos compatíveis com WNV, ou que esteja relacionado com ocorrência de surto confirmado ou suspeito, indica a ocorrência do vírus na região (OIE, 2018). A detecção de anticorpos contra o vírus em animais nas condições supracitadas também indica presença de WNV, desde que este animal não seja vacinado como é o caso de equinos em alguns países da Europa e regiões dos EUA onde a vacinação contra o vírus ocorre (CDC, 2013; EUCD, 2013; OIE, 2018).

Adicionalmente, considerando os hospedeiros do ciclo de transmissão de WNV a vigilância para sua prevenção e controle deve ser baseada no conceito de Saúde Única “*One Health*”, integrando desta forma os sistemas de saúde pública e os serviços de atuação veterinária (PETROVIC *et al.*, 2018; YOUNG *et al.*, 2019; HABARUGIRA *et al.*, 2020). O sistema de vigilância de cada país seguirá as diretrizes determinadas de acordo com o histórico de detecção do vírus em seu território. Em alguns países da Europa, por exemplo, estudos esporádicos integram pesquisas com inquéritos sorológicos

na população humana com destaque para doadores de sangue, nos cavalos, bem como nas aves silvestres (LUSTIG *et al.*, 2018).

A vigilância de um determinado patógeno pode ser ativa, com coleta de materiais biológicos e testes em ação planejada pelas agências de saúde, ou passiva, por análise de dados da casuística de diagnóstico de casos passivamente recebidos. Podem envolver o recolhimento de informações através de questionários ou inquéritos epidemiológicos, por exemplo, e podem ser estudos nos mosquitos vetores, nos equídeos, nas aves bem como investigação de casos na população (EUCD, 2013; BRASIL, 2019a). O objetivo da vigilância é identificar precocemente a ocorrência do patógeno e, conseqüentemente, propor ações preventivas que direcionem para proteção (CDC, 2013; LUSTIG *et al.*, 2018).

3.7 Vigilância e identificação de WNV – Brasil

No ano de 2003, com a crescente expansão de WNV no continente americano, foi elaborado no Brasil o Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica de WNV, com base nas recomendações da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2019b). O monitoramento deste e de outros vírus zoonóticos é realizado pelos programas nacionais de vigilância e controle do Ministério da Saúde, sendo, portanto, uma enfermidade de notificação compulsória em caso de suspeita ou confirmação por testes laboratoriais (BRASIL, 2016). Esse sistema integra também a vigilância animal, que deve notificar todo caso suspeito ou confirmado de epizootias envolvendo este arbovírus ao Ministério da Saúde, que irá deliberar ações de vigilância, prevenção e controle na região afetada (BRASIL, 2019a).

O cenário epidemiológico no país com a circulação simultânea de diferentes e importantes arboviroses constitui o principal desafio para identificação precoce dos casos, implementação de ações de prevenção e controle, bem como de vigilância a serem estabelecidas. Desta forma, a partir do momento em que um caso suspeito ou confirmado é notificado, se instala uma vigilância epidemiológica ativa na região com procura de novos casos e determinação da situação do vírus no local (BRASIL, 2019a).

Assim como os programas de vigilância em outros países, em áreas com identificação de WNV, a coleta de material dos animais hospedeiros (equídeos e aves), bem como de vetores é efetuada para determinação da situação epidemiológica. Além disso, ferramentas como inquéritos epidemiológicos com busca de informações em uma amostra da população ou levantamento epidemiológico com recuperação de dados ao longo de um tempo, bem como busca ativa de casos, são essenciais para eficácia do sistema nacional de vigilância epidemiológica de doenças de notificação compulsória como WNV (BRASIL, 2009)

O Brasil possui uma grande variedade de espécies que compõe sua avifauna, incluindo espécies migratórias universalistas, ou seja, que migram entre diferentes continentes e, desta forma, podem ser potenciais carreadoras de agentes patogênicos no país. Petry e

colaboradores (2006) identificaram no Brasil sete espécies de aves silvestres incluídas nas ordens Accipitriformes, Charadriiformes, Caprimulgida, Passeriformes e Pelecaniformes, que foram positivas para WNV nos EUA e México. Consequentemente, a vigilância epidemiológica das aves é uma das ferramentas de combate ao vírus no território nacional (BRASIL, 2019a).

A vigilância sorológica de aves para WNV tem sido desenvolvida por grupos de pesquisa em áreas que são rotas de diversas aves migratórias na região sul do país (ARAÚJO *et al.*, 2004; PETRY *et al.*, 2006). Além disso, inquéritos sorológicos já foram realizados também em espécies domésticas e em aves silvestres residentes (MELANDRI *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013).

Adicionalmente, exames laboratoriais são realizados na avaliação de quaisquer óbitos de aves suspeito de epizootias para vigilância deste e de outros patógenos. Entretanto, devido à ausência do envio de material para os laboratórios credenciados, o número de resultados indeterminados é alto chegando a 75% dos casos notificados entre os anos de 2014 a 2019 (BRASIL, 2019b) (figura 5).

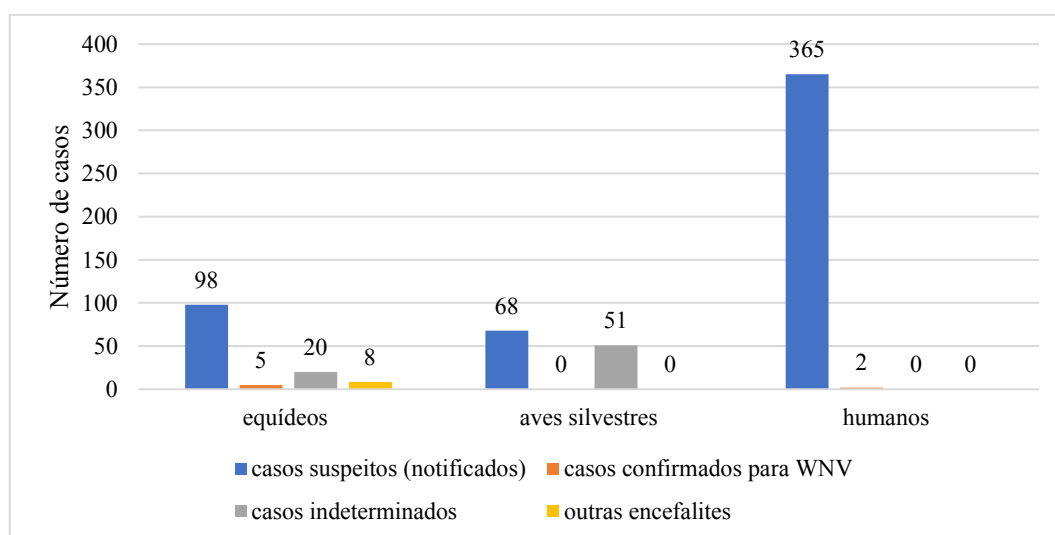


Figura 5. Situação epidemiológica de WNV no Brasil de janeiro de 2014 a junho de 2019 (Fonte: “Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental no Brasil, 2014 a 2019”; informe nº 1; Julho de 2019, Secretária de Vigilância em Saúde; BRASIL, 2019)

Além das aves, o território brasileiro possui grande contingente de equídeos que, são importantes para detecção precoce e consequente controle do vírus (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; IBGE, 2019).

Os casos de morbidades e/ou mortalidades de equídeos associados com epizootias são investigados através de exames laboratoriais para proteção da população humana bem como dos animais (BRASIL, 2019a). Desta forma, o envio do material para diagnóstico será destinado para os laboratórios credenciados e/ou oficiais de cada região, os Laboratórios oficiais de diagnóstico para arbovirose (disponível em <http://ais.paho.org>)

e/ou Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) (disponível em <http://www.saude.gov.br>), bem como Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) (disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/notificacao-de-doencas>)

O monitoramento entomológico é realizado principalmente para mosquitos do gênero *Culex*, em particular a espécie *Culex quinquefasciatus* que se acredita ser o vetor em potencial para transmissão do vírus no Brasil (BRASIL, 2019a). A vigilância constante é efetuada em áreas consideradas sentinelas e/ou vulneráveis à ocorrência do agente viral através de coletas ordenadas de estágios larvários e adultos, para estimativa da densidade populacional dos mosquitos. Além disso, ações de conscientização populacional e medidas públicas são realizadas na prevenção da proliferação do vetor através da eliminação dos criadouros, prevenção individual com uso de repelentes bem como proteção coletiva com o uso de inseticidas (BRASIL, 2011).

A primeira detecção do WNV no Brasil foi em 2009, com base em evidências sorológicas em cinco cavalos na região centro oeste do Brasil, na área do Pantanal (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011). Após esses estudos iniciais, Melandri e colaboradores (2012) também investigaram a presença de anticorpos WNV em soro de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e equinos na região do Pantanal (estado de Mato Grosso), resultando em três cavalos (3/38 - 8%) e uma ave doméstica (1/31 - 3,2%) soropositivos em ensaios de ELISA e PRNT.

Posteriormente, em um estudo mais amplo de soroprevalência em amostras de aves silvestres e equídeos (cavalos, mulas e burros) resultou em três cavalos e uma mula soropositivos, dos quais as amostras foram coletadas em 2009 no estado de Mato Grosso (OMETTO *et al.*, 2013). A detecção de anticorpos para WNV foi novamente confirmada em 24 cavalos da região do Pantanal. Além deste flavivirus, anticorpos para os vírus Ilheus (ILHV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) também foram encontrados, comprovando a circulação de diferentes arbovírus na região (PAUVOLLID-CORREA *et al.*, 2014).

Em 2013, a detecção de anticorpos em amostras de equinos coletadas em 2009 no estado da Paraíba sugeriu que o WNV estava se espalhando em direção ao nordeste do Brasil (SILVA *et al.*, 2013).

Posteriormente, o primeiro caso humano foi descrito em 2014 na zona rural do município de Aroeiras do Itaim no Estado do Piauí. O paciente apresentou inicialmente dores musculares e febre evoluindo para um quadro encefálico com paralisia flácida. O diagnóstico foi confirmado por detecção do anticorpo anti-WNV no fluido cerebrospinal do paciente (VIEIRA *et al.*, 2015).

Embora a indicação da circulação do vírus no país tenha ocorrido desde de 2009 através de inquéritos sorológicos, a identificação do RNA viral ocorreu em 2018 associado a casos neurológicos em equídeos, dois cavalos e dois burros, no Estado do Espírito Santo

(SILVA *et al.*, 2019). A avaliação das sequências confirmou a circulação da linhagem 1 do vírus alertando para ocorrência de linhagem altamente patogênica na população equídea (MARTINS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; SICONELLI *et al.*, 2021).

Após esta detecção e a identificação viral nos equídeos, o número de casos suspeitos reportados ao sistema de vigilância nacional apresentou um aumento, alertando para uma maior atenção à vigilância de WNV no Brasil (BRASIL, 2019b).

Posteriormente, em 2019 e 2020, novos eventos de equídeos positivos foram notificados no país. Neste período seis equinos provenientes do município de Boa Viagem, Ceará, Parnaíba no Piauí, João Neiva, Estado do Espírito Santo, Suzano e São Bernardo do Campo, no estado de São Paulo, Betim em Minas Gerais, respectivamente, foram positivos para WNV através de RT-PCR (BAYEUX, *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2021 pre print). Além disso, em 2019, mais dois casos de infecção pelo vírus foram identificados em pacientes humanos novamente no Estado do Piauí (BAYEUX, *et al.*, 2019) (figura 6).

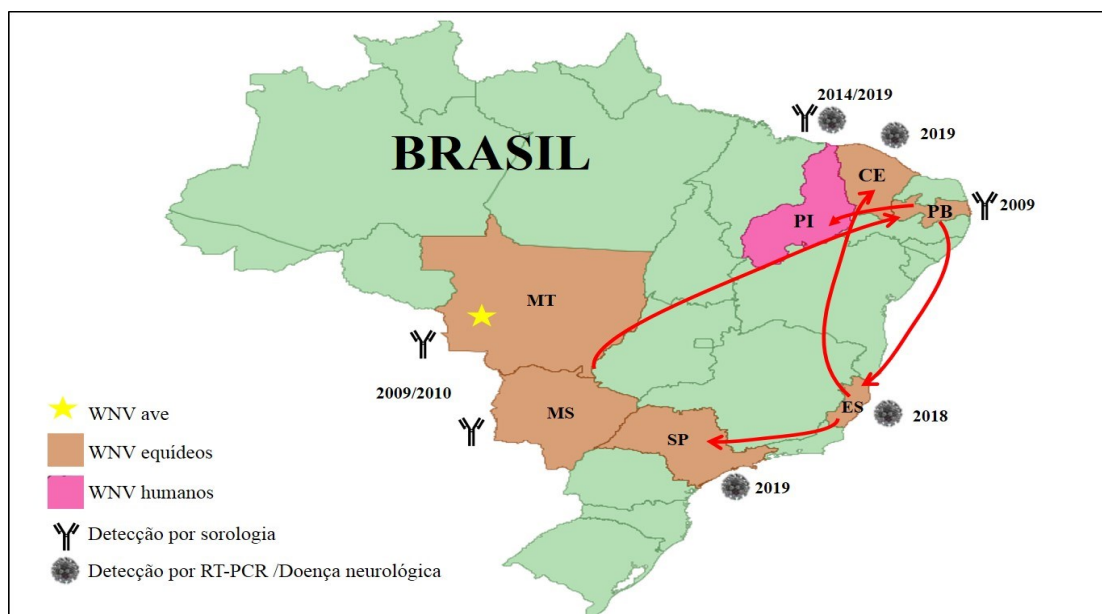


Figura 6. Dispersão do WNV no Brasil. Estão representados a detecção do vírus (detecção sorológica e/ou viral), estado e ano de amostragem. Os estados são indicados por cores diferentes de acordo com a espécie hospedeira diagnosticada, equídeos (marrom), humanos (rosa), aves (estrela amarela) e sem detecção (verde). As setas vermelhas indicam a possível rota de disseminação do WNV no Brasil. (Adaptado de BAYEUX *et al.*, 2019)

3.8 Referências

- AHLERS, L. R. H.; GOODMAN, A. G. The immune responses of the animal hosts of West Nile virus: A comparison of insects, birds, and mammals. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–9, 2018.
- AHMADNEJAD, F. et al. Spread of West Nile virus in Iran: A cross-sectional serosurvey in equines, 2008-2009. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1587–1593, 2011.
- ALONSO-PADILLA, J. et al. The continuous spread of West Nile virus (WNV): Seroprevalence in asymptomatic horses. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 8, p. 1163–1168, 2009.
- ALPERT, S. G.; FERGERSON, J.; NOËL, L. P. Intrauterine West Nile virus: Ocular and systemic findings. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 4, p. 733–735, 2003.
- ANGENVOORT, J. et al. West Nile viral infection of equids. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2013.
- ANTÓN, A. I. N. et al. Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 3, p. 197–205, 2013.
- ARAÚJO, F. A. A. et al. Segundo Inquérito Sorológico em Aves Migratórias e Residentes do Parque Nacional Da Lagoa Do Peixe/Rs Para Detecção Do Vírus Da Febre Do Nilo Ocidental E Outros Vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 5, p. 1–8, 2004.
- ATYAME, C. M. et al. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1894, 2019.
- AUTORINO, G. L. et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1372–1378, 2002.
- BARRERA, R. et al. Short report: First isolation of West Nile virus in the Caribbean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 666–668, 2008.
- BARZON, L.; PACENTI, M.; PALÙ, G. West Nile virus and kidney disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 5, p. 479–487, 2013.
- BAYEUX, J. J. M. et al. Epidemiological surveillance of west nile virus in the world and Brazil: Relevance of equine surveillance in the context of “one health”. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, 2019.
- BERNARD, K A et al. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. **Emerging infectious diseases**, v.7, n.4, p. 679-685, 2001.
- BIN, H et al. West Nile fever in Israel 1999-2000: from geese to humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.951, p.127-142, 2001.
- BOSCO-LAUTH, A. M.; BOWEN, R. A. West Nile Virus: Veterinary Health and Vaccine Development. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1463–1466, 2019.
- BOURGEOIS, M. A. et al. Gene expression analysis in the thalamus and cerebrum of horses experimentally infected with West Nile virus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
- BRASIL. Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, p. 1- 121, 2016. Disponível em: www.saude.gov.br/svs Acesso em: 8 de julho de 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, volume único, 3a. ed., p. 1-740, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*. Brasília Ministério da Saúde .3ª ed., p.1 -76, 2011.

- BRASIL. Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental no Brasil, 2014 a 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde. INFORME nº1, julho 2019b.
- BRASIL. Secretária de Defesa Agropecuária. Secretária de Defesa Sanitária Animal. As doenças dos animais no Brasil. Histórico das primeiras observações. Brasília: SNAP/SDSA, Boletim de Defesa Sanitária Animal, número especial, p. 1-101, 1988.
- BREWER, A.W, MACLACHLAN, N.J. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. **Arch Virol**, v. 36, n.3, p. 287- 298, 1994.
- BRINTON, M. A. Replication cycle and molecular biology of the west nile virus. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 13–53, 2014.
- BUNNING, M. L. et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 380–386, 2002.
- BYAS, A. D.; EBEL, G. D. Comparative pathology of west nile virus in humans and non-human animals. **Pathogens**, v. 9, n. 1, 2020.
- CALISHER, C H et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **The Journal of general virology** v. 70 (Pt 1), 37-43, 1989.
- CAMARA, R. et al. animals Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules. **Animals**, v. 10, n. 2203, p. 1–26, 2020.
- CAMPBELL, G. L. et al. Reviews West Nile virus. **The Lancet Infectious diseases**, v.2, n. 9, p. 519–529, 2002.
- CANTILE, C. et al. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 31–35, 2000.
- CANTILE, C. et al. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 4, p. 414–421, 2001.
- CARNEIRO, G. F.; CAVALCANTE LUCENA, J. E.; DE OLIVEIRA BARROS, L. The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 106–110, 2018.
- CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **BMC Vet Res**, v. 35, n.4, p. 467-483, 2004.
- Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. CDC, Division of Vector-Borne Diseases, 2013.
- CHANCEY, C. et al. The global ecology and epidemiology of west nile virus. **BioMed Research International**, v. 2015, n. Figure 2, 2015.
- CHAPMAN, G. E. et al. The challenges posed by equine arboviruses. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 4, p. 436–445, 2018.
- CHARREL, R.N. Diagnosis of arboviral infections--A quagmire of cross reactions and complexities. **Travel Med Infect Dis**, v.14, n.1, p.11-12, 2016.
- CHU, J. J. H.; LEONG, P. W. H.; NG, M. L. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into Aedes albopictus mosquito (C6/36) cells. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 463–475, 2006.
- CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3021–3047, 2013.
- COLPITTS, T. M. et al. PrM-antibody renders immature West Nile virus infectious in vivo. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 10, p. 2281–2285, 2011.
- COLPITTS, T. M. et al. West Nile virus: Biology, transmission, and human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 635–648, 2012.

- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 1994. 228p.
- CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the vector in arbovirus transmission. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 71–88, 2014.
- COSTA, A. E. et al. West Nile virus detection in horses in three Brazilian states. **bioRxiv**, pre print, 2021.
- COSTA, E. A. et al. Diagnóstico etiológico de enfermidades do sistema nervoso central de equinos no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 391–399, 2015.
- COX, H. R. Growth of viruses and rickettsiae in the developing chick embryo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, n. 2, p. 236–247, 1952.
- CRESPO, R. et al. Isolation and distribution of West Nile virus in embryonated chicken eggs. **Avian Diseases**, v. 53, n. 4, p. 608–612, 2009.
- CUNHA, E. M. S. et al. Causes of Encephalitis and Encephalopathy in Brazilian Equids. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 8–13, 2016.
- DAVIDSON, A. H. et al. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v. 226, n. 2, p. 240–245, 2005.
- DAVIS, L. E. et al. West Nile virus neuroinvasive disease. **Annals of Neurology**, v. 60, n. 3, p. 286–300, 2006.
- DE FILETTE, M. et al. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 16, 2012.
- DE OYA, N. J. et al. Current progress of avian vaccines against West Nile virus. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 1–23, 2019.
- DOMANOVIC, D.; GIESECKE, J. How to define an area where transmission of arthropod-borne disease is occurring? **Eurosurveillance**, v. 17, n. 20, 2012.
- DOMINGO, C. et al. Molecular diagnosis of flaviviruses. **Future Virology**, v. 6, n. 9, p. 1059–1074, 2011.
- DUPUIS, A. P.; MARRA, P. P.; KRAMER, L. D. Serologic evidence of West Nile virus transmission, Jamaica, West Indies. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 860–863, 2003.
- DUTRA, H. L. C. et al. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016.
- ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. West Nile virus risk assessment tool. **Stockholm: ECDC**, 2013.
- EIDSON, M. et al. Crow deaths as a sentinel surveillance system for West Nile virus in the Northeastern United States, 1999. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 615–620, 2001.
- ELIZONDO-QUIROGA, D.; ELIZONDO-QUIROGA, A. West Nile virus and its theories, a big puzzle in Mexico and Latin America. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 168–175, 2013.
- FABBRI, C. M. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of two West Nile virus strains isolated from equines in Argentina in 2006 could indicate an early introduction of the virus in the southern cone. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 11, p. 794–800, 2014.
- FALL, G. et al. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 86251P, 2017.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acesso em: 2 de julho de 2020.

- FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 357–362, 1998.
- FURR, M.; REED, S. Neurologic Examination. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.). **Equine Neurology**, Iowa: Blackwell Publishing p. 65-77.
- GAMINO, V.; HÖFLE, U. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: A review. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, 2013.
- GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 2, p. 262–264, 2012.
- GARCIA-TAPIA, D.; LOIACONO, C. M.; KLEIBOEKER, S. B. Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3–4, p. 229–244, 2006.
- GERDIL, C. The annual production cycle for influenza vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1776–1779, 2003.
- GILADI M, et al. West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. *Emerging infectious diseases*, v.7, n.4, p.659, 2001
- GIRARD, Y. A. et al. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 4, n.2, p. 109-122, 2004.
- GOEHRING, L. Viral diseases of the nervous system. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.) *Equine Neurology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.169 – 186.
- HABARUGIRA, G. et al. Mosquito-Independent Transmission of West Nile. *Viruses*, v.12, n.198, p. 1-21, 2020b.
- HABARUGIRA, G. et al. West nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One health” implications. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1–51, 2020a.
- HAYES, E. B. et al. Epidemiology and transmission dynamic of West Nile Virus Disease. v. 11, n. 8, 2005.
- HAYES, E.B; O’LEARY, D. R. West Nile virus infection: a pediatric perspective. **Pediatrics**, v.113, p.1375–1381, 2004
- HEALY, J. M. et al. Comparison of the efficiency and cost of west nile virus surveillance methods in California. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 2, p. 147–155, 2015.
- HERNÁNDEZ-TRIANA, L. M. et al. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: A review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. DEC, p. 1–8, 2014.
- HOBSON-PETERS, J. et al. Detection of antibodies to West Nile virus in horses, Costa Rica, 2004. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1081–1084, 2011.
- HOLICK, J. et al. Discovery of *Aedes albopictus* infected with west nile virus in southeastern Pennsylvania. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 18, n. 2, p.131, 2002.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>> Acesso em:
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>> Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- IWAMOTO, M. et al. Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. **New england journal of medicine**, v.348, n. 22, p. 2196-2203, 2003
- IYER, A. V.; KOUSOULAS, K. G. A review of vaccine approaches for West Nile virus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 9, p. 4200–4223, 2013.
- JOHNSON, D J et al. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse

- transcription-nested polymerase chain reaction assay. **Emerging infectious diseases** v.7, n.4, p.739-741, 2001.
- JOUBERT, L. et al. Reproduction expérimentale de la mèningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. III. - Relations entre la virologie, la sérologie et l'évolution anatomo-clinique. Conséquences épidémiologiques et prophyladiques. **Bulletin de l'Académie vétérinaire de France**, v. 44, n. 3, p. 147–158, 1971.
- JUPP, P. G. The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 143–152, 2001.
- KAISER, J. A.; BARRETT, A. D. T. Twenty Years of Progress Toward West Nile Virus Vaccine Development. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 1–17, 2019.
- KILPATRICK, A M. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. **Science**, v. 334, n.6054, p. 323-327, 2011.
- KLEIBOEKER S. B. et al. Diagnosis of West Nile virus infection in horses. **J Vet Diagn Invest.** v.16, n.1, p. 2-10, 2004
- KOMAR, N. et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 311–322, 2003.
- KOTAIT, I. et al. Isolamento e identificação do Vírus da Encefalomyelose equina, tipo Leste, em eqüinos do Estado de São Paulo, Brazil. **Arq Inst Biol**, v. 59, n. 1/2, p. 37–41, 1992.
- KRAMER, L. D.; CIOTA, A. T.; MARM KILPATRICK, A. Introduction, Spread, and Establishment of West Nile Virus in the Americas. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1448–1455, 2019.
- KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 61–81, 2008.
- KUMAR, R.; PATIL, R. D. Cryptic etiopathological conditions of equine nervous system with special emphasis on viral diseases. **Veterinary World**, v. 10, n. 12, p. 1427–1438, 2017.
- KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, n. 1, p. 27–41, 1998.
- KUTASI, O et al. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 25, n. 3, p. 586-591, 2011.
- KUTASI, O. et al. Characterisation of the cerebrospinal fluid of horses with West Nile virus neuroinvasive disease. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 68, n. 2, p. 177–185, 2020.
- LAFRI, I. et al. Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 50, p. 8–12, 2017.
- LAI, L. et al. Relative distribution of West Nile virus RNA in blood compartments: Implications for blood donor nucleic acid amplification technology screening. **Transfusion**, v. 52, n. 2, p. 447–454, 2012.
- LAMBERT, A.J.; LANCIOTTI, R. S. Laboratory Diagnosis of Arboviruses. In: VASILAKIS, N.; GUBLER, D.J. (Ed.). **Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control**. Poole, UK: Caister Academic Press, 2016. p. 270-275.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96–105, 2002
- LANCIOTTI, R. S. et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2333–2337, 1999.
- LANTERI, M. C. et al. West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: Implication for transfusion and transplantation safety. **Transfusion**, v. 54,

- n. 12, p. 3232–3241, 2014.
- LEE, T-H. et al. Distribution of parvovirus B19 DNA in blood compartments and persistence of virus in blood donors.” **Transfusion**, v. 51, n. 9, p. 1896-1908, 2011.
- LIM, S. M. et al. West Nile virus: Immunity and pathogenesis. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 811–828, 2011.
- LONG, M.T. West Nile Virus and Equine Encephalites. **Vet Clin Equine**, v.30, p. 523–542, 2014.
- LOTHROP, H. D. et al. Intensive early season adulticide applications decrease arbovirus transmission throughout the Coachella Valley, Riverside County, California. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 4, p. 475–489, 2008.
- LUSTIG, Y. et al. Superiority of west nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2294–2297, 2016.
- LUSTIG, Y. et al. Surveillance and diagnosis of west nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–10, 2018.
- MACKENZIE, J. S. et al. Arboviruses causing human disease in the Australasian zoogeographic region. **Archives of Virology**, v. 136, n. 3–4, p. 447–467, 1994.
- MAPA, 2009. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília-DF: MAPA/SDA, 2009, p.1-124.
- MAPA. Instrução normativa nº50, de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- MARTIN, D. A. et al. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1823–1826, 2000.
- MARTINS, L. C. et al. First isolation of west nile virus in brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 1, p. 1–7, 2019.
- MATTAR, S. et al. West Nile Virus antibodies in Colombian horses [7]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1497–1498, 2005.
- MAZZEI, M. et al. West nile seroprevalence study in Bolivian Horses, 2011. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 12, p. 894–896, 2013.
- MEHMET, K. et al. Serological investigation of west nile virus infection in domestic horses and donkeys in Turkey. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 37, n. 1, p. 51–54, 2017.
- MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.
- MERLE, H. et al. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. **Journal Francais d’Ophtalmologie**, v. 41, n. 6, p. e235–e243, 2018.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Brasília: MAPA, p.1-56, 2016.
- MORALES, M. A. et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–13, 2017.
- MORALES-BETOULLE, M. E. et al. West Nile virus in horses, Guatemala [5]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1038–1039, 2006.
- MUKHOPADHYAY, S. et al. Structure of West Nile virus. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 248, 2003.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the

- Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- MURGUE, B et al. West Nile in the Mediterranean Basin: 1950-2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.951, n.1, p. 117–126, 2006.
- MURGUE, B.; ZELLER, H.; DEUBEL, V. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 267, p. 195–221, 2002.
- MURGUE, B.; ZELLER, H.; DEUBEL, V. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 267, p. 195–221, 2002.
- MURRAY, K. O. et al. Visualization of west Nile virus in urine sediment using electron microscopy and immunogold up to nine years postinfection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 1913–1919, 2017.
- MUSTAFÁ, Y. M. et al. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, 2019.
- NASCI, R. S. et al. West Nile Virus in Overwintering Culex Mosquitoes, New York City, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 742–744, 2001.
- NEMETH, N. et al. Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). **Archives of Virology**, v. 154, n. 5, p. 783–789, 2009.
- NETLAND, J.; BEVAN, M. J. CD8 and CD4 T cells in West Nile virus immunity and pathogenesis. **Viruses**, v. 5, n. 10, p. 2573–2584, 2013.
- NILLER, H. H. et al. Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 467-477, 2020.
- NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. Recommendations for Protecting Laboratory, Field, and Clinical Workers from West Nile Virus Exposure. Centers for Disease Control and Prevention, Publication No. 2006–115, 2005. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/niosh>> Acesso em 11 de agosto de 2020.
- OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Collection, submission, and storage of diagnostic specimens. **Terrestrial Animal Health Code**, p. 11-22, 2018b.
- OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. West Nile Fever. **Terrestrial Animal Health Code**, p. 697-710, 2018a.
- OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Animal Health Code**, 2012.
- OLADUNNI, F. S.; HOROHOV, D. W.; CHAMBERS, T. M. EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–25, 2019.
- OMETTO, T. et al. West nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico. Cooperação Técnica MAPA/OPAS/OPAS/OPAS/OPAS para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil, 2010. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/33893>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- OSTLUND, E. N. et al. Equine West Nile encephalitis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 665–669, 2001.
- OSTLUND, E. N.; ANDRESEN, J. E.; ANDRESEN, M. West Nile encephalitis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 16, n. 3, p. 427–441, 2000.
- OUDAR, J. et al. Reproduction expérimentale de la mèningo-encèphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. II. Etude anatomo-clinique. **Bulletin de l'Academie veterinaire de**

- France**, v. 44, n. 3, p. 147–158, 1971.
- OUDAR, J. et al. Reproduction expérimentale de la mèningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. II. Etude anatomo-clinique. **Bulletin de l'Académie vétérinaire de France**, v. 44, n. 3, p. 147–158, 1971
- PAHO. Pan American Health Organization Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Washington, D.C. PAHO, 2017. Disponível em: <<http://www.paho.org>>. Acesso em: 29 jun. 2019.
- PALMIERI, C. et al. Pathology and immunohistochemical findings of west nile virus infection in psittaciformes. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 5, p. 975–984, 2011.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.
- PEALER LN, et al. West Nile Virus Transmission Investigation Team. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **N Engl J Med**, v.349, p. 236–245, 2003
- PELLO, S. J.; OLSEN, G. H. Emerging and reemerging diseases of avian wildlife. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 357–381, 2013.
- PÉREZ-RAMÍREZ, E. et al. Pathogenicity evaluation of twelve west nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: Discrimination between three pathogenicity categories. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 4, p. 662–670, 2017.
- PETERSEN, L. R. Epidemiology of West Nile Virus in the United States: Implications for Arbovirology and Public Health. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1456–1462, 2019.
- PETERSEN, L. R.; BRAULT, A. C.; NASCI, R. S. West Nile virus: Review of the literature. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 3, p. 308–315, 2013.
- PETROVIĆ, T. et al. Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–19, 2018.
- PETRY, R.; PETER, A. S.; GUADAGNIN, D. L. Avifauna of Rio Grande do Sul and emerging diseases : Current knowledge and recommendations for the ornithological surveillance of Avian Influenza and Avifauna do Rio Grande do Sul e doenças emergentes : conhecimento atual e recomendações para a vigilância. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 3, p. 269–277, 2006.
- PFEFFER, M.; DOBLER, G. Open Access REVIEW BioMed Central Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 35, 2010.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020.
- PIMENTEL, L. A. et al. Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 589–597, 2009.
- PUPO, M. et al. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n.6, p.1022-1024, 2006.
- QUIRIN, R. et al. West Nile Virus, Guadeloupe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 706–708, 2004.
- RAPPOLE, J. H.; HUBÁLEK, Z. Migratory birds and West Nile virus. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 94, n. 32, p. 47–58, 2003.
- RECH, R.; BARROS, C. Neurologic Diseases in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 281–306, 2015.

- REY, F. A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 24, p. 132–139, 2017.
- RICHARDS, S. L.; ANDERSON, S. L.; YOST, S. A. In vitro and in vivo effects of west nile virus propagated in cells of different passage. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 4, p. 436–440, 2010.
- RIOS, M. et al. Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. **Transfusion**, v. 46, n. 4, p. 659–667, 2006.
- RIOS, M. et al. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 2, p. 181–186, 2007.
- ROBY, J. A. et al. Noncoding subgenomic flavivirus RNA: Multiple functions in west Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 404–427, 2014.
- ROEHRIG, J. T. West Nile. **Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases**, p. 735–751, 2009.
- ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.
- ROSSI, S. L. et al. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 457–470, 2005.
- SALAZAR, P. et al. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 2, p. 267–274, 2004.
- SCHMIDT, J. R.; EL MANSOURY, H. K. Natural and experimental infection of egyptian equines with west nile virus. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 415–427, 1963.
- SCHNEIDER, B. S. et al. Aedes aegypti saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.
- SCHULER, L. A et al. Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225 n.7, p. 1084-1089, 2004.
- SCHVARTZ, G. et al. Molecular characterization of the re-emerging West Nile virus in avian species and equids in Israel, 2018, and pathological description of the disease. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2020.
- SELIM, A. The Recent Update of the Situation of West Nile Fever among Equids in Egypt after Three Decades of Missing Information. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 8318, 2019.
- SHI, P. Y. et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1264–1271, 2001.
- SICONELLI, M. J. L. et al. Evidence for current circulation of an ancient west nile virus strain (Ny99) in brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. June 2019, p. 1–5, 2021.
- SILVA, A. S. G. et al. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 1, p. 445–453, 2019.
- SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921–923, 2013.
- SILVA, M. L. C. R. et al. Outbreaks of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 570–575, 2011.
- SIMMONDS, P. et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.

- SINGH, I. R. P. F Growth of arboviruses in arthropod tissue culture. **Advances in virus research**, v. 17, p. 187–206, 1972.
- SMITHBURN, K. C. et al. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1-20, n. 4, p. 471–492, 1940.
- SPATARO, P. et al. Seroprevalence study on the diffusion of the West Nile Virus among blood donors, healthcare workers, jockeys, grooms and fowlers, veterinary surgeons and hunters in Messina (Italy). **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 22–25, 2008.
- STEELE, K. E. et al. Pathology of fatal west nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 208–224, 2000.
- STEINMAN, A. et al. Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. **Veterinary Record**, v. 151, n. 2, p. 47–49, 2002.
- SUEN, W. W. et al. Mechanism of west nile virus neuroinvasion: A critical appraisal. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2796–2825, 2014.
- SUTHAR, M. S.; DIAMOND, M. S.; GALE, M. West Nile virus infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 115–128, 2013.
- TAYLOR, R. M. et al. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 5, n. 4, p. 579–620, 1956.
- THAWANI, A. et al. Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. **Cell Reports**, v. 23, n. 3, p. 692–700, 2018.
- TOLSÁ, M. J. et al. Macroecology of birds potentially susceptible to West Nile virus. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1893, 2018.
- TROCK, S. C. et al. West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n.4, p.745-747, 2001.
- ULBERT, S. West Nile virus vaccines—current situation and future directions. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2337–2342, 2019.
- VALIAKOS et al. West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence. In: *Viral Replication* Rosas-Acosta, G. (Ed) p. 5071-5668, 2013.
- VAN EEDEN, C.; SWANEPOEL, R.; VENTER, M. Antibodies against west Nile and Shuni viruses in veterinarians, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1409–1411, 2014.
- VENTER, M. et al. Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 877–884, 2009.
- VENTER, M. et al. Transmission of West Nile virus during horse autopsy.” **Emerging infectious diseases**, v. 16, n.3, p. 573-575, 2010
- VENTER, M. et al. West Nile Virus Lineage 2 in Horses and Other Animals with Neurologic Disease, South Africa, 2008-2015. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 12, p. 2060-2064, 2017.
- VEO, C. et al. Evolutionary Dynamics of the Lineage 2 West Nile Virus That Caused the Largest European Epidemic: Italy 2011-2018. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2019.
- VIEIRA, C. J. DA S. P. et al. Ecological aspects of potential arbovirus vectors (Diptera: Culicidae) in an urban landscape of Southern Amazon, Brazil. **Acta tropica**, v. 202, p. 105276, 2020.
- VIEIRA, M. A. C. S. et al. Case report: West nile virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377–379, 2015.

- VONESCH, N. et al. Emerging zoonotic viral infections of occupational health importance. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 2, p. 1–26, 2019.
- WARD, M. P. et al. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 255–259, 2006.
- WATSON, D. W, SMADEL JE. Cultivation of the West Nile Virus in the Developing Chick Embryo. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.52, n.3, p.204–205, 1943.
- WEAVER, S. C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. **Archives of virology. Supplementum**, n. 19, p. 33–44, 2005.
- WEESE, J. S. et al. West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 Cases. **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 6, p. 469–473, 2003.
- WEINBERGER, M. et al. West Nile Fever Outbreak, Israel, 2000: Epidemiologic Aspects. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 686–691, 2001.
- WHO/FAO expert committee on zoonoses. World Health Organization technical report series, 1959.
- WIGGINTON, K. R. et al. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 21, p. 12069–12078, 2012.
- World Health Organization, 1959
- YILDIRIM, Y. et al. Molecular and serological investigation of West Nile virus (WNV) infection in donkeys, horses and native geese in Turkey. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 169, n. 4–6, p. 87–92, 2018.
- YOUNG, J. J. et al. One health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: Relevance of equine data for blood safety. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 16, 2019.
- YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. In: Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment. Hilgenfeld, R; S. Vasudevan, S.G (eds.), **Advances in experimental medicine and biology** v. 1062, p. 1-10, 2018.
- ZELLER, H. G.; SCHUFFENECKER, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 147–156, 2004.
- ZHANG, C. et al. Understanding the regulation of overwintering diapause molecular mechanisms in *Culex pipiens pallens* through comparative proteomics. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- ZIEGLER, U. et al. Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 3–4, p. 263–273, 2012.
- ZIEGLER, U. et al. West Nile virus antibody prevalence in horses of Ukraine. **Viruses**, v. 5, n. 10, p. 2469–2482, 2013.
- ZIEGLER, U. et al. West Nile virus epidemic in Germany triggered by epizootic emergence, 2019. **Viruses**, v. 12, n. 4, 2020.
- ZIEGLER, U. et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. **Antiviral Research**, v. 162, n. December 2018, p. 39–43, 2019.

4. Capítulo 2 – Vírus de *West Nile* (WNV) associado a encefalite em equídeos no Brasil

Resumo

Os arbovírus constituem uma preocupação global de saúde pública, sendo responsáveis por importantes doenças emergentes e reemergentes. Alguns dos arbovírus causam encefalites zoonóticas nos equídeos, que podem atuar como sentinelas, contribuindo para a vigilância de importantes zoonoses. Desta forma, a investigação diagnóstica das causas de encefalites virais nos equídeos é de extrema importância em Saúde Única. Em abril-maio de 2018 foram observados 12 óbitos de equídeos com sinais neurológicos em seis fazendas localizadas no Estado do Espírito Santo, Brasil. Para investigar a causa das mortalidades, fragmentos do sistema nervoso central (SNC) de dois cavalos e dois burros foram submetidos ao diagnóstico molecular. O vírus de West Nile (WNV) foi detectado por *nested* RT-PCR em fragmentos do SNC de todos os quatro animais no estudo e os produtos (amplicons) gerados foram confirmados por sequenciamento dos nucleotídeos. Posteriormente, um dos materiais foi inoculado em cultivo de células Vero resultando no isolamento viral confirmado por imunofluorescência indireta. O diagnóstico diferencial para raiva, herpesvírus equino – 1 e encefalites virais equinas (EEE, WEE, VEE, SLEV) também foi efetuado resultando em negativo. O presente resultado constitui a primeira identificação do vírus WN associado a doença neurológica em equídeos no Brasil e revela a necessidade de maiores estudos para compreender as características e situação epidemiológica deste vírus no país.

Palavras chaves: arbovírus, Brasil, detecção, encefalite, flavivírus, cavalos, vírus do Nilo Ocidental

4.1. Introdução

O vírus do Nilo Ocidental (WNV) (*West Nile Virus* - WNV) é um vírus envelopado, de genoma RNA fita simples que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Neste gênero estão incluídos vírus que causam doenças emergentes e reemergentes de importância na medicina veterinária e/ou na saúde humana como o vírus da Dengue (DENV), zika vírus (ZIKV), febre amarela (*Yellow Fever Virus* - YFV) e vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) (PFEFFER; DOBLER, 2010; PIERSEN; DIAMOND, 2020).

WNV é um arbovírus (*arthropod borne virus*) e mantém seu ciclo na natureza por transmissão entre o vetor, mosquitos do gênero *Culex*, e aves silvestres, caracterizando o ciclo enzoótico. Mais de 300 espécies de aves já foram descritas como susceptíveis a WNV, desenvolvendo viremia suficiente para infectar com eficiência os mosquitos sendo, portanto, hospedeiros amplificadores (CDC, 2013; PELLO; OLSEN, 2013). Dentre as espécies de aves que apresentam alta viremia, estão integrantes da ordem Passeriformes, como o pardal (*Passer domesticus*), que se encontra amplamente disseminado em diversos continentes, bem como a espécie *Corvus brachyrhynchos* diretamente envolvida

com a ocorrência do vírus nos Estados Unidos (LANCIOTTI *et al.*, 1999; NEMETH *et al.*, 2009a; PELLO; OLSEN, 2013).

Ocasionalmente, WNV pode ser transmitido para o ser humano e os equídeos, que são considerados hospedeiros terminais do ciclo de transmissão, ou seja, quando são infectados, não desenvolvem níveis de viremia suficientes para transmissão eficiente aos vetores (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; COLPITTS *et al.*, 2012). Além desta via, a transmissão de WNV para humanos já foi observada através de transfusão sanguínea, amamentação, transplacentária e transplante de órgãos (PEALER *et al.*, 2003; IWAMOTO *et al.*, 2003; HAYES; O'LEARY, 2004; RIOS *et al.*, 2007).

A infecção pelo vírus nestes hospedeiros é predominantemente subclínica (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; COLPITTS *et al.*, 2012). No ser humano cerca de 25% das pessoas infectadas desenvolvem sinais clínicos como febre e cefaleia, sintomas comumente vistos em infecções por outras arboviroses como DENV e ZIKV (PAHO, 2017). Contudo, cerca de 1% dos pacientes podem progredir para a forma neuroinvasiva da infecção desenvolvendo quadro encefálico com paralisia flácida de um ou mais membros, confusão mental e letargia, que pode resultar no óbito (DAVIS *et al.*, 2006; COLPITTS *et al.*, 2012).

Os equídeos são em sua maioria assintomáticos, porém 8 a 10% dos casos podem evoluir para um quadro neurológico grave com sinais de ataxia, fraqueza, decúbito e paralisia, que pode resultar no óbito do animal (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013). A taxa de mortalidade nestes animais é de 20 a 45% e, geralmente, os casos em equídeos precedem os casos na população humana sendo, desta maneira, considerados animais sentinelas na vigilância epidemiológica de WNV (CANTILE *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; MURGUE *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2006; VENTER *et al.*, 2009; PETROVIC *et al.*, 2018).

WNV foi identificado pela primeira vez em 1937, proveniente de amostra sanguínea de uma paciente febril no distrito de *West Nile* em Uganda (SMITHBUR *et al.*, 1940). Nas décadas subsequentes foram reportados eventos envolvendo casos em humanos, equídeos e/ou aves em países de diferentes continentes (MURGUE *et al.*, 2002; CASTILLO-OLIVARES; WOOD 2004; ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013; CHANCEY *et al.*, 2015).

No entanto, na década de 1990 com o aumento do número de surtos, bem como da gravidade dos casos nos equídeos, na população humana e nas aves, o vírus passou a ser visto como um problema de saúde pública global. Consequentemente, WNV, que já havia sido identificado na Europa, Ásia, África e Oceania, alcançou uma extensão quase que global chegando ao continente americano (CASTILLO-OLIVARES; WOOD 2004; ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013; CHANCEY *et al.*, 2015)

No final do verão de 1999, infecções por WNV foram registradas pela primeira vez no continente americano, quando foram reportados casos em humanos, cavalos e aves nos

Estados Unidos da América (LANCIOTTI *et al.*, 1999; OSTLUND *et al.*, 2000; STEELE *et al.*, 2000). O surto de WNV nos EUA alcançou uma proporção não observada anteriormente nos outros continentes e alertou para o impacto em potencial da possibilidade de ocorrência da doença no restante das Américas (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019).

Posteriormente, o vírus se espalhou rapidamente para outros países da América do Norte bem como da América Central com identificação de WNV no Canadá e países do Caribe (2001), México, Jamaica, Guadalupe, República Dominicana e Porto Rico (2002), Belize, Cuba, Trinidad e Tobago, Guatemala, Costa Rica, El Salvador e Haiti (2003/2004) e Nicarágua (2006) (KOMAR; CLARK, 2006; ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA, 2013; CHANCEY *et al.*, 2015).

A evidência sorológica da circulação de WNV na América do Sul foi reportada inicialmente na Colômbia (2004), posteriormente na Argentina (2006) e Venezuela (2007) (MATTAR *et al.*, 2005; BOSCH *et al.*, 2007). No entanto, a associação do vírus com doença neurológica em equinos e posterior isolamento viral foi observado apenas em 2006, na Argentina (MORALES *et al.*, 2006).

Com a crescente expansão de WNV no continente americano, em 2003 foi implementado o sistema de vigilância para este arbovírus no Brasil (BRASIL, 2019b). A primeira evidência da presença do vírus no Brasil ocorreu em 2009 com a identificação de anticorpos anti-WNV em soros de cavalos na região do Pantanal, no Centro-Oeste (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011). Após, novas evidências sorológicas foram observadas em equídeos e ave doméstica (*Gallus gallus domesticus*) novamente na região central do país (MELANDRI *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013).

Posteriormente, a identificação de anticorpos para o vírus em cavalos no estado da Paraíba evidenciou sua expansão para região nordeste (SILVA *et al.*, 2013). Consequente a essa disseminação, o primeiro caso humano foi descrito em 2014 na zona rural do município de Aroeiras do Itaim no Estado do Piauí. (VIEIRA *et al.*, 2015).

No entanto, a doença neurológica associada à infecção por WNV em equídeos não foi descrita no país até o momento. Desta forma, o presente trabalho aborda a primeira identificação do RNA viral de WNV associado à encefalite aguda em equídeos no Brasil, destacando também a importância do diagnóstico das encefalites virais nestes animais.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Descrição do surto e localização

Nos meses de abril a maio de 2018 foram notificados no Estado do Espírito Santo (ES), localizado na região sudeste do Brasil, doze casos de equídeos (nove equinos e três asininos) com sinais neurológicos agudos e que vieram a óbito. Os casos clínicos ocorreram em seis propriedades, localizadas em quatro municípios (Nova Venécia, Boa Esperança, Baixo Guandu e São Mateus) (Figura 7). Cinco das seis propriedades localizavam-se na zona rural. No mesmo período dos casos descritos, alguns dos animais

acometidos estiveram presentes no Parque de Exposições de Nova Venécia, localizado em zona urbana da cidade, onde foi descrita a presença de animal com desordem neurológica no local.

Em todas as localidades, havia vestígios de vegetação de Mata Atlântica, dentro ou nas proximidades das propriedades. Não foram observados relatos de doença neurológica e/ou óbito de outras espécies de animais nas localidades descritas.

O Estado do Espírito Santo ocupa uma área de 46.095.583 km² no litoral brasileiro e é banhado pelo Oceano Atlântico. A região possui um clima tropical costeiro predominantemente quente e úmido, influenciado pelos padrões de ar tropical do Atlântico, e as chuvas se concentram no verão (dezembro a março). A temperatura média está entre 22 °C e 24 °C, com precipitação anual entre 1.000 e 1.500 mm (INMET, 2010).

Em todos os municípios afetados com a epizootia, havia rios e córregos de pequeno, médio ou grande porte com vestígios de mata atlântica nativa em suas margens. Os municípios de Boa Esperança, Nova Venécia e São Mateus fazem parte da bacia do rio São Mateus (Rio Creare) e o município de Baixo Guandu possui rede de drenagem com os rios Doce, Guandu, Laje e Mutum.

Adicionalmente, o município de São Mateus é limitado a leste pelo Oceano Atlântico e sua zona costeira é designada como reserva de vida selvagem da Biosfera da Mata Atlântica do Parque Nacional Marinho de Abrolhos. Neste município existe também a Estação Ecológica de Barra Nova, considerada de grande importância para espécies de peixes, anfíbios, aves e mamíferos.

Além das áreas de reservas mencionadas, existe também a Reserva Biológica de Sooretama (19 ° 3'24,51 "S 40 ° 8'51,83" O), localizada próxima aos municípios estudados (figura 8). Embora não seja habitada por espécies de aviárias migratórias, possui importantes espécies de aves endêmicas e rica vegetação de mata atlântica (<https://www.icmbio.gov.br/rebiosooretama/>).

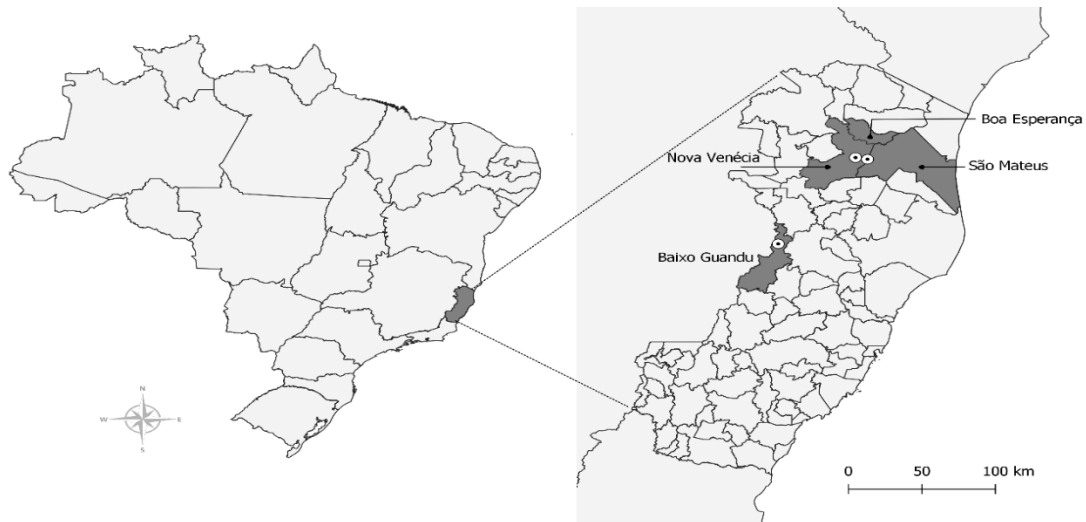


Figura 7. Áreas de ocorrência dos casos neurológicos em equídeos no Espírito Santo, Brasil. O mapa ampliado mostra as quatro cidades com casos relatados. Os círculos brancos indicam a localização das fazendas de onde foi confirmada a infecção por WNV associada à encefalite equídea. A localização geográfica das fazendas com infecção pelo WNV confirmada é: NV 01/18 (18.6883713 S; 40.4082043 W); NV 40/18 (18,702494 S; 40,329336 W); BG 42/18 e BG 43/18 (19.3993 S; 40.9167 W).

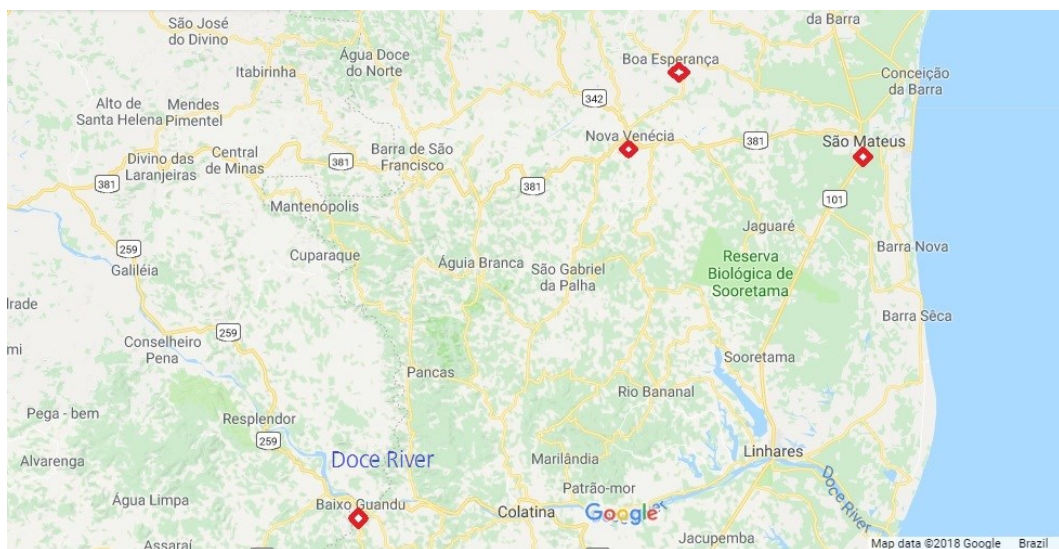


Figura 8. Localização da Reserva Biológica de Sooretama no Estado do Espírito Santo (ES). Os municípios do estudo estão sinalizados com símbolo vermelho (Fonte: *Google maps*)

4.2.2. Descrição dos casos clínicos: animais encaminhados para diagnóstico

No dia 17 de maio de 2018, foram encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, material biológico sob refrigeração e previamente congelados (-20 °C) enviado pela

Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo (SESA). Neste material constavam fragmentos do SNC (córtex, tronco cerebral, cerebelo e medula) de quatro equídeos (dois cavalos e dois burros) que vieram a óbito com sinais de doença neurológica. As amostras foram identificadas como: NV 01/18, NV 40/18, BG 42/18 e BG 43/18 (Tabela 1). Os espécimes foram previamente testados para raiva no Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), pertencente à Secretaria de Estado da Agricultura, e apresentaram resultados negativos. As amostras foram armazenadas a -80°C até a análise.

Tabela 1– Identificação dos animais avaliados no estudo

Identificação	Espécie	Gênero	Idade (anos)	Município de Origem	Data óbito	Tipo de óbito
NV01/18	Equino	Fêmea	4	Nova Venécia	24 abril 2018	Eutanásia
NV40/18	Equino	Macho	8	Nova Venécia	9 maio 2018	Morte
BG42/18	Asinino	Fêmea	4	Baixo Guandu	11 maio 2018	Eutanásia
BG43/18	Asinino	Fêmea	19	Baixo Guandu	23 abril 2018	Eutanásia

Um questionário específico com informações relevantes para cada animal foi coletado, incluindo dados epidemiológicos, sinais clínicos e duração do curso clínico. De acordo com os dados obtidos, os principais sinais clínicos observados em todos os quatro animais incluíram tremores musculares, disfagia, ataxia dos membros anteriores, decúbito lateral e movimentos de pedalagem nas primeiras 24 horas. Após esse período, os animais apresentaram paralisia de membros pélvicos, perda de sensibilidade da coluna vertebral, trismo mandibular e movimentos de pedalagem (figura 9).



Figura 9. A. Animal BG43/18 em decúbito lateral. B. Animal BG42/18 apresentando prostração e relutância em caminhar

Um dos animais veio a óbito em 72 horas após início dos sinais clínicos e os demais foram submetidos a eutanásia devido a gravidade e prognóstico desfavorável, dentro deste mesmo período (72 horas) (Tabela 1). Os equídeos incluídos neste estudo não viajaram para áreas do país nas quais WNV havia sido relatado anteriormente e tinham um histórico de imunização anual contra o vírus da raiva. Além disso, o cavalo identificado como NV 01/18 foi previamente vacinado contra Alfavírus (vírus da encefalite equina do leste - EEEV, vírus da encefalite equina do oeste - WEEV), influenza A equina e herpesvírus equino 1 e 4 (EHV - 1 e EHV - 4), e o cavalo identificado como NV 40/18 tinha histórico de vacinação contra EEEV, WEEV, influenza A equina e tétano. Nenhum dos animais foram vacinados contra o WNV.

4.2.3 – Extração do ácido nucleico viral (DNA e RNA).

Fragmentos do córtex, tronco cerebral, cerebelo e medula de cada animal foram agrupados e homogeneizados com auxílio de pistilo. Em seguida, cada material foi diluído 20 vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,0-7,4) suplementado com penicilina (200 UI / mL), estreptomicina (200 µg / mL) e anfotericina B (2,5 µg / ml), em um tubo tipo falcon de 50 mL (Sarstedt).

Posteriormente, a suspensão foi agitada em agitador de tubos tipo vórtex e mantida a 4 °C *overnight*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $4.000 \times g$ ou 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado usando um filtro de seringa de 0,22 μm .

Para extração de DNA foi utilizado kit comercial DNA Extraction Kit Mini Spin (Kasvi, Brasil), seguindo recomendação do fabricante.

O reagente Trizol® (Invitrogen, EUA) foi utilizado para a extração do RNA das amostras. Aliquotas de 300 μL das amostras foram acrescidas de 600 μL de Trizol® a 4 °C em um tubo de 1,5 mL. Em seguida foram homogeneizadas em vortex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após, foram acrescidos 300 μL de clorofórmio a 4 °C, as amostras homogeneizadas em vortex por 15-30 segundos e incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. A camada aquosa formada após centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Após foram acrescentados 900 μL de isopropanol a 4 °C e a amostra foi incubada a -20°C *overnight*.

Posteriormente, uma nova centrifugação a 13.000 xg durante 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi então lavado com 1 mL de etanol 75% a 4 °C e centrifugado a 13.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco durante 10 minutos à temperatura ambiente. Como etapa final da extração, foram acrescentados 30 μL de água ultrapura tratada com DEPEC e armazenadas a 4 °C até processamento.

A concentração e pureza do RNA/DNA extraído de cada amostra foi estimada através do aparelho NanoVue® (GE, Healthcare) por densidade óptica.

4.2.4 – Primers utilizados no estudo

Uma avaliação previa com palavras chaves foi realizada utilizando como ferramenta de busca o *Pubmed*. Inicialmente a pesquisa foi destinada para os artigos relacionados com biologia molecular (RT-PCR) para os gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*, considerando os vírus destes gêneros que podem estar associados a desordens neurológicas nos equídeos. A pesquisa resultou em mais de 1700 e 400 artigos, respectivamente (figura 10). Em seguida, foram utilizados como critérios o N amostral, técnica utilizada (preferencialmente RT-PCR convencional), região do genoma utilizada, parâmetros para amplificação e, principalmente, se os primers em questão poderiam ser usados para amostras brasileiras já depositadas no *GenBank* (Anexo 1).

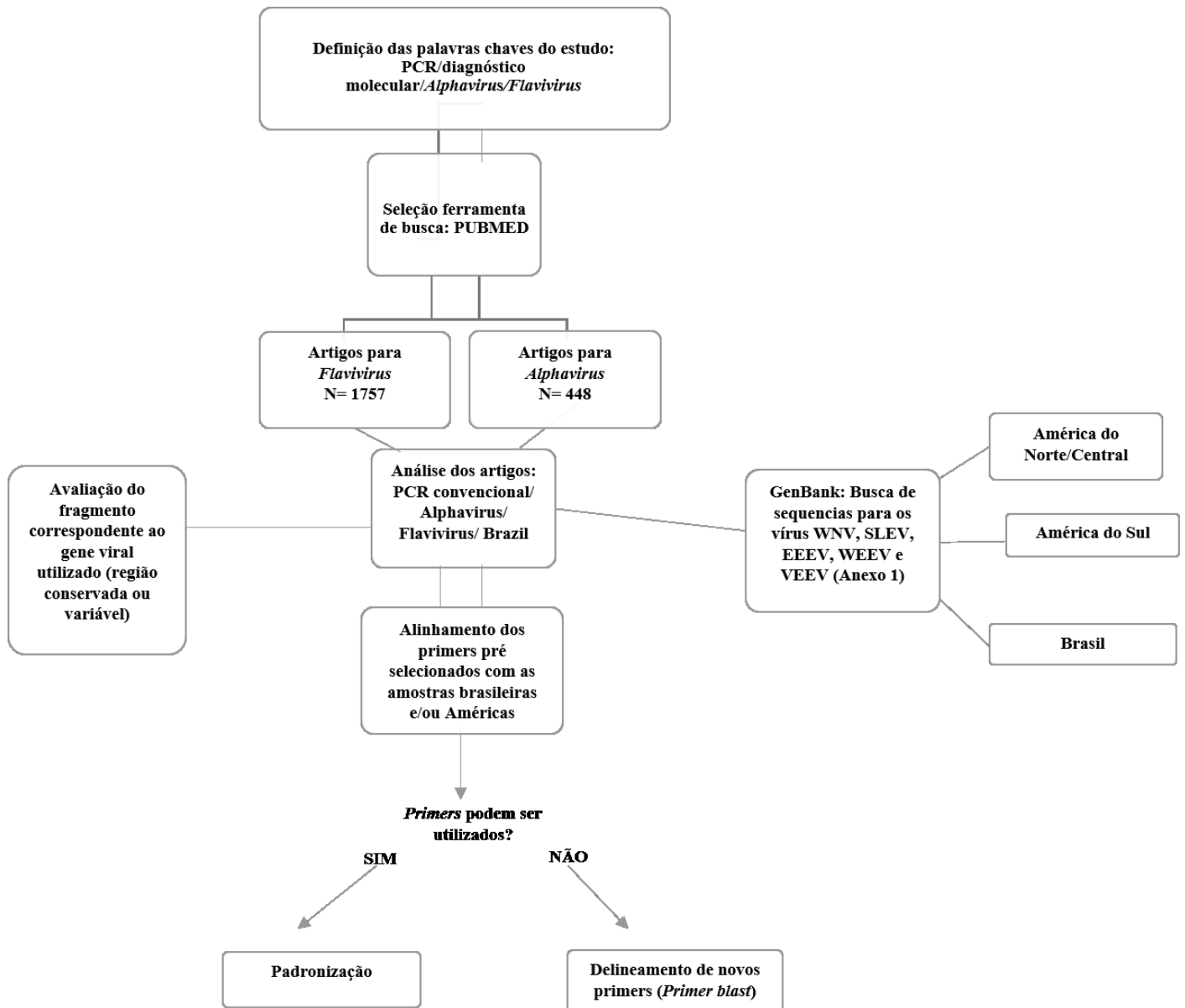


Figura 10. Fluxograma apresentando esquema de escolha dos primers

Os *primers* utilizados neste estudo e suas respectivas temperaturas de anelamento ($T_{melting}$ °C) estão descritos na tabela 2.

Tabela 2- *Primers* utilizados no estudo

Vírus	Primer	Gene	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)	Referência
	OF8(+)	ORF3	GTGGACGGTACCCCGGAC	380	60	
EHV-1	OR2(-)		GTGGGGATTTCGCGCCCTCACC			Allen, 2006
	OF7(+)		GGGAGCAAAGGTTCTAGACC	256	55	
	OR3(-)		AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG			
Alphavirus (Pan)	M2W(+)	NsP1	YAGAGCDTTTTCGCAWSTRGCH W	434	53	Pfeffer <i>et al.</i> , 1997
	M3W(-)		ACATRAANKNGTNGTRTCRAA NCCDAYCC			
EEEV	EEE(+)		CCACGGTACCGTTGCC	124	53	de Morais Bronzoni <i>et al.</i> , 2005
	M3W(-)		ACATRAANKNGTNGTRTCRAA NCCDAYCC			
WEEV	WEE(+)		GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208	56	de Morais Bronzoni <i>et al.</i> , 2005
	M3W(-)		ACATRAANKNGTNGTRTCRAA NCCDAYCC			
VEEV	VEE(+)		ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400	53	
	M3W(-)		ACATRAANKNGTNGTRTCRAA NCCDAYCC			
Flavivirus (Pan)	FG1(+)		TCAAGGAACTCCACACATGAGA TGTACT	958	56	Fulop <i>et al.</i> , 1993
	FG2(-)		GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATC AGCATACA			

SLEV	FG1(+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGA TGTA CT	332	56	de Morais Bronzoni <i>et al.</i> , 2005
	SLEV(-)	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT			
WNV	WNVF2 (+)	AACCKCCAGAAGGAGTSAAR	370	56	Este estudo
	WNVR2 (-)	AGCYTCRAACTCCAGRAAGC			

As condições de ciclagem dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo estão especificados em cada item do agente viral pesquisado.

Como um controle interno para a eficiência da amplificação, foram usados *primers* para o gene do fator de crescimento da insulina (IGF-1) (MIKAWA *et al.*, 1995). Como um controle negativo para todas as reações de RT-PCR e PCR realizadas no estudo, usamos o RNA/DNA extraído do SNC de equino que previamente testou negativo para os vírus do gênero flavivírus, alfavírus, bem como EHV - 1 e vírus da raiva. Além disso, um controle negativo “master - mix” usando água livre de DNA / RNase no lugar do ácido nucleico extraído (RNA/DNA) também foi utilizado.

4.2.5 - Desenho e padronização do *primer* para WNV

Após a pesquisa mencionada acima, os *primers* para as reações *nested* WNVF2 e WNVR2 (Tabela 2) foram desenhados utilizando-se o programa *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), a partir da sequência de nucleotídeos da posição 8.780 a 9.150 da amostra “West Nile virus linhagem 1, genoma completo estirpe NY99” (GenBank NC009942), visando à amplificação de fragmento do genoma viral que codifica a proteína NS5 do vírus.

Adicionalmente, uma avaliação do fragmento do genoma viral que codifica a proteína NS5 das sequências do continente americano já depositadas (GenBank) foi realizada utilizando alinhamento múltiplo no MAFFT (KATO H *et al.*, 2019) e posterior análise no Aliview (LARSSON, 2014) objetivando avaliar a utilização do *primer*.

Para padronização do *primer* desenhado para WNV, temperaturas de anelamento foram testadas de acordo com a sequência do *primer* avaliadas com o programa *Primer -Blast* e auxílio do site <https://tcalculator.neb.com/> através do *Tm calculator*. As demais condições de temperatura foram efetuadas de acordo com o fabricante (reagentes Invitrogen) (tabela 3).

Para o teste, utilizamos como controle positivo DNA de plasmídeo contendo o gene NS5 da estirpe de NY99 gentilmente cedido pelo Prof. Maurício L. Nogueira (Faculdade de

Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP). Como resultado do teste, a temperatura de anelamento para o *primer* WNVF2/WNR2 foi de 56 °C (figura 11).

Tabela 3- Condições de temperatura e ciclagem testadas na *nested* PCR para WNV

Etapa programa	Teste 1	Teste 2
Desnaturação inicial	94 °C – 5 min	94 °C – 5 min
Desnaturação*	94 °C – 30 seg	94 °C – 30 seg
Anelamento*	53 °C – 45 seg	56 °C – 45 seg
Extensão*	72 °C - 45 seg	72 °C - 45 seg
Extensão final	72 °C – 7 min	72 °C – 7 min

*40 ciclos. Em negrito e sombreadas - temperaturas de anelamento (T °C) testadas

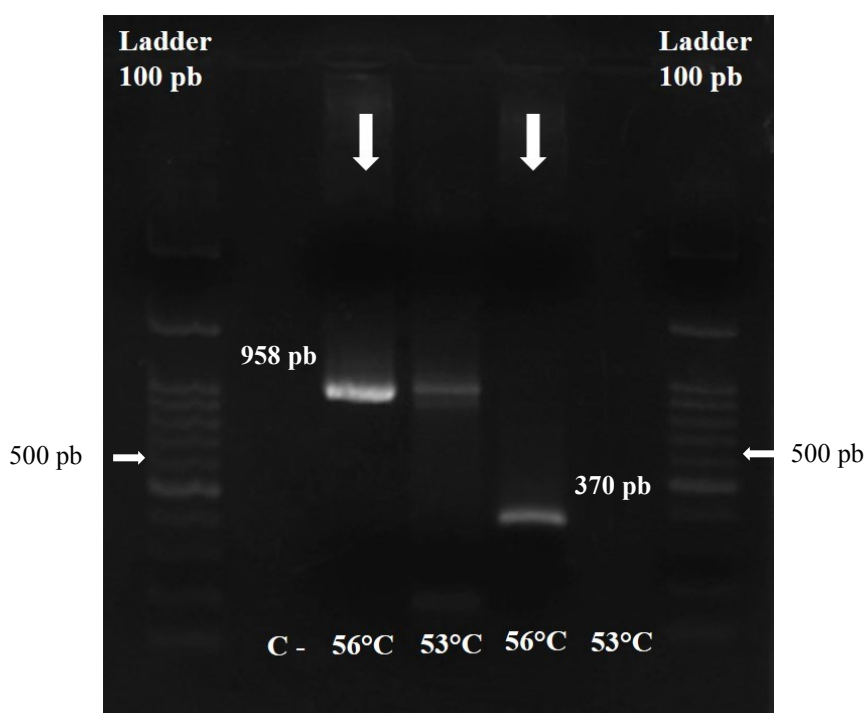


Figura 11. Resultado do teste de padronização da T_a °C do primer. Seta branca vertical: indicando a melhor temperatura (56 °C). C-: controle negativo; Ladder 100 pb DNA RTU, KASVI

4.2.6 – Reação de PCR para Herpes vírus equino 1 (EHV1)

O diagnóstico de herpesvírus equino 1 foi realizado por *nested* PCR direcionado para o gene ORF30, de acordo com Allen, 2006 (Tabela 2).

Na primeira reação de PCR foram utilizados 0,5 μM dos oligonucleotídeos OF8 e OR2, juntamente com 2,5 μL de Tampão 10 X (Phoneutria), 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de DNTP (Phoneutria), 0,5 μL de taq DNA polimerase (Phoneutria) (5U/ μL), 3 μL de DNA (100 ng) e 15,25 μL de água livre de DNase/RNase em um total de 25 μL de reação. As condições de ciclagem foram 94 ° C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 ° C por 1 minuto, 60 ° C por 1 minuto, 72 ° C por 1 minuto e uma etapa de etapa de extensão final de 72 ° C por 5 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

Para a segunda reação foram utilizados os oligonucleotídeos OF7 e OR3 e a concentração dos reagentes utilizados foi igual a primeira reação, porém com 2 μL de amplicon da primeira reação e temperatura de anelamento de 55 °C.

O controle positivo utilizado foi isolado em linhagem celular contínua de rim de bovino (*Madin-Darby Bovine Kidney* - MDBK) a partir de um cavalo positivo para o vírus (COSTA *et al.*, 2015) e faz parte de um bando de amostras do LPVA.

4.2.7– Reação de RT-PCR para *Alphavirus*

A investigação diagnóstica dos alfavírus foi realizada por reação de transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR) gênero específica utilizando os primers M2W e M3W direcionados ao gene da proteína não estrutural Nsp1 dos vírus do gênero (PFEFFER, *et al.*, 1997). Para a reação foi usado o kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) seguindo recomendações do fabricante. Foram utilizados 12,5 μL de mix buffer 2x (0,4 mM de cada dNTP e 3,2 mM de MgSO_4), 0,4 mM de MgSO_4 5mM, 0,6 μM de cada iniciador (M2W/M3W) 10 pmol, 1 μL de enzima SuperScript III RT/Platinum Taq Mix, 5 μL de RNA (100 ng) e 1,5 μL de água livre de DNA/RNase para um total de 25 μL de reação.

As condições de ciclagem foram 45 ° C por 30 minutos, 94 ° C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 ° C por 30 segundos, 53 ° C por 45 segundos, 68 ° C por 45 segundos e uma etapa de etapa de extensão final de 68 ° C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

O controle positivo da reação foi uma amostra positiva para EEEV, cedido gentilmente pelo Prof. Maurício L. Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP).

As reações de *nested* PCR específicas foram realizadas utilizando cDNA da reação de RT-PCR. Os oligonucleotídeos utilizados e as respectivas temperaturas de anelamento (T_m °C) estão listados na tabela 2.

As reações de PCR específicas foram realizadas utilizando cDNA da reação de RT-PCR. Para cada reação foram utilizados 0,4 μM dos oligonucleotídeos (10 pmol) de cada vírus, 2,5 μL de tampão de PCR 10 \times (Tris -HCl 200 mM [pH 8,4], KCl 500 mM), 1,5 mM de MgCl_2 50mM, 0,4 mM DNTP mix 10mM, 0,3 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ MI)

(Platinum Taq DNA polimerase; Invitrogen), 2 µL de cDNA e 16,45 µL água livre de DNase/RNase para um total de 25 µL.

As temperaturas da ciclagem foram 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, (T_m °C de cada primer) por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, seguidos de 72 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um VeritiThermalCycler (AppliedBiosystems, EUA).

Os controles positivos (reação de *nested* PCR) foram genes sintéticos (gBlocks gene Fragments – Integrated DNA Technologies) desenhados de acordo com a região nsP1 dos respectivos vírus, exceto para EEEV onde foi usado o mesmo controle da reação de RT-PCR gênero específica.

4.2.8 - Reação de RT-PCR para *Flavivirus*

A investigação diagnóstica dos flavivírus foi realizada por reação de transcrição reversa (RT - PCR) gênero específica utilizando os primers FG1 e FG2 direcionados ao gene da proteína não estrutural NS5 dos vírus do gênero (FULOP *et al.*, 1993).

Para a reação foi usado o kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) seguindo recomendações do fabricante. Foram utilizados 12,5 µL de mix buffer 2x (0,4 mM de cada dNTP e 3,2 mM de MgSO₄), 0,4 mM de MgSO₄ 5mM, 0,6 µM de cada iniciador (FG1/FG2) 10pmol, 1 µL de enzima *SuperScript III RT/Platinum Taq Mix*, 5 µL de RNA (100 ng) e 1,5 µL de água livre de DNA/RNase para um total de 25 µL de reação.

As condições de ciclagem foram 45 °C por 30 minutos, 94 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 45 segundos, 68 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão final de 68 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

O controle positivo da reação foi uma amostra de cultivo celular do vírus zika (ZIKV) cedido gentilmente pelo Dr. Alexandre Magalhães Vieira Machado (FIOCRUZ-MG).

As reações de *nested* PCR específicas foram realizadas utilizando cDNA da reação de RT-PCR. Os oligonucleotídeos utilizados e as respectivas temperaturas de anelamento estão listados na tabela 2.

As reações de PCR específicas foram realizadas utilizando cDNA da reação de RT-PCR. Para cada reação foram utilizados 0,4 µM dos oligonucleotídeos (10 pmol) de cada vírus, 2,5 µL de tampão de PCR 10 × (Tris -HCl 200 mM [pH 8,4], KCl 500 mM), 1,5 mM de MgCl₂ 50mM, 0,4 mM DNTP mix 10mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA polimerase; Invitrogen), 2 µL de cDNA e 16,45 µL água livre de DNase/RNase para um total de 25 µL. As temperaturas da ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, seguidos de 72 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um VeritiThermalCycler (AppliedBiosystems, EUA).

Para reação específica para WNV, o DNA de plasmídeo contendo o gene NS5 da estirpe de WNV NY99 gentilmente cedido pelo Prof. Maurício L. Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP), foi utilizado como controle e para reação do SLEV, foi utilizado gene sintético (gBlocks gene Fragments – Integrated DNA Technologies), desenhado de acordo com a sequência da proteína NS5 do vírus.

4.2.9 - Análise dos produtos da RT-PCR e PCR

Os resultados das reações foram visualizados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio. No gel foram aplicados 10 µL dos amplicons adicionados a 2 µL de tampão de amostra 10X (Phoneutria) e a eletroforese ocorreu a 120V por 40 minutos, em tampão TBE 1X (100mM Tris-base pH 8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando-se o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA (*ladder*), KASVI. Após a corrida, o resultado foi visualizado em luz UV.

4.2.10 - Sequenciamento

Os amplicons da primeira e segunda reações das amostras clínicas positivas para WNV foram purificados com o kit DNA Clean & Concentrator (ZymoResearch, EUA), conforme instruções do fabricante. Após, foram sequenciados de acordo com as instruções do kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), utilizando o ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas em triplicata, em ambas as direções, utilizando os primers específicos (sense e antisense) que foram utilizados nos ensaios de *nested* PCR descritos anteriormente (Tabela 2).

4.2.11 - Análise filogenética

Os dados da sequência de nucleotídeos foram analisados e montados usando o SeqMan Software 7.1.0 (DNASar Inc.). As sequências foram então comparadas por BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

As sequências consenso de duas amostras (NV040 e BG43) foram alinhadas com outras 38 sequências de WNV selecionadas de diferentes países, através do MAFFT (KATO et al., 2013). O conjunto de dados foi editado usando AliView, removendo as regiões genômicas que não correspondem a região amplificada. A região utilizada equivale a posições do nucleotídeo 8.396 ao nucleotídeo 9.231 do alinhamento, um total de 834 nucleotídeos, correspondendo a fragmento que codifica a proteína NS5 do vírus. Após, uma árvore filogenética foi construída com o método de máxima verossimilhança usando o software IQ-TREE 2.0 (NGUYEN *et al.*, 2015) (<http://www.iqtree.org>) com seleção automática de modelo de substituição de nucleotídeos, que foi GTR + F + I + G4. Para a avaliação do suporte dos ramos, foram realizadas 1000 repetições de bootstrap. O gráfico da árvore foi editado usando o iTOL v.5 (LETUNIC *et al.*, 2019) (<https://itol.embl.de>).

4.2.12 - Avaliação histopatológica

Fragmentos do SNC de todos os quatro animais armazenados em formaldeído a 10% foram recebidos para análises histopatológicas. No material enviado constava o telencéfalo e, no caso do cavalo NV 40/18, também foram encaminhados fragmentos de tronco encefálico e cerebelo. Os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina neutra e tamponada a 10%, processadas pela técnica de rotina de inclusão em parafina. Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas em banhos sucessivos de álcool 70%, 80%, 90% e 2 banhos em álcool 100%, diafanizadas em 2 banhos de xilol e impregnados por banho em parafina líquida a 65°C por 1 hora. As amostras foram incluídas em parafina e os cortes histológicos, com cerca de 5 micrômetros, submetidos a coloração pela técnica da hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio óptico (Leica DMLS, Alemanha), (LUNA, 1968).

Os tecidos foram processados no Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG e a análise final foi realizada com a colaboração do professor Felipe Pierezan.

4.2.13- Inoculação em cultivo celular

A suspensão proveniente do macerado do SNC de cada animal do estudo foi inoculada em cultivo celular, porém apenas o material do animal NV01/18 não apresentou toxicidade à célula e obteve resultado melhor em comparação com os demais.

Para identificação e avaliação dos efeitos citopáticos (ECP) ocasionados pelo WNV em cultivo celular foram utilizadas alíquotas de suspensão do material do animal NV01/18 previamente filtradas com um filtro de 0,2 µm. Foram utilizadas células VERO (*African Green Monkey*) (ATCC ® CRL-1586) em garrafas A25 (25 cm²) com 80-85% da confluência da monocamada celular, sendo estas mantidas em meio essencial mínimo (MEM) com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 1% de anfotericina. Na inoculação, foi utilizado 1 mL da amostra e aplicado na monocamada na garrafa A25, seguido de incubação por uma hora, com agitação leve a cada 15 minutos, em estufa a 37 °C. Após este período, foi acrescentado 4 mL de MEM suplementado com 1% de SBF e antimicrobianos com a mesma proporção já mencionada.

A garrafa foi mantida na estufa a 37 °C e ambiente de 5% de CO₂ até apresentar 90% de efeito citopático ou, preferencialmente, até o sétimo dia pós infecção. Durante este período, por duas vezes ao dia, foi avaliada a morfologia celular e presença de ECP. Foi realizado sucessivas inoculações com as suspensões virais em garrafas A25 seguindo os mesmos processos descritos anteriormente até a sexta passagem em que foi feita a imunofluorescência direta e, posteriormente, titulação viral. Como controle negativo, as mesmas condições foram seguidas, porém o inoculo foi MEM estéril.

Além disso, uma parte da suspensão foi coletada e alíquotas de 100 µL foram armazenadas a -80 °C em tubos de 1,5 mL para posterior teste molecular sendo submetida

a ensaios de *nested* RT-PCR para WNV (protocolo descrito anteriormente) a partir da terceira passagem celular para confirmação viral.

Paralelamente a inoculação na garrafa A25, uma placa de 6 poços com 80-85% de confluência (60.000 células/cm²) foi inoculada com 150 µL do material proveniente da quarta passagem em 4 poços e 2 poços foram mantidos como controle negativo, seguindo mesmo protocolo de incubação descrito anteriormente. Após observação da quinta passagem até 6 e 7 dias pós inoculação, coloração com cristal violeta a 1% e também com corante *May-Grunwald-Giemsa* foi realizada e posterior visualização no microscópio ótico.

4.2.14 – Imunofluorescência (IFA)

O cultivo inoculado na sexta passagem foi usado para teste de imunofluorescência indireta (IFI) usando anticorpo monoclonal para Flavivirus (pan Flavivirus) 4G2 específico para proteína do envelope viral (E). O procedimento foi realizado em uma placa de 24 poços com monocamada de células VERO na proporção de 50.000 células/cm².

A placa foi dividida em três partes, onde a primeira foi inoculada a suspensão viral pura, a segunda com suspensão diluída a 1:10 e a terceira contendo somente células. Foram inoculados 200 µL das amostras, ou meio nos poços de controle celular, em seguida a placa foi incubada por uma hora na estufa a 37 °C. Depois, foi completado com MEM suplementado com 1% de SBF e antibióticos (proporção usada anteriormente) e mantido na estufa a 37 °C e ambiente de 5% de CO₂.

Após seis dias do período de inoculação, a placa foi lavada duas vezes com 1ml de PBS1X. Posteriormente, a placa foi fixada com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos e após foi novamente lavada com 1 mL de PBS1X acrescido de Triton a 0,5% por 3 vezes com intervalo de 5 minutos entre as lavagens. Após foi adicionada 300 µL de solução de bloqueio (BSA 1%) em cada poço e a placa foi colocada em câmara úmida por 1 hora, seguido de lavagem (3x) com 1 mL de PBS1X. Em seguida, foi inoculado anticorpo monoclonal pan Flavivirus (diluição 1:10) na quantidade de 200 µL em cada poço, seguido de incubação da placa por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com tampão de enxague (PBS1X) e as células foram incubadas com 200 µL em cada poço do anticorpo secundário proteína G marcada com Alexa[®] Fluor 488 (Invitrogen[™] Califórnia, EUA) (diluição 1:500), por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente e em sala escura. Após este período, a placa foi corada com Azul de Evans por 10 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS 1X. Finalizado o processo, a placa foi visualizada no microscópio de fluorescência Leica DMIL LED 353689 (Leica, EUA). O anticorpo utilizado foi gentilmente cedido pela professora Laura Helena Veja Gonzales Gil.

4.2.15- Titulação viral

O título viral da sexta passagem foi determinado através da inoculação da amostra em monocamada de células Vero (ATCC® CRL-1586). O método foi realizado em placa de 96 poços com células Vero (50.000 células/cm²) e feito diluições decimais sucessivas (10⁻¹ até 10⁻¹⁰) da amostra com oito repetições por coluna. A placa foi mantida na estufa em ambiente de 5% de CO₂ a 37°C por sete dias pós-inoculação até sua leitura. Depois da incubação, o meio foi desprezado e a placa foi fixada e corada com solução de cristal violeta a 1% por 10 minutos. O título viral foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938) e expresso como dose infectante para cultura de células com 50% de ECP (TCID₅₀ – *tissue culture infective dose 50%*) em mL.

4.3. Resultados

4.3.1 - PCR

Todas as amostras foram positivas para gênero flavivírus usando um RT - PCR genérico que amplifica 958 pb do gene NS5 e também foram positivas no ensaio de *nested* PCR específico para WNV, produzindo amplicons de aproximadamente 370 pb. Os materiais testados foram negativos para os demais vírus pesquisados.

4.3.2 – Análise das sequências

O sequenciamento dos amplicons maiores (958 pb) foi possível apenas para duas amostras, NV40 / 18 e BG43 / 18, devido à baixa quantidade de cDNA purificado das outras duas amostras.

Os amplicons da amplificação específica da *nested* PCR realizada com os primers desenhados neste estudo foram sequenciados e analisados, confirmando o diagnóstico de WNV. As sequências de nucleotídeos montadas foram nomeadas e depositadas no GenBank: WN / horse / BRA / NV40 / 2018 (861 bp; MH480666), WN / equid / BRA / BG43 / 2018 (834 bp; MH480667), WN / horse / BRA / NV01 / 2018 (258 pb; MH480668) e WN / equid / BRA / BG42 / 2018 (257 pb; MH480669).

A análise filogenética das amostras brasileiras neste estudo indica que elas se agrupam com sequências da linhagem 1 (Figura 12). As sequências NV40 / 2018 (861 pb; MH480666) e BG43 / 2018 (834 pb; MH480667) apresentaram alta identidade entre si e similaridade de 99,7% com a sequência WNV NY1999 (AF260967) dos EUA, 99,42% com sequência TVP 9117 (DQ080069) do México e 99,1% com a sequência ArEq003 (GQ379161) da Argentina. Além disso, duas diferenças de aminoácidos foram observadas entre as amostras brasileiras e as sequências da Argentina, EUA e México avaliadas porém sem mudança na proteína.

Tree scale: 0.1

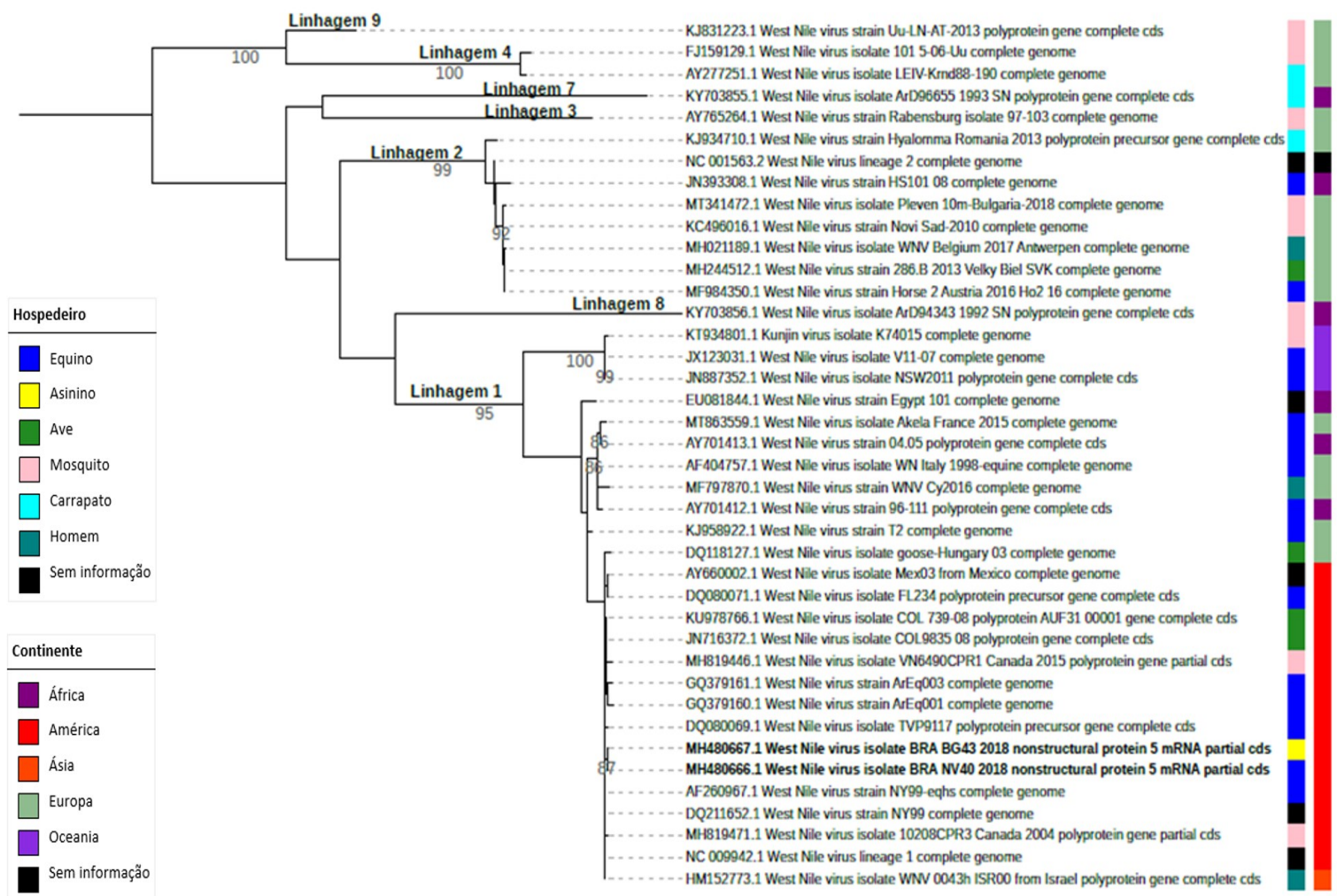


Figura 12. Árvore filogenética gerada a partir de seqüências de nucleotídeos de WNV de diferentes países e construída com o método de máxima verossimilhança usando o software IQ-TREE 2.0, com seleção automática de modelo de substituição de nucleotídeos. Para a avaliação do suporte dos ramos, foram realizadas 1000 repetições de bootstrap sendo que na figura estão representados apenas os valores maiores ou igual a 80. As seqüências deste estudo estão representadas em negrito. Os respectivos hospedeiros e continentes das seqüências utilizadas estão apresentados na árvore de acordo com a legenda (canto esquerdo). A linhagem ao qual a seqüência pertence está representada nos ramos iniciais.

4.3.3 - Avaliação na necropsia e histopatológica

Durante a necropsia dos animais, nenhuma alteração visível foi identificada. As análises histopatológicas do tronco cerebral e cerebelo do animal NV40 / 18 apresentaram manguitos perivascular moderados multifocais compreendendo linfócitos e alguns macrófagos, com infiltração leve de linfócitos, neutrófilos e células gliais proliferadas no neurópilo adjacente e no parênquima neural (Figura 13). Não foram observadas alterações histológicas nos fragmentos do telencéfalo de nenhum dos quatro animais.

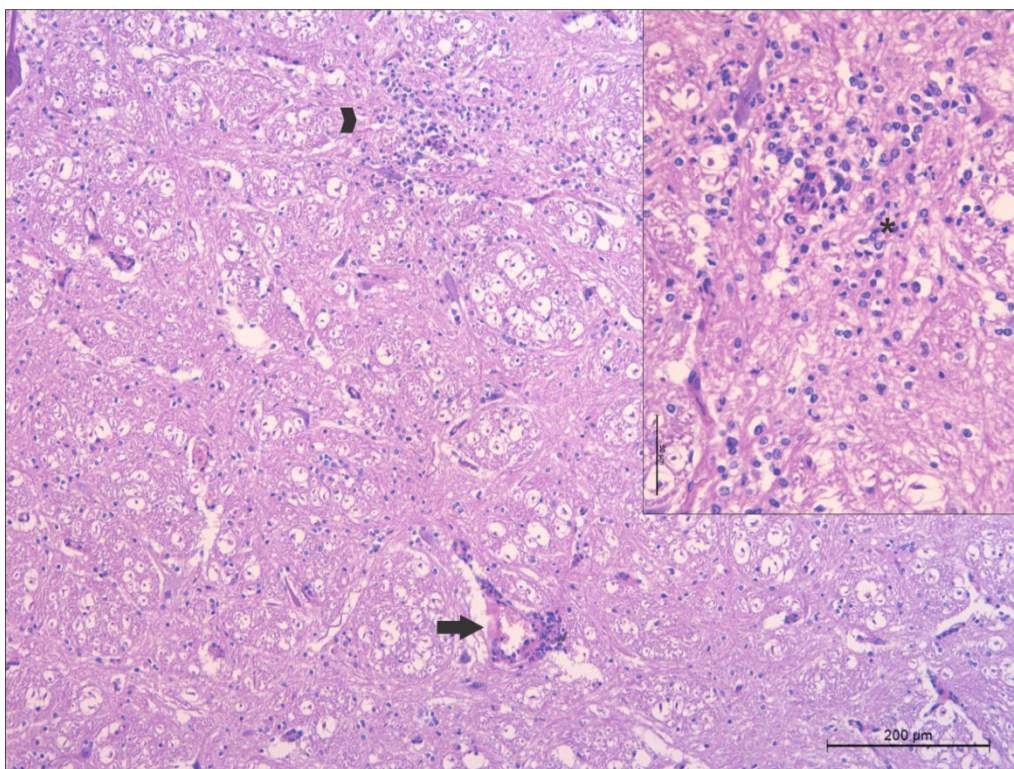


Figura 13. Tronco encefálico - manguito linfocítico e histiocítico (seta) e infiltração de linfócitos, neutrófilos (asterisco na figura de inserção - 400 ×) e células gliais proliferadas no neurópilo adjacente (cabeça de seta)

4.3.4 - Isolamento em cultivo celular

O material inoculado apresentou mudança de morfologia celular como arredondamento, células “afiladas” com citoplasma formando prolongamentos indicando início de apoptose celular e presença de vacúolos no citoplasma das células (figura 14). Para confirmação a *nested* RT-PCR, com mesmo protocolo realizado nas amostras de SNC, apresentou resultado positivo na terceira passagem.

A destruição da monocamada foi observada com mais intensidade na quarta passagem com vacuolização e perda de 80 a 90% da monocamada com 72 h após inoculação. Além do aumento da mudança de morfologia e morte celular, formação de sincício foi observado com 48 h pós inoculação, na quinta passagem.

O isolado apresentou título $10^{4,18}$ TCID₅₀/mL, determinado pelo método de Reed e Muench. A confirmação do isolamento de WNV no cultivo foi realizada através de IFA com marcação positiva no material com vírus puro, em menor intensidade no material com diluição (1:10) e nenhuma marcação no controle negativo (figura 15).

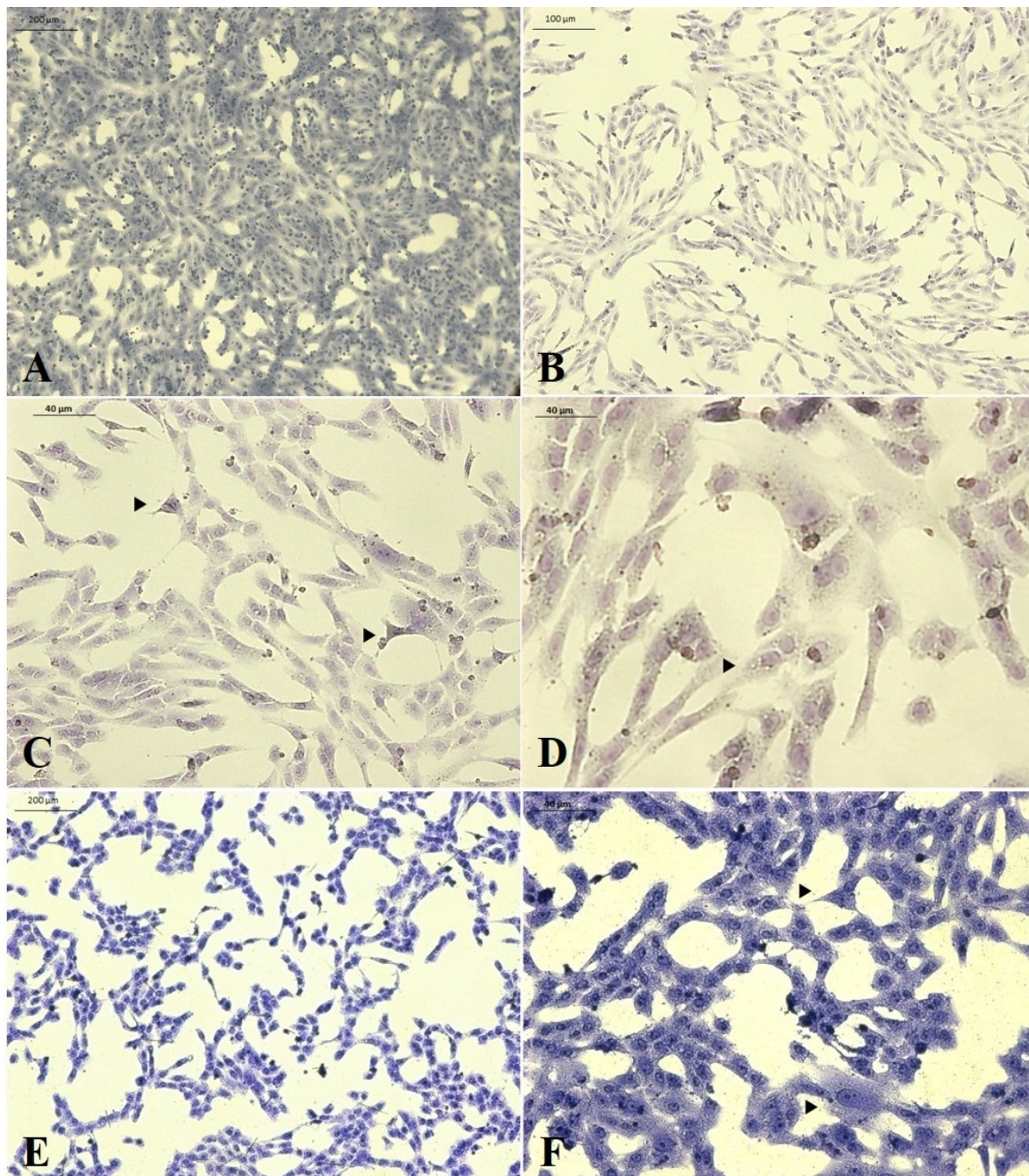


Figura 14. Resultado no cultivo celular da amostra NV01/18 em vero. A. Cultivo celular vero sem inoculação (controle negativo) 7 dias após inoculação (coloração May-Grunwald-Giemsa) aumento de 200x; B. Cultivo de vero 7 dias após inoculação (NV01/18) evidenciando ampla destruição da camada (coloração May-Grunwald-Giemsa) aumento de 100x; C e D. Cultivo 6 dias após inoculação do material NV01/18 com mudança de morfologia das células (ponta de seta preta em C) e vacúolos no citoplasma das células (ponta seta preta D) (coloração May-Grunwald-Giemsa) aumento de 40x. E e F. Cultivo de vero 7 dias após inoculação do material NV01/18 com destruição da camada celular (E) e mudança de morfologia das células (ponta de seta preta em F) (coloração Cristal Violeta) aumento de 200x e 40x.

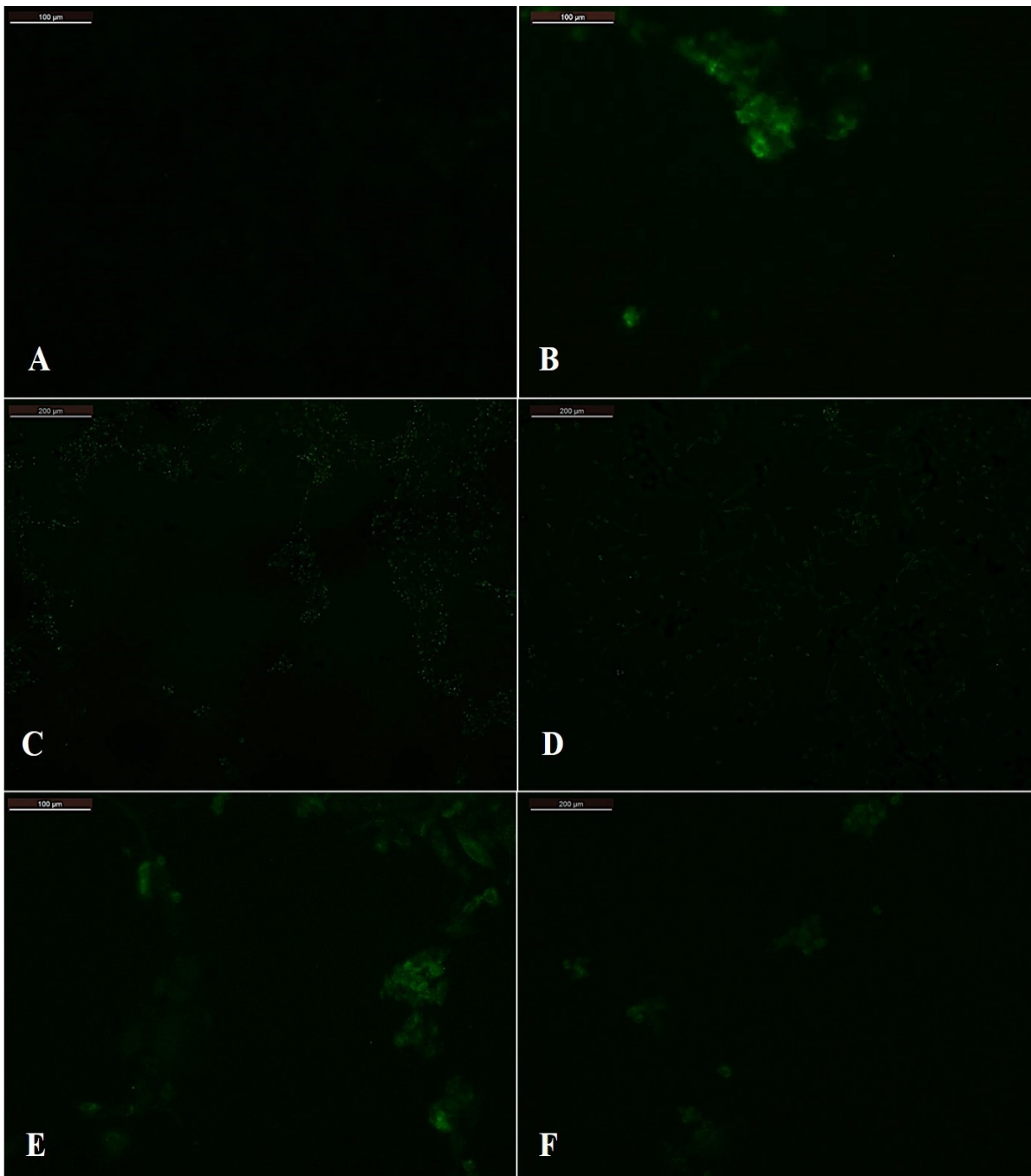


Figura 15. Resultado da IFA. A. Controle negativo (100x). B. Cultivo amostra sem diluir (100x). C. Cultivo amostra sem diluir (200x). D. Cultivo amostra diluída 1:10 (200x). E. Cultivo amostra sem diluir (100x) F. Cultivo amostra sem diluir (200x).

4.4. Discussão

Neste estudo de investigação diagnóstica, os fragmentos do SNC foram primeiramente testados para raiva e, após apresentarem resultados negativos, foi realizado o diagnóstico diferencial para demais encefalites virais, resultando em positivo para WNV nos quatro animais avaliados.

Os animais do estudo apresentaram quadro de encefalite caracterizado por paralisia, ataxia dos membros, decúbito com movimentos de pedalagem e paralisia dos membros pélvicos. Dentre estes sinais clínicos, a ataxia é comumente observada nos casos de infecção por WNV nos equídeos descritos na literatura (CANTILE *et al.*, 2000; MURGUE *et al.*, 2001; TROCK *et al.*, 2001; SALAZAR *et al.*, 2004; SCHULER *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2006; VENTER *et al.*, 2009; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2011; ANGENVOORT *et al.*, 2013).

No entanto, esta alteração ocorre em diversas doenças do SNC dos equídeos e pode estar presente nas infecções virais por herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) e nas encefalites equinas, por exemplo (FURR; REED, 2008). Assim, embora comum aos casos de infecção por WNV, não deve ser considerada como alteração característica bem como os demais sinais clínicos.

Desta forma, os sinais clínicos apresentados não são patognomônicos para uma encefalite viral em específico sendo necessárias técnicas laboratoriais para o diagnóstico conclusivo nos animais.

Adicionalmente, os equídeos avaliados apresentaram quadro encefálico agudo vindo a óbito ou foram eutanasiados em até 72 horas após início dos sinais clínicos. A duração dos sinais clínicos é variável na infecção por WNV sendo os casos agudos (1 a 5 dias) geralmente de maior gravidade resultando em óbito (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Na avaliação macroscópica de equídeos acometidos por WNV, alterações como hemorragias e congestão, principalmente no tronco encefálico e medula, podem ser observadas. Contudo, as lesões na maioria dos casos não são visualizadas no exame macroscópico, corroborando com a ausência de alterações na necropsia dos animais deste estudo (CANTILE *et al.*, 2001; RECH; BARROS, 2015).

Os achados histopatológicos identificados nos fragmentos de tronco encefálico e cerebelo da amostra NV40 / 18 sugerem um diagnóstico presuntivo de encefalite viral. A presença de infiltrados de células de defesa, principalmente mononucleares, ocorrem em resposta a infecção viral no SNC destes animais e podem ser encontrados na infecção causada por vírus neurotrópicos como EEEV, WEEV, VEEV, WNV, SLEV, RABV e EHV-1 (CANTILE *et al.*, 2000; OSTLUND *et al.*, 2000; CARRIERI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2013; RECH; BARROS, 2015).

Devido à ausência de lesões no telencéfalo dos animais, as encefalites pelos alfavírus EEEV, WEEV e VEEV que apresenta comumente lesões no córtex cerebral e tálamo, foi

inicialmente descartada (CANTILE *et al.*, 2000; RECH; BARROS, 2015). Além disso, o resultado inicial negativo para raiva também descartou a associação deste vírus às alterações encontradas. Desta forma, a morfologia e a localização das lesões poderiam ser sugestivas de flavivírus ou herpesvírus equino tipo 1 (CANTILE *et al.*, 2000, 2001; RECH; BARROS, 2015). No entanto, nos exames de biologia molecular os animais foram negativos para EHV-1.

Em cavalos com infecção por WNV, uma característica comum observada microscopicamente são os vários graus de polioencefalomielite linfocítica no tronco cerebral, mais proeminente na medula oblonga e ponte, e chifres ventrais do tórax e medula espinhal lombar (RECH; BARROS, 2015). As alterações encontradas são de encefalomielite não supurativa leve a moderada, associada com células inflamatórias linfoplasmocíticas, degeneração neuronal e gliose, principalmente na medula espinhal e tronco encefálico (CANTILE *et al.*, 2000, 2001; OSTLUND *et al.*, 2000; RECH; BARROS, 2015). Desta forma os achados histopatológicos deste estudo corroboram com o que tem sido observado na infecção por este arbovírus na literatura.

Além disso, considerando a importância da medula e tronco encefálico no diagnóstico histopatológico de WNV, sugere-se que o não envio destes fragmentos contribuiu para a ausência de lesões sugestivas da infecção por este arbovírus na avaliação histopatológica dos outros três animais (CANTILE *et al.*, 2000, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Na avaliação por RT-PCR genérico para os flavivírus, todas as amostras foram positivas. Além disso, foram positivas também usando o ensaio de *nested* PCR específico para WNV, confirmando a infecção por este arbovírus.

Os *primers* desenvolvidos por Fulop e colaboradores (1993) e utilizados na primeira reação deste estudo, são direcionados para fragmento do genoma viral que codifica a proteína NS5 (RNA polimerase dependente de RNA) dos *Flavivirus*. Esta proteína não estrutural desempenha funções muito importantes para replicação do ácido nucleico viral bem como na relação do sistema imune do hospedeiro com a infecção por WNV. Além disso, é conservada entre os diversos vírus do gênero sendo muito utilizada para diagnóstico (LANCIOTTI *et al.*, 2002; BALEOTTI *et al.*, 2003; ANGENVOOR *et al.*, 2013; BRINTON, 2014; HABARUGIRA *et al.*, 2020).

Adicionalmente, os *primers* utilizados na *nested* PCR (nPCR) proporcionaram a identificação específica e confirmação do WNV. Além disso, mostraram ser eficientes para a identificação das sequências de WNV detectadas no continente americano.

A reação *nested* RT-PCR para identificação de WNV nos equídeos tem demonstrado bons resultados em diversos trabalhos sendo indicada para o diagnóstico do vírus nos tecidos do SNC, por exemplo (JOHNSON *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; OIE, 2018). Esta técnica, comparativamente a PCR convencional, tem apresentado melhores resultados na detecção de WNV (JOHNSON *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004). No estudo com 73 amostras de equinos com alterações neurológicas, por exemplo, a avaliação dos tecidos do SNC por RT-nPCR

resultou em 17,8% de positivos enquanto a reação de RT-PCR convencional em uma única etapa obteve 2,7% de positivos para WNV (JOHNSON *et al.*, 2001). Além disso, a RT-nPCR demonstrou que pode ser igualmente eficaz que a RT-PCR em tempo real na detecção de WNV no SNC destes animais (KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

O sequenciamento dos amplicons resultantes da primeira e segunda reação confirmou o diagnóstico de WNV. Além disso, a análise filogenética indicou que as amostras avaliadas NV40 / 18 e BG43 / 18 estão incluídas na linhagem 1 do vírus, com alta similaridade com sequências isoladas nos EUA (NY1999 *Genbank* AF260967), no México (TVP 9117 *GenBank* DQ080069) e na Argentina, (ArEq003 *Genbank* GQ379161). A sequência da Argentina corresponde a primeira identificação do RNA viral de WNV na América do Sul em 2006, onde o vírus foi associado com quadro de encefalite aguda em equino semelhante ao quadro clínico dos animais deste estudo (MORALES *et al.*, 2006; FABBRI *et al.*, 2014). As sequências dos EUA e do México também foram isoladas de equinos que vieram a óbito no surto inicial do vírus nestes países (LANCIOTTI *et al.*, 1999; DEARDORFF, *et al.*, 2006).

A inclusão das sequências deste estudo no clado da linhagem 1 corrobora com o que já foi identificado no continente americano até o momento (LANCIOTTI *et al.*, 2002; FABBRI *et al.*, 2014; FALL *et al.*, 2017).

Embora o WNV apresente um único sorotipo, as análises filogenéticas indicam a classificação de genotipagem em nove linhagens (L1 -L9) classificadas de acordo com fatores como patogenicidade, evolução, biologia e localização (FALL *et al.*, 2017; PÉREZ-RAMIREZ, 2017). Dentre estas linhagens, a L1 e L2 são consideradas as mais virulentas sendo atribuída a estas a ocorrência de graves surtos com doenças neurológicas e óbitos na população humana e animal (LANCIOTTI *et al.*, 2002; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; KUTASI *et al.*, 2011; OZKUL *et al.*, 2013; VENTER *et al.*, 2017; HABARUGIRA *et al.*, 2020).

Os isolados da linhagem 1 (L1) já foram identificados em todo mundo desde o continente africano, Ásia, Austrália, Europa bem como no continente Americano. A L1 é subdividida em sub-linhagens denominadas 1a, 1b e 1c (LANCIOTTI *et al.*, 2002; FALL *et al.*, 2017).

Por outro lado, a L2 foi associada à doença neurológica em equinos pela primeira vez em 2009, com a identificação e isolamento viral na África do Sul (VENTER *et al.*, 2009). Embora considerada endêmica na África subsaariana e Madagascar, esta linhagem tem se expandido sendo detectada em países da Europa como Hungria, Áustria, Grécia e Itália, acometendo equinos, aves e a população humana (KUTASI *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.*, 2014; VENTER *et al.*, 2017; VEO *et al.*, 2019).

Adicionalmente, além da diferença de patogenicidade entre as linhagens, observa-se uma variação também entre as estirpes dentro de uma mesma linhagem, como observado entre as estirpes avaliadas de cavalos dos EUA e da Itália comparativamente aos isolados de aves em Israel e equinos no Marrocos (CANTILE *et al.*, 2001; LANCIOTTI *et al.*, 2002;

KRAMER *et al.*, 2008). Desta forma, variantes genéticas de WNV distintas podem exibir diferentes patogenicidade entre mamíferos e espécies aviárias.

O aumento da virulência em algumas cepas de WNV tem sido atribuído a mudanças de aminoácidos em proteínas estruturais e não estruturais do vírus (CANTILE *et al.*, 2001; GOMINO; HOFLE, 2013; SUEN *et al.*, 2014). Pequenas variações nas sequências de nucleotídeos, por exemplo, que determinam mudanças não sinonímias de aminoácidos, podem contribuir para o aumento de virulência da estirpe, como foi observado em espécies de aves silvestres nos EUA e na Europa (GOMINO; HOFLE, 2013). Embora tenha sido identificado mudanças de aminoácidos nas sequências brasileiras, sugere-se que uma análise mais profunda da amostra brasileira identificada neste estudo deve ser realizada para entender a importância de mudanças específicas de aminoácidos ou mutações.

A presença de WNV também foi confirmada através do isolamento em células Vero a partir do SNC do equino NV01/18. O cultivo em células Vero é considerado o de escolha para o isolamento de amostras positivas (sangue, LCR e/ou tecidos), nas quais WNV produz efeito citopático (ECP) (CHU; NG, 2003; RICHARDS *et al.*, 2010; CDC, 2013; OIE, 2018).

As alterações na morfologia e morte celular visualizadas no cultivo e resultantes da multiplicação viral, foram compatíveis com o que é descrito na literatura (CHU; NG, 2003; KAUFFMAN *et al.*, 2003; RIOS *et al.*, 2007; RICHARDS *et al.*, 2010).

Na avaliação das células Vero em outro experimento após inoculação de material com quantidade de partículas virais conhecida, o início de perda da camada celular foi observado em 24 horas e mudanças das células como arredondamento e encolhimento foram visualizados com 48 a 72 horas após a inoculação (RICHARDS *et al.*, 2010). Neste estudo, embora mais discreto nas primeiras passagens, a inoculação de uma amostra de campo apresentou resultados semelhantes a estes.

Contudo, embora ECP tenha sido observado desde a primeira passagem com confirmação da multiplicação de WNV na RT-nPCR na terceira passagem, as mudanças nas células foram mais pronunciadas na quarta passagem com destruição de 80% da monocamada em 72 horas. No isolamento de WNV a partir de amostras de equídeos coletadas a campo, passagens subsequentes podem ser necessárias para que se obtenha resultado conclusivo (OSTLUND *et al.*, 2001; JONHSON *et al.*, 2002; MORALES *et al.*, 2006; OZKUL *et al.*, 2013; SCHVARTZ *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o título viral encontrado foi de $10^{4,18}$ TCID₅₀/mL. Este resultado corrobora com o que é descrito para infecção de WNV em equinos, com baixa carga viral mesmo nos tecidos do SNC (CANTILE *et al.*, 2001; BUNNING *et al.*, 2002; SCHVARTZ *et al.*, 2020).

Embora bons resultados podem ser obtidos na detecção do RNA viral em uma amostra de campo, a replicação bem-sucedida no cultivo de células está diretamente relacionado com a presença de vírus infecciosos e não defectivos (ROSSI *et al.*, 2005; RICHARDS

et al., 2010). Além disso, a linhagem e a estirpe utilizada também influenciam no cultivo de WNV nas células. Em cultivo de células Vero, assim como na linhagem C6/36, observou-se que algumas estirpes pertencentes a linhagem 2 apresentam um crescimento mais lento comparativamente ao que é visto com estirpes da linhagem 1 (VENTER *et al.*, 2009; BRIEN *et al.*, 2013).

Contudo, a marcação positiva através de anticorpo monoclonal específico para Flavivirus na técnica de imunofluorescência confirmou o isolamento do vírus a partir da amostra de campo. Além disso, foram observadas marcações semelhantes na IFA no cultivo de vero inoculado com o vírus em outros trabalhos publicados (CHU; NG, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2015).

A identificação de WNV neste estudo ocorreu em dois cavalos (*Equus caballus*) e em dois burros (*Equus asinus*). Embora a presença de anticorpos anti-WNV nestes animais, assim como nos muares (*E. caballus* x *E. asinus*), seja documentada desde a década de 1950 (SCHMIDT; MANSORY, 1963), a susceptibilidade dos asininos a infecção por WNV é pouco conhecida.

Estudos de investigação sorológica deste vírus em equídeos clinicamente saudáveis realizados na Argélia (2014), Espanha (2012), México (2009) e Turquia (2016/2018) encontraram anticorpos anti-WNV nos asininos avaliados (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2009; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2012; MEHMET *et al.*, 2016; LAFRI *et al.*, 2017; YILDIRIM *et al.*, 2018). Além disso, em alguns destes estudos a prevalência de anticorpos nos asininos foi superior a encontrada nos cavalos, sugerindo o uso destes animais como sentinelas nas regiões onde foi adotada vacinação para os rebanhos equinos auxiliando no monitoramento epidemiológico de WNV (GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2012; LAFRI *et al.*, 2017; YILDIRIM *et al.*, 2018)

Diante da pouca evidência clínica na literatura associado a identificação dos anticorpos contra o vírus em animais saudáveis, alguns autores sugerem que estas espécies podem ser mais resistentes a infecção por este arbovírus comparativamente aos cavalos, apresentando um quadro subclínico ou brando da doença (SALAZAR *et al.*, 2004; GARCÍA-BOCANEGRA *et al.*, 2012). Além disso, WNV foi identificado no soro de 4 burros por RT-PCR, porém não foi associado a infecção nos animais que estavam clinicamente normais no momento da coleta sugerindo uma infecção subclínica (YILDIRIM *et al.*, 2018).

No entanto, assim como no presente trabalho, Murgue e colaboradores (2001) descreveram quadro de desordem neurológica com ataxia e paralisia em um burro positivo para WNV na França. Além disso, recentemente a linhagem 1 de WNV foi associada a um quadro neurológico progressivo em um burro (*Equus africanus asinus*) de 30 anos de idade. O animal apresentava alterações semelhantes aos animais aqui estudados, com descrição de ataxia, incoordenação e decúbito resultando na necessidade de eutanásia (SCHVARTZ *et al.*, 2020). Assim, sugere-se que há uma determinada susceptibilidade dos asininos ao WNV.

Contudo, os estudos em asininos são escassos e mais pesquisas devem ser conduzidas para esclarecer aspectos como morbidade, mortalidade, bem como a patogenia da infecção pelo vírus nestes animais.

O Estado do Espírito Santo (ES) onde o vírus foi identificado possui, assim como demais regiões do país, condições favoráveis à cadeia epidemiológica de WNV, como clima, avifauna e presença de vetores competentes (VASCONCELOS *et al.*, 1991; BAYEUX *et al.*, 2019).

O ES possui clima tropical com temperaturas e umidade favoráveis para proliferação de mosquitos vetores de arboviroses como WNV (INMET, 2010; CIOTA; KRAMER, 2013). Além disso, no Estado foram criadas reservas de preservação da Mata Atlântica e de diversas espécies em risco de extinção, criando ambiente favorável para ocorrência de diferentes espécies aviárias na região (SIMON, 2009).

Contudo, a vegetação original do Estado do ES está sendo constantemente desmatada e substituída por vegetação artificial, como o eucalipto. Fatores como desmatamento, expansão das áreas agrícolas e da urbanização, mineração e criação de animais domésticos, colocam em proximidade reservatórios naturais e novos hospedeiros susceptíveis. Desta forma, a diminuição da biodiversidade observada em regiões com desastres ambientais favorece o desequilíbrio alterando populações de vetores e de hospedeiros vertebrados, com consequente aumento da taxa de doenças como as arboviroses (SEHGAL, 2009; PFEFFER; DOBLER, 2010; KILPATRICK, 2011; HABARUGIRA *et al.*, 2020). Além disso, a ação antrópica favorece a criação de criadouros artificiais para proliferação de diferentes mosquitos no ambiente urbano associado a presença de novos hospedeiros como o homem (VIEIRA *et al.*, 2019).

No continente americano diversas espécies do gênero *Culex* já foram associadas ao vírus, tais como *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus* e *Cx. interrogator* (ELIZONDO-QUIROGA; ELIZONDO-QUIROGA, 2013). Nos EUA a transmissão do WNV foi atribuída principalmente aos mosquitos *Culex*, intercalando seu grau de importância entre as espécies *Cx. pipiens*, *Cx. tarsalis* e *Cx. quinquefasciatus* (HAYES *et al.*, 2005).

A ocorrência da espécie *Cx. quinquefasciatus* é muito comum no Brasil, principalmente nas áreas urbanas (VIEIRA *et al.*, 2019; BRASIL, 2011). Um estudo para caracterizar e comparar a fauna de mosquitos da Floresta Nacional de Goytacazes (GNF) e do entorno no Estado do ES demonstrou abundante circulação das espécies de *Aedes scapularis*, seguido da espécie *Cx. nigripalpus*. Esse resultado pode ser explicado pela presença de galinhas no peridomicílio, grande diversidade de aves no ambiente florestal e *Cx. nigripalpus* apresentando comportamento ornitofílico (VIRGENS *et al.*, 2018). No Brasil, *Ae. scapularis* já foi associado a transmissão de outras arboviroses como Mayaro (MAY). Além disso, este mosquito possui comportamento alimentar diversificado que pode favorecer hábitos ornitofílicos, por exemplo (VIEIRA *et al.*, 2019).

Contudo, em vigilância entomológica realizada no período de 2009/2010 na Região do Pantanal (centro-oeste) concomitante a identificação de anticorpos anti-WNV em equinos

na mesma região, nenhum mosquito positivo foi detectado nas populações avaliadas (PAUVOLID- CORRÊA *et al.*, 2011; MELANDRI *et al.*, 2012)

Adicionalmente, estudos apontam que a movimentação de aves pode ter sido responsável pela introdução do WNV na Europa bem como por sua dispersão entre os Estados nos EUA, indicando a importância das aves migratórias na epidemiologia de WNV (RAPPOLE; HUBÁLEK, 2003; ROEHRIG, 2013). Algumas das espécies de aves migratórias que ocorrem no Brasil, já foram descritas como hospedeiros eficientes na transmissão do WNV. Dentre elas, estão incluídos o peneireiro-americano (*Falco sparverius*), descrito como uma espécie hospedeira no surto de WNV nos EUA com um índice de competência de hospedeiro de 0,93 para transmissão, a coruja-real (*Bubo virginianus*) com um índice de competência como hospedeiro de 0,88, e o borrelho-de-dupla-coleira (*Charadrius vociferus*) com um índice de competência como hospedeiro de 0,87 (KOMAR *et al.*, 2003). Embora não seja migratório, o pardal (*Passer domesticus*), amplamente distribuído no território nacional, foi considerado um hospedeiro altamente competente para transmissão (KOMAR *et al.*, 2003; NEMETH *et al.*, 2009a).

No Estado do Espírito Santo, as aves migratórias monitoradas são aquáticas ou costeiras. Entre as aves já registradas no Estado estão espécies migratórias do hemisfério norte como o *Falco sparverius* e *Falco peregrinus*, ambas espécies competentes para transmissão de WNV (KOMAR *et al.*, 2003; SIMON, 2009; NEMETH *et al.*, 2009b).

Adicionalmente, de acordo com o IDAF, foram notificados em 2017, vinte e cinco casos de mortalidade de equídeos relacionados a distúrbios neurológicos, porém não foi possível diagnóstico etiológico em nenhum dos animais. No entanto, em relação aos casos neurológicos fatais de 2018, foi confirmado o envolvimento de WNV em quatro animais, com diagnóstico positivo em dois equinos e dois asininos. Estes resultados fornecem evidências da circulação do vírus no Brasil fora do Pantanal e regiões Nordeste, anteriormente positivas por sorologia, e sugere que o vírus está se espalhando para a região sudeste do país.

Atualmente, este arbovírus encontra-se presente em todo mundo (sendo responsável por, além de perdas significativas nos rebanhos equídeos, mortalidades na população humana, caracterizando um potencial problema de saúde pública mundial (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019; HABARUGIRA *et al.*, 2020).

4. 5. Conclusões

A aplicação do método *nested* RT-PCR desenvolvido resultou na primeira identificação do RNA viral de WNV no Brasil. Além disso, o vírus foi isolado em cultivo celular. A detecção deste arbovírus no país desdobra um novo e urgente campo de pesquisas, bem como a necessidade de se conhecer as características epidemiológicas do vírus no país e assim coordenar a aplicação de medidas de controle e prevenção de forma eficaz.

4.6 Referências

- ALLEN, G. P. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 8, p. 1401–1405, 2006.
- ALONSO-PADILLA, J. et al. The continuous spread of West Nile virus (WNV): Seroprevalence in asymptomatic horses. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 8, p. 1163–1168, 2009.
- ANGENVOORT, J. et al. West Nile viral infection of equids. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2013.
- ANGENVOORT, J. et al. West Nile viral infection of equids. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2013.
- BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 379–382, 2003.
- BAYEUX, J. J. M. et al. Epidemiological surveillance of west nile virus in the world and Brazil: Relevance of equine surveillance in the context of “one health”. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, 2019.
- BOSCH, I. et al. West Nile virus, Venezuela [4]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 651–653, 2007.
- BOSCO-LAUTH, A. M.; BOWEN, R. A. West Nile Virus: Veterinary Health and Vaccine Development. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1463–1466, 2019.
- BOSCO-LAUTH, A. M.; BOWEN, R. A. West Nile Virus: Veterinary Health and Vaccine Development. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1463–1466, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*. Brasília Ministério da Saúde .3ª ed., p.1 -76, 2011.
- BRIEN, J. D.; LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Propagation, quantification, detection, and storage of west nile virus. **Current Protocols in Microbiology**, n.31, 2013.
- BRINTON, M. A. Replication cycle and molecular biology of the west nile virus. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 13–53, 2014.
- CANTILE, C. et al. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 31–35, 2000.
- CANTILE, C. et al. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 4, p. 414–421, 2001.
- CARRIERI, M. L. et al. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. **Journal of Virological Methods**, v. 138, n. 1–2, p. 1–9, 2006.
- CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **BMC Vet Res**, v. 35, n.4, p. 467-483, 2004.
- Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. CDC, Division of Vector-Borne Diseases, 2013.
- CHANCEY, C. et al. The global ecology and epidemiology of west nile virus. **BioMed Research International**, v. 2015, n. Figure 2, 2015.
- CHU, J. J. H.; NG, M. L. The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 12, p. 3305–3314, 2003.
- CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3021–3047, 2013.
- COLPITTS, T. M. et al. West Nile virus: Biology, transmission, and human infection. **Clinical**

- Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 635–648, 2012.
- COSTA, E. A. et al. Molecular characterization of neuropathogenic equine herpesvirus 1 Brazilian isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 67, n. 4, p. 1183–1187, 2015b.
- DAVIS, L. E. et al. West Nile virus neuroinvasive disease. **Annals of Neurology**, v. 60, n. 3, p. 286–300, 2006.
- DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696–702, 2005.
- DEARDORFF, E. et al. Introductions of West Nile virus strains to Mexico. **Emerging infectious diseases** v. 12, n. 2, p.314-318, 2006.
- ELIZONDO-QUIROGA, D.; ELIZONDO-QUIROGA, A. West Nile virus and its theories, a big puzzle in Mexico and Latin America. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 168–175, 2013.
- ELIZONDO-QUIROGA, D.; ELIZONDO-QUIROGA, A. West Nile virus and its theories, a big puzzle in Mexico and Latin America. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 168–175, 2013.
- FABBRI, C. M. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of two West Nile virus strains isolated from equines in Argentina in 2006 could indicate an early introduction of the virus in the southern cone. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 11, p. 794–800, 2014.
- FALL, G. et al. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 86251P, 2017.
- FULOP, L.; BARRETT, A. D. T.; PHILLPOTTS, R. *et al.* Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene sequences. **J Virol Methods**, v.44, p.179–188, 1993.
- FURR, M.; REED, S. Neurologic Examination. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.). **Equine Neurology**, Iowa: Blackwell Publishing, p. 65-77.
- GAMINO, V.; HÖFLE, U. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: A review. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, 2013.
- GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 2, p. 262–264, 2012.
- GARCÍA-BOCANEGRA, I. et al. West Nile Fever Outbreak in Horses and Humans, Spain, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.12, p.2397-2399, 2011.
- HABARUGIRA, G. et al. West Nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One health” implications. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1–51, 2020
- HAYES, E. B. et al. Epidemiology and transmission dynamic of West Nile Virus Disease. v. 11, n. 8, 2005.
- HAYES, E.B; O’LEARY, D. R. West Nile virus infection: a pediatric perspective. **Pediatrics**, v.113, p.1375–1381, 2004
- HERNÁNDEZ-TRIANA, L. M. et al. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: A review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. DEC, p. 1–8, 2014.
- INMET. Normais climatológicas, Instituto Nacional de Meteorologia, 2010 [Online]. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php>
- IWAMOTO, M. et al. Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. **New england journal of medicine**, v.348, n. 22, p. 2196-2203, 2003
- JOHNSON, D J et al. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse

- transcription-nested polymerase chain reaction assay. **Emerging infectious diseases** v.7, n.4, p.739-741, 2001.
- KATOH, K. et al. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v.20, n.4, p.1160-1166, 2019. Volume 20,
- KAUFFMAN, E. B. et al. Virus detection protocols for West Nile virus in vertebrate and mosquito specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3661–3667, 2003.
- KILPATRICK, A M. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. **Science**, v. 334, n.6054, p. 323-327, 2011.
- KLEIBOEKER S. B. et al. Diagnosis of West Nile virus infection in horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n.1, p. 2-10, 2004
- KOMAR, N. et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 311–322, 2003.
- KOMAR, N.; CLARK, G. G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 19, n. 2, p. 112–117, 2006.
- KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 61–81, 2008.
- KUTASI, O et al. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 25, n. 3, p. 586-591, 2011.
- LAFRI, I. et al. Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 50, p. 8–12, 2017.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96–105, 2002
- LANCIOTTI, R. S. et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2333–2337, 1999.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2333–2337, 1999.
- LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, **Bioinformatics**, v.30, n.22, p. 3276–3278, 2014.
- LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. **Nucleic Acids Res.** 2019.
- LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology (3rd ed.) New York, NY: Blakiston Division McGraw-Hill, 1968.
- MATTAR, S. et al. West Nile Virus antibodies in Colombian horses [7]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1497–1498, 2005.
- MEHMET, K. et al. Serological investigation of west nile virus infection in domestic horses and donkeys in Turkey. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 37, n. 1, p. 51–54, 2017.
- MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.
- MIKAWA, S. et al. Dynamic aspects in the expression of the goat insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene: diversity in transcription and post-transcription. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 87–92, 1995.
- MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1559–1561, 2006.
- MURGUE, B. et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35

- years. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 692–696, 2001.
- MURGUE, B.; ZELLER, H.; DEUBEL, V. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 267, p. 195–221, 2002.
- NEMETH, N. et al. Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). **Archives of Virology**, v. 154, n. 5, p. 783–789, 2009a.
- NEMETH, N. M. et al. Clinical evaluation and outcomes of naturally acquired West Nile virus infection in raptors. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 51–63, 2009b.
- NGUYEN, L.T. et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Mol Biol Evol.** 2015
- O'BRIEN, C. A. et al. Viral RNA Intermediates as Targets for Detection and Discovery of Novel and Emerging Mosquito-Borne Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–27, 2015.
- OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. West Nile Fever. **Terrestrial Animal Health Code**, p. 697-710, 2018.
- OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013
- OSTLUND, E. N. et al. Equine West Nile encephalitis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 665–669, 2001.
- OSTLUND, E. N. et al. Equine West Nile encephalitis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 665–669, 2001.
- OSTLUND, E. N.; ANDRESEN, J. E.; ANDRESEN, M. West Nile encephalitis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 16, n. 3, p. 427–441, 2000.
- OSTLUND, E. N.; ANDRESEN, J. E.; ANDRESEN, M. West Nile encephalitis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 16, n. 3, p. 427–441, 2000.
- OZKUL, A. et al. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: The first evidence for circulation of lineage 1 viruses. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. e546–e551, 2013.
- PAHO. Pan American Health Organization Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Washington, D.C. **PAHO**, 2017. Disponível em: <<http://www.paho.org>>. Acesso em: 29 jun. 2019.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.
- PEALER LN, et al. West Nile Virus Transmission Investigation Team. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **N Engl J Med**, v.349, p. 236–245, 2003
- PELLO, S. J.; OLSEN, G. H. Emerging and reemerging diseases of avian wildlife. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 357–381, 2013.
- PÉREZ-RAMÍREZ, E. et al. Pathogenicity evaluation of twelve west Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: Discrimination between three pathogenicity categories. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 4, p. 662–670, 2017.
- PETROVIĆ, T. et al. Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–19, 2018.
- PFEFFER, M. et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 709–718, 1997.
- PFEFFER, M.; DOBLER, G. Open Access REVIEW BioMed Central Emergence of zoonotic

- arboviruses by animal trade and migration. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 35, 2010.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020.
- RAPPOLE, J. H.; HUBÁLEK, Z. Migratory birds and West Nile virus. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 94, n. 32, p. 47–58, 2003.
- RECH, R.; BARROS, C. Neurologic Diseases in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 281–306, 2015.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.
- RICHARDS, S. L.; ANDERSON, S. L.; YOST, S. A. In vitro and in vivo effects of west nile virus propagated in cells of different passage. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 4, p. 436–440, 2010.
- RIOS, M. et al. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 2, p. 181–186, 2007.
- ROEHRIG, J. T. West Nile. **Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases**, p. 735–751, 2009.
- ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.
- ROSSI, S. L. et al. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 457–470, 2005.
- SALAZAR, P. et al. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 2, p. 267–274, 2004.
- SALAZAR, P. et al. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 2, p. 267–274, 2004.
- SCHMIDT, J. R.; EL MANSOURY, H. K. Natural and experimental infection of egyptian equines with west nile virus. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 415–427, 1963.
- SCHULER, L. A et al. Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225 n.7, p. 1084–1089, 2004.
- SCHVARTZ, G. et al. Molecular characterization of the re-emerging West Nile virus in avian species and equids in Israel, 2018, and pathological description of the disease. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2020.
- SEHGAL, R. N. M. Deforestation and avian infectious diseases. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 955–960, 2010.
- SHI, P. Y. et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1264–1271, 2001.
- SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921–923, 2013.
- SILVA, M. L. C. R. et al. Outbreaks of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 570–575, 2011.
- SIMON, J. E. A lista das aves do estado do Espírito Santo. **Livro de resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ornitologia, Aracruz-ES.**, p. LV–LXXXVIII, 2009.
- STEELE, K. E. et al. Pathology of fatal west nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 208–224,

2000.

SUEN, W. W. et al. Mechanism of west nile virus neuroinvasion: A critical appraisal. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2796–2825, 2014.

TROCK, S. C. et al. West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n.4, p.745-747, 2001.

VASCONCELOS, P. F. da C. et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Rev. Inst. Medicina tropical**, v.33, n.6, p.465-476, 1991.

VENTER, M. et al. Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 877–884, 2009.

VENTER, M. et al. West Nile Virus Lineage 2 in Horses and Other Animals with Neurologic Disease, South Africa, 2008-2015. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 12, p. 2060-2064, 2017.

VEO, C. et al. Evolutionary Dynamics of the Lineage 2 West Nile Virus That Caused the Largest European Epidemic: Italy 2011-2018. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2019.

VIEIRA, C. J. DA S. P. et al. Ecological aspects of potential arbovirus vectors (Diptera: Culicidae) in an urban landscape of Southern Amazon, Brazil. **Acta tropica**, v. 202, p. 105276, 2019.

VIEIRA, M. A. C. S. et al. Case report: West nile virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377–379, 2015.

WARD, M. P. et al. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 255–259, 2006.

YILDIRIM, Y. et al. Molecular and serological investigation of West Nile virus (WNV) infection in donkeys, horses and native geese in Turkey. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 169, n. 4–6, p. 87–92, 2018.

ZELLER, H. G.; SCHUFFENECKER, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 147–156, 2004.

5. Capítulo 3 – Avaliação do perfil epidemiológico das amostras de sistema nervoso central de equídeos com síndrome neurológica

Resumo

As doenças neurológicas estão entre as principais causas de óbito entre os equídeos. Dentro dos diferentes agentes etiológicos das desordens neurológicas, as encefalites virais apresentam grande relevância na saúde dos equídeos, bem como na saúde humana pois algumas são importantes zoonoses. No Brasil, embora muitos estudos isolados já tenham sido desenvolvidos, a estimativa dos equídeos acometidos pelas encefalites causadas pelos vírus como herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1), vírus das encefalites equina do leste (EEEV), oeste (WEEV) e venezuelana (VEEV), vírus do Nilo Ocidental (WNV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) ainda é desconhecido, bem como o perfil das amostras enviadas para diagnóstico do vírus da raiva (RABV). Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar as amostras de SNC de equídeos encaminhadas para o Laboratório de Saúde Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (LSA-IMA) e com resultado negativo para RABV. No período do estudo (junho 2018 a janeiro de 2019) foram encaminhadas pelo IMA um total de 76 amostras refrigeradas, 13 encaminhadas em blocos de parafina e 3 amostras em formol de equídeos com síndromes neurológica e/ou morte súbita. Testes de biologia molecular (*nested* PCR e *nested* RT-PCR) foram realizados nas amostras refrigeradas para EHV-1, WNV, EEEV, WEEV e VEEV e avaliação histopatológica em 16 amostras. Ao todo 4 amostras (4/78-5%) foram positivas para EHV-1, através da técnica de *nested* PCR. No exame de histopatologia, 4 amostras apresentaram lesões sugestivas de infecção viral, porém sem etiologia conclusiva. Os formulários (Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica) encaminhados com as amostras foram avaliados quanto a parâmetros relacionados aos animais (espécie, raça, gênero, vacinação) e parâmetros relacionados as amostras (fragmento enviado, aspectos da coleta e conservação dos tecidos). Foram observados muitos formulários incompletos (57%), ausência de medula em 51% das amostras enviadas e problemas relacionados com coleta e envio das amostras. O presente trabalho apresenta uma sugestão de abordagem para a avaliação dos equídeos que vieram a óbito por síndrome neurológica auxiliando na compreensão dos aspectos da coleta e envio de material encaminhados pelos veterinários que atuam no campo.

Palavras chaves: cavalos, SNC, encefalite viral, diagnóstico molecular

5.1. Introdução

As doenças neurológicas nos equídeos (cavalos, burros e mulas) são enfermidades quase sempre fatais e constituem importante causa de óbitos destes animais no Brasil (BRASIL, 1988; PIMENTEL *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2015a; SILVA *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019).

As afecções do sistema nervoso nos equídeos podem ter origem viral, parasitária, bacteriana, protozoária, traumática, neoplásica compressiva, ser decorrente da ingestão de plantas neurotóxicas, micotoxinas, de alterações hepáticas, entre outras causas (FURR; REED, 2008). Entre as causas de origem viral, destacam-se o vírus da raiva (RABV), herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1), alguns vírus classificados dentro dos gêneros *Alphavirus* (Encefalite Equina do Leste – EEEV, Encefalite equina do Oeste – WEEV e

Encefalite equina Venezuelana – VEEV) e *Flavivirus* (vírus de *West Nile* - WNV e vírus da Encefalite de *Saint Louis* – SLEV) (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; RECH; BARROS, 2015; KUMAR; PATIL 2017; OIE, 2018a).

No Brasil a recente identificação e crescimento dos casos de WNV em equídeos alertaram para ocorrência das encefalites virais zoonóticas nestes animais (BEAUX *et al.*, 2019; DE CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). O país possui um dos maiores rebanhos equídeos do mundo, mais de 5 milhões de cabeças de equinos e um rebanho de asininos e muares com mais de 1 milhão de cabeças (IBGE, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2018). Além disso, apresenta condições favoráveis para ocorrência das arboviroses (WNV, SLEV, EEEV, WEEV e VEEV) como clima para atuação e proliferação dos vetores, presença de vetores competentes e espécies de aves susceptíveis (VASCONCELOS *et al.*, 1991; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Historicamente, a relação do rebanho equídeo brasileiro com as encefalites virais é antiga, sendo os primeiros casos investigados no início do século XX. A morte de um grande número de equinos (aproximadamente 1.000 animais) acometidos pelo vírus RABV foi descrita em 1908 na região sul, representando uma das perdas mais significativas da história da enfermidade no Brasil. No mesmo ano, casos isolados foram reportados em equídeos no Estado de São Paulo demonstrando a susceptibilidade destes animais ao vírus (BRASIL, 1988). Atualmente, a doença é endêmica em todo o país apresentando intensidades diferentes de acometimento dos animais nos diversos estados (MAPA, 2009).

Após, em 1913, casos de encefalomielite associado com cegueira foi reportado em cavalos no estado do Paraná. No entanto a etiologia destes casos e de outros que vinham acontecendo em outras regiões do país foi elucidada em 1943 com a identificação do vírus EEEV. Este vírus foi isolado na década de 40 e, novamente, em 1985 (BRASIL, 1988; KOTAIT *et al.*, 1992; FERNANDÉZ *et al.*, 2000). Posteriormente, na década de 60, ocorreu o primeiro isolamento de WEEV do SNC de um equino com alterações neurológicas, no estado do Rio de Janeiro, após sucessivas passagens em camundongos (BRUNO-LOBO *et al.*, 1961). Desde então, casos destes alfavírus são reportados no rebanho brasileiro. No período de 2006 a 2012, 40 e 24 casos de equídeos positivos para EEEV e WEEV, respectivamente, foram notificados, porém sem indicação da ocorrência de surto (MAPA, 2020).

Embora VEEV não tenha sido identificada em equídeos no país, este alfavírus merece atenção pois, ao contrário do que ocorre no ciclo de WNV, EEEV e WEEV, os equídeos são hospedeiros capazes de desenvolver viremia suficiente para transmissão ao mosquito vetor durante seu repasto sanguíneo com consequente propagação viral (ciclo epizootico) (WEAVER, 2005).

Em 2009, a presença de WNV foi descrita pela primeira vez no Brasil através da detecção de anticorpos em cavalos na região do pantanal, em Mato Grosso do Sul (PAUVOLID-CORREA *et al.*, 2011). Posteriormente, em 2018, o RNA viral foi identificado e o vírus

isolado de sistema nervoso central (SNC) de equídeos com afecção neurológica no estado do Espírito Santo, região sudeste (SILVA *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2019).

Outra importante zoonose, a encefalite de Saint Louis responsável por graves casos em seres humanos, foi associada a encefalite em equinos pela primeira vez em 2013 no Brasil no Estado de Minas Gerais, com posterior identificação de sorologia positiva em equinos em outras regiões do país (ROSA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2019).

A identificação de EHV-1 associado a mieloencefalopatia no país ocorreu em 2005 (MORI *et al.*, 2007). A prevalência de animais positivos nos estudos publicados em diferentes regiões do país varia de 0,6% a 11,8% (PIMENTEL *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2015a; CUNHA *et al.*, 2016). O maior percentual, 52% de animais positivos para EHV-1 foi observado no trabalho com 75 amostras de SNC de equinos com síndrome neurológica em MG (COSTA *et al.*, 2009). Contudo, são poucos os estudos publicados e não abrangem todo o país e, portanto, essas estimativas podem não representar a real situação.

Entre os agentes virais mencionados, a raiva constitui a principal encefalite viral como causa de óbito dos equídeos sendo, portanto, prioridade no diagnóstico (MAPA, 2009; MAPA, 2020). A vigilância ativa desta enfermidade é conduzida através do Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras encefalopatias (PNCERH) instituído em 1966 e a notificação dos casos de Doença neurológica ao serviço veterinário oficial é obrigatório (IN n°5 – IN5/2002) (MAPA, 2002; MAPA, 2009).

Além de RABV, as encefalites equinas e WNV, também constituem agravos de notificação obrigatória (IN n°50/2013) (MAPA, 2013; MAPA, 2009). Desta forma, o SNC do equídeo com síndrome neurológica e negativo para raiva deve ser encaminhado para diagnóstico das demais encefalites virais que assumem importância zoonótica como EEEV, WEEV, VEEV, SLEV e WNV (MAPA, 2009; BRASIL, 2019a).

A incidência de doenças neurológicas nos equídeos tem apresentado crescimento, principalmente em decorrência do fluxo e trânsito destes animais para diferentes localidades (DE NOVAES OLIVEIRA *et al.*, 2014; CHAPMAN *et al.*, 2018). No entanto, a dificuldade para o diagnóstico conclusivo das encefalites nesses animais constitui um desafio recorrente na medicina veterinária preventiva. Existem uma série de fatores que dificultam o diagnóstico como a variedade de etiologias e seus sinais clínicos inespecíficos, coleta, armazenamento e envio incorreto de material, bem como baixa carga viral característica de alguns vírus nestes animais (CHAPMAN *et al.*, 2018).

No Brasil, a falta do envio de amostras dos equídeos para diagnóstico associado a ausência de dados principalmente dos aspectos sanitários como vacinação e principais doenças que acometem estes animais, contribuem para a escassez de dados epidemiológicos referentes a ocorrência das encefalites virais, incluindo as zoonóticas. Assim, sugere-se que exista uma subnotificação destas enfermidades.

Desta forma, o presente estudo através da avaliação do Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN) e também técnicas laboratoriais

(molecular e histopatológica) buscou analisar o perfil dos animais que vem a óbito com síndrome neurológica, principalmente de Minas Gerais, bem como o perfil das amostras que são encaminhadas para diagnóstico inicial de RABV.

5.2 Material e métodos

Este estudo possui autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) de número 102/2018 para sua execução.

5.2.1 Amostragem

O processo de amostragem se deu por amostra de conveniência, com amostras coletadas de janeiro de 2017 a janeiro de 2019 e encaminhadas para o Laboratório de Saúde Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (LSA-IMA) para diagnóstico de raiva. Após resultado negativo, através das técnicas de Imunofluorescência direta (IFD) e teste biológico em camundongos, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) da Escola de Veterinária da UFMG para diagnóstico das demais encefalites virais.

5.2.2 Levantamento de dados

O Levantamento de dados das amostras de SNC enviadas para o IMA foi efetuado através do Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN) que consta na página oficial do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (<http://ima.mg.gov.br>). Os veterinários do serviço veterinário oficial (SVO) (municipal, estadual ou federal) ou privado, bem como os proprietários foram responsáveis pelo preenchimento das fichas estando este grupo de pesquisa isento de intervenções quanto as informações prestadas.

Ao todo, foram avaliados 90 formulários enviados com as amostras utilizando critérios referentes ao animal e amostras coletadas (tabela 4). Além disso, avaliou-se o contato direto de pessoas com os animais suspeitos. Não foi considerado as informações de coordenadas geográficas das propriedades na análise das fichas.

Dos tecidos enviados, a avaliação foi efetuada quanto a presença de fragmentos de medula.

Tabela 4- Parâmetros avaliados nos formulários

Unidade	Parâmetro avaliado
Animal	Espécie
	Sexo
	Idade
	Vacinação
	Tipo de óbito (óbito/eutanásia)
	Data do óbito
	Localização/Origem
	Sinais clínicos
	Duração média dos sinais clínicos
Amostra enviada	Fragmento do SNC coletado
	Modo de conservação
	Tempo entre óbito e coleta do material
	Tempo entre coleta e envio do material
	Tipo de serviço veterinário (privado/oficial)

5.2.3 Análise dos dados coletados

Os dados obtidos das fichas foram analisados por estatística descritiva, através dos cálculos de suas médias e intervalo de confiança a 95%.

Adicionalmente, a partir destas informações foi possível fazer uma inferência estatística na análise dos tempos entre óbito e coleta dos tecidos (necropsia) em relação ao tipo de óbito do animal (morte natural ou eutanásia), utilizando o método não paramétrico teste de *Kruskal-Wallis* (KRUSKAL; WALLIS, 1952).

5.2.4. Extração do ácido nucleico viral (DNA e RNA)

Os fragmentos do SNC de 76 amostras encaminhadas congeladas para diagnóstico molecular foram inicialmente macerados e homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X; pH 7,0-7,4) suplementado com penicilina (200 IU/mL), estreptomicina (200 µg / mL) e anfotericina B (2,5 µg / mL), na proporção 1:20 (p/v) com auxílio de pistilo.

A suspensão foi agitada em agitador de tubos tipo vórtex e mantida a 4 °C *overnight*. Após, as amostras foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado usando um filtro de seringa de 0,22 µm.

Para extração de DNA, foram utilizadas alíquotas de 200 µL de sobrenadante filtrado, utilizando o método de extração por sílica descrito por Boom e colaboradores (1990).

O reagente Trizol (Invitrogen, EUA) foi utilizado para a extração do RNA das amostras. Alíquotas de 300 µL das amostras foram acrescidas de 600 µL de Trizol® a 4°C em um tubo de microcentrífuga de polietileno de 1,5 ml livre de DNA/RNase. Em seguida foram homogeneizadas em vortex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após,

foram acrescentados 300 µL de clorofórmio a 4 °C, as amostras homogêneas em vórtex por 15-30 segundos e incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. A camada aquosa formada após centrifugação foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Após foram acrescentados 900 µL de isopropanol a 4 °C e a amostra foi incubada a -20 °C *overnight*.

Posteriormente, uma nova centrifugação a 13.000 xg durante 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi então lavado com 1 mL de etanol 75% a 4 °C e centrifugado a 13.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco durante 10 minutos à temperatura ambiente. Como etapa final da extração, foram acrescentados 30 µL de água ultrapura tratada com DEPEC e armazenadas a 4 °C até processamento.

A concentração e pureza do RNA/DNA extraído de cada amostra foi estimada através do aparelho NanoVue® (GE, Healthcare) por densidade óptica.

O controle negativo utilizado para todas as reações de RT-PCR e PCR realizadas no estudo, foi o RNA/DNA extraído do SNC equino que previamente testou negativo para os vírus do gênero flavivírus, alfavírus, bem como EHV - 1 e vírus da raiva. Além disso, um controle negativo “master - mix” usando água livre de DNase/RNase no lugar do ácido nucleico extraído (RNA/DNA) também foi utilizado.

Os primers utilizados no estudo estão descritos na tabela 2 do capítulo 2, item 4.2.

5.2.5 Reação *nested* PCR – Herpes vírus equino tipo 1 (EHV-1)

O diagnóstico de herpesvírus equino 1 foi realizado por *nested* PCR direcionado para o gene ORF30, de acordo com Allen, 2006.

Na primeira reação de PCR foram utilizados 0,5 µM dos oligonucleotídeos OF8 e OR2, juntamente com 2,5 µL de Tampão 10 X (Phoneutria), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de DNTP (Phoneutria), 0,5 µL de taq DNA polimerase (Phoneutria) (5 U/ µL), 3 µL de DNA (100 ng) e 15,25 µL de água livre de DNase/RNase em um total de 25 µL de reação. As condições de ciclagem foram 94 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

Para a segunda reação foram utilizados os oligonucleotídeos OF7 e OR3 e a concentração dos reagentes utilizados foi igual a primeira reação, utilizando 2 µL de amplicon da primeira reação e temperatura de anelamento de 55 °C.

O controle positivo utilizado foi isolado em linhagem celular contínua Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) um cavalo positivo para o vírus (COSTA *et al.*, 2015b) e faz parte de um bando de amostras do LPVA.

5.2.6 Reação *nested* RT-PCR – *Alphavirus*

A investigação diagnóstica dos alfavirus foi realizada por reação de transcrição reversa seguida por PCR (RT-PCR) gênero específica utilizando os primers M2W e M3W direcionados ao gene da proteína não estrutural Nsp1 dos vírus do gênero (PFEFFER, *et al.*, 1997). Para a reação foi usado o kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) seguindo recomendações do fabricante. Foram utilizados 12,5 µL de mix buffer 2x (0,4 mM de cada dNTP e 3,2 mM de MgSO₄), 0,4 mM de MgSO₄ 5mM, 0,6 µM de cada iniciador (M2W/M3W) 10 pmol, 1 µL de enzima *SuperScript III RT/Platinum Taq Mix*, 5 µL de RNA (100 ng) e 1,5 µL de água livre de DNA/RNase para um total de 25 µL de reação.

As condições de ciclagem foram 45 °C por 30 minutos, 94 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos, 68 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão final de 68 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

O controle positivo de alfavirus foi uma amostra do vírus da encefalite equina do Leste (EEEV), cedido gentilmente pelo Prof. Maurício L. Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP).

As reações de PCR específicas foram realizadas utilizando cDNA da reação de RT-PCR. Para cada reação foram utilizados 0,4 µM dos oligonucleotídeos (10 pmol) de cada vírus, 2,5 µl de tampão de PCR 10 × (Tris -HCl 200 mM [pH 8,4], KCl 500 mM), 1,5 mM de MgCl₂ 50mM, 0,4 mM DNTP mix 10mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA polimerase; Invitrogen) (5 U/ µL), 2 µL de cDNA e 16,45 µL água livre de DNase/RNase para um total de 25 µL.

As temperaturas da ciclagem foram 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, (T_m C° de cada primer) por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, seguidos de 72 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um VeritiThermalCycler (AppliedBiosystems, EUA). Os controles positivos (reação de *nested* PCR) foram genes sintéticos (gBlocks gene Fragments – Integrated DNA Technologies) desenhados de acordo com a região nsP1 dos respectivos vírus, exceto para EEEV onde foi usado o mesmo controle da reação de RT-PCR gênero específica.

5.2.7 Reação *nested* RT-PCR – *Flavivirus*

A investigação diagnóstica dos flavivírus foi realizada por reação de transcrição reversa (RT - PCR) gênero específica utilizando os primers FG1 e FG2 direcionados ao gene da proteína não estrutural NS5 dos vírus do gênero (FULOP *et al.*, 1993). Para a reação foi

usado o kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) seguindo recomendações do fabricante. As concentrações dos reagentes foram as mesmas descritas para reação de RT-PCR para o gênero *Alphavirus*.

As condições de ciclagem foram 45 °C por 30 minutos, 94 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 45 segundos, 68 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão final de 68 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

O controle positivo da reação foi uma amostra de cultivo celular do vírus zika (ZIKV) cedido gentilmente pelo Dr. Alexandre Magalhães Vieira Machado, da FIOCRUZ-MG.

As reações de PCR específicas foram realizadas utilizando cDNA da reação de RT-PCR. Para cada reação foram utilizados 0,4 µM dos oligonucleotídeos (10 pmol) de cada vírus, 2,5 µL de tampão de PCR 10 × (Tris -HCl 200 mM [pH 8,4], KCl 500 mM), 1,5 mM de MgCl₂ 50mM, 0,4 mM DNTP mix 10mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA polimerase; Invitrogen) (5 U/ µL), 2 µL de cDNA e 16,45 µL água livre de DNase/RNase para um total de 25 µL.

As temperaturas da ciclagem foram 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, seguidos de 72 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti ThermalCycler (Applied Biosystems, EUA).

Para controle positivo de WNV, foi utilizado o DNA de plasmídeo contendo o gene NS5 da estirpe de WNV NY99 gentilmente cedido pelo Prof. Maurício L. Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP), e para reação do SLEV, foi utilizado gene sintético (gBlocks gene Fragments – Integrated DNA Technologies), desenhado de acordo com a sequência da proteína NS5 do vírus.

5.2.8 Análise dos produtos da RT-PCR e PCR

Os resultados das reações foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. No gel foram aplicados 10 µL dos amplicons adicionados a 2 µL de tampão de amostra 10X (Phoneutria) e a eletroforese ocorreu a 120V por 40 minutos, em tampão TBE 1X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando-se o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA (*ladder*), KASVI. Após a corrida, o resultado foi visualizado em luz UV.

5.2.9 Histopatologia

A avaliação por histopatologia foi realizada em fragmentos de tecidos (tabela 5) de 16 amostras (UFMG 1 a UFMG 16) sendo 13 encaminhadas em blocos de parafina e 3 amostras enviadas fixadas em formalina neutra e tamponada a 10%.

Tabela 5 - Informações das amostras enviadas para avaliação histopatológica

Identificação	Tecido enviado (fragmentos)	Modo de conservação
UFMG 1	Cerebelo, córtex	Parafina
UFMG 2	Cérebro	Parafina
UFMG 3	Tronco encefálico	Parafina
UFMG 4	Cérebro	Parafina
UFMG 5	Mesencéfalo, cérebro e cerebelo	Parafina
UFMG 6	Cérebro	Parafina
UFMG 7	Cérebro, nervo trigêmio, medula	Parafina
UFMG 8	Cérebro, cerebelo, pulmão	Parafina
UFMG 9	Cérebro	Parafina
UFMG 10	Cérebro	Parafina
UFMG 11	Cerebelo	Parafina
UFMG 12*	Cérebro, estômago e rim	Parafina
UFMG 13*	Cérebro, cerebelo, medula e fígado	Parafina
UFMG 14	Cerebelo	Formol
UFMG 15	Cérebro, cerebelo, medula	Formol
UFMG 16	Cérebro	Formol

*Fragmentos de SNC enviados também sob refrigeração

As amostras enviadas em formalina foram desidratadas em banhos sucessivos de álcool 70%, 80%, 90% e 2 banhos em álcool 100%, diafanizadas em 2 banhos de xilol e impregnados por banho em parafina líquida a 65°C por 1 hora. Posteriormente, foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos, com cerca de 5 micrômetros, foram submetidos a coloração pela técnica da hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio óptico (Leica DMLS, Alemanha), (Luna, 1968).

Os tecidos foram processados no Laboratório de Patologia, da Escola de Veterinária da UFMG e a análise final foi realizada com a colaboração do professor Felipe Pierezan.

5.3. Resultados

Seguindo os parâmetros avaliados no presente estudo, somente 39 (39/90 – 43%) formulários apresentaram informações completas. Do restante dos formulários (51/90 – 57%), o dado mais ausente foi sobre a vacinação dos animais seguido da duração dos sinais clínicos.

O campo de observações foi utilizado em 8 formulários apresentando dados adicionais do histórico dos animais, sendo descrito sinais neurológicos associados a trauma em 3 animais, dois animais com suspeita de intoxicação (ingestão de feno mofado e suspeita de intoxicação por monensina), presença de nódulos neoplásicos na região do cerebelo

em um animal, um acidente ofídico e um animal apresentando estado de caquexia e intensa desnutrição.

Dos formulários avaliados, em 68 (68/90 – 76%) foram relatados contato de pessoas com o animal que veio a óbito, 11 (11/90 – 12%) casos não houve contato com o animal, em 3 (3/90- 3%) formulários os proprietários não sabiam fornecer esta informação e em 8 (8/90 – 9%) formulários não foi marcada nenhuma informação (campo em branco).

5.3.1 Parâmetros avaliados dos animais

Do total de amostras avaliadas, 98% (88/90) vieram do Estado de Minas Gerais (MG), provenientes de 62 municípios (tabela 6; figura 16). Além disso, 2% (2/90) das amostras foram encaminhadas de dois municípios (Jericóacoara e Paracuru) do Estado do Ceará (CE), região nordeste do Brasil.

Tabela 6- Quantidade de amostras encaminhadas por mesorregião de Minas Gerais

Mesorregião de MG	Número de amostras
Campo das Vertentes	3
Central	13
Oeste	11
Vale do Mucuri	0
Jequitinhonha	2
Metropolitana de Belo Horizonte	19
Noroeste	3
Norte	1
Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba	13
Vale do Rio Doce	4
Sul/Sudoeste	8
Zona da Mata	11

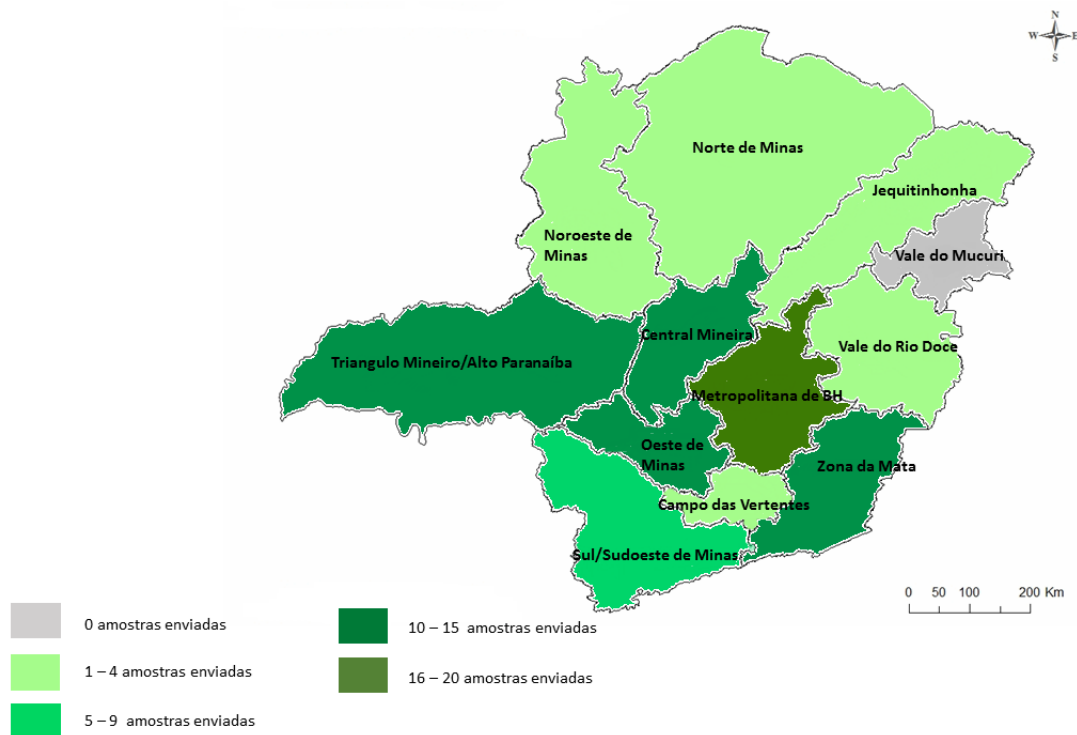


Figura 16. Mapa de Minas Gerais e a quantidade de amostras enviadas por Mesorregião.

Dos equídeos avaliados, na ficha de 10 animais (10/90 – 11%) não foi possível identificar a espécie animal (equino, asinino ou muar). Foram enviados material para diagnóstico de 78 cavalos e apenas 2 asininos. Em 17 fichas (17/90 - 19%) não foi possível identificar o gênero. Das fichas restantes, 56% eram fêmeas e 44% machos.

Os equídeos foram predominantemente de raça (51/86 – 59%), enquanto que 35 (35/86 – 41%) animais eram sem raça definida (SRD) e em 4 (4/90 – 4,5%) animais não foi especificado. Foram registradas entre os cavalos 6 raças diferentes, sendo a maior parte da raça Manga-larga Marchador (33/50 – 66%) (tabela 7). Entre os asininos, apenas um animal foi de raça, sendo descrito a raça Pêga.

Observamos que os animais com maior número de atendimento por serviço veterinário privado foram de raça, totalizando 37 animais do total de 54 atendimentos (37/54 – 68,5%).

Tabela 7- Raça dos equinos com amostras coletadas e enviadas para diagnóstico

Raça	Número de animais
Árabe	1
Campolina	1
Mangalarga Marchador	33
Mangalarga Paulista	5
Mangolino	1
Quarto de Milha	9

A idade dos animais foi variável e 6 fichas (6/90 - 7%) não apresentaram esta informação. Um maior número de equídeos tinha entre 5 e 9 anos de idade (25/84 – 30%) (figura 16).

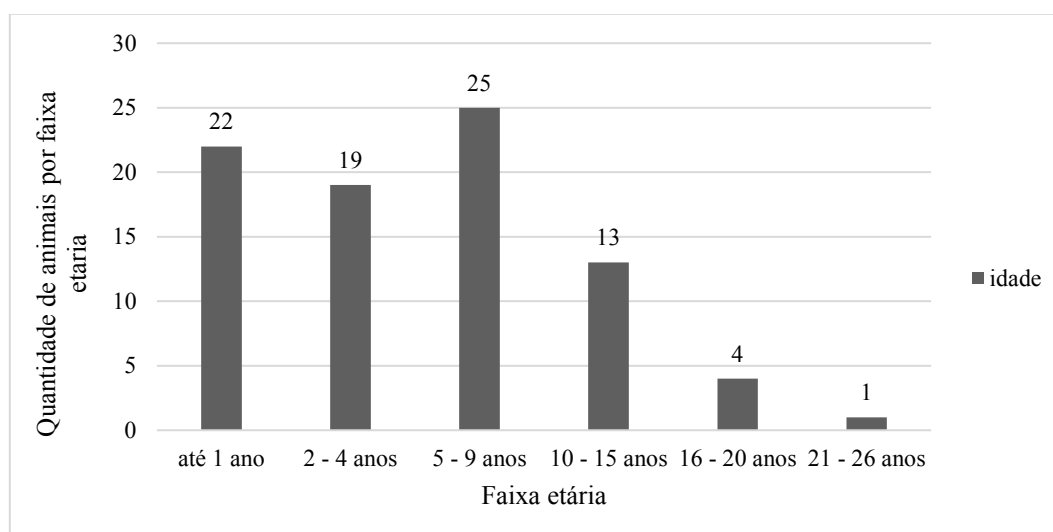


Figura 17. Número de equídeos avaliados por faixa etária.

A informação da vacinação dos animais não foi divulgada em 47 fichas (47/90) representando 52% de animais com histórico de vacinação desconhecido. Um total de 4 animais foram declarados como não vacinados. Dos animais com idade informada, 5 (5/84 – 6%) não tinham a idade indicada (acima de 3 meses) para início do calendário vacinal (MAPA, 2009; LONG, 2014; KHUSRO *et al.*, 2020)

A vacinação contra raiva, associada ou não com outras vacinas, ocorreu em 86% (37/43) dos equídeos com histórico vacinal conhecido (tabela 8). Contudo, apenas 14 fichas (14/37- 38%) destes animais apresentou a data da realização da vacinação. Adicionalmente, a maioria dos animais vacinados eram de raça (26/47 – 55%).

Tabela 8- Vacinas registradas e número de equídeos avaliados vacinados

Vacina	Número (animais vacinados)
Raiva	27
Raiva e encefalite equina	7
Raiva, encefalite equina, influenza e tétano	1
Raiva, encefalite equina e herpes vírus	1
Raiva e influenza	1
Encefalite equina	1
Encefalite equina, tétano e influenza	1

A maioria dos animais vieram a óbito por morte natural (69/89 – 77,5%) enquanto que 20 (20/89 – 22,5%) foram submetidos a eutanásia e um animal não foi informado (1/90 – 1%). Em relação aos meses do ano, não foi observado uma distribuição temporal padrão no período avaliado (janeiro de 2017 a janeiro de 2019) sendo um maior número de amostras foram com óbitos concentrados no mês de janeiro (14/87- 16%) (figura 18). Em três formulários não foi possível identificar a data do óbito do animal.

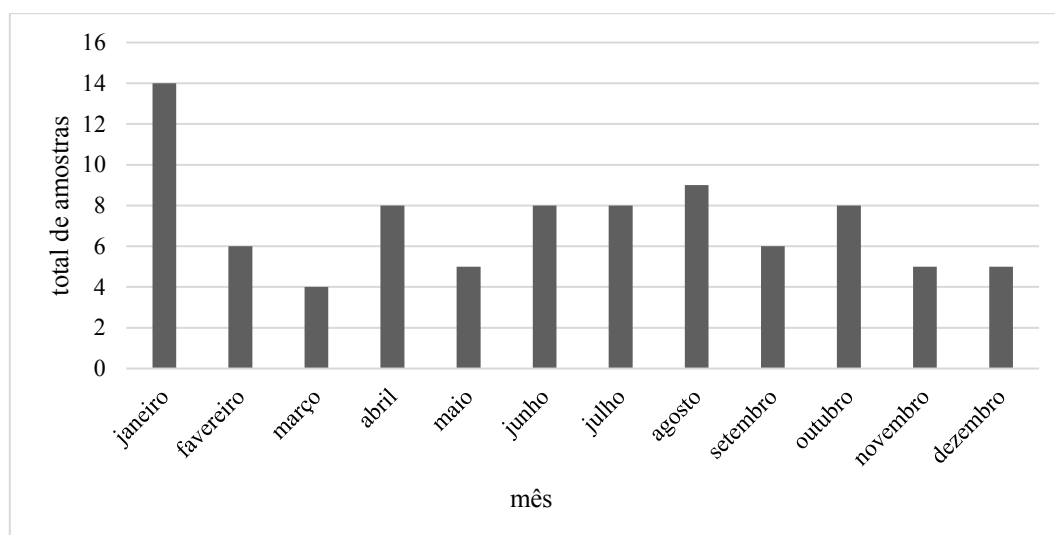


Figura 18. Distribuição temporal do óbito dos equídeos avaliados em relação aos meses do ano.

Em relação aos sinais clínicos dos animais, em 4 fichas (4/90- 4,5%) não foi especificado as alterações neurológicas. De acordo com os grupos de alterações clínicas presentes no FORM SN, 28% dos equídeos (24/86) apresentou alteração neurológica ou de sensibilidade enquanto que 4,7% dos animais (4/86) foram encontrados mortos ou apresentaram morte súbita. Dentre as fichas avaliadas, 35,5% (32/90) veterinários marcaram (circulando ou sublinhando) ou destacaram no campo de observações os sinais clínicos específicos apresentados pelo animal.

A duração dos sinais clínicos foi informada em apenas 44% das fichas (40/90) e a média da duração dos sinais clínicos nos animais que constavam informações foi de 8 dias. Entre

entes animais, 16 equídeos apresentaram infecção de caráter mais crônico (≥ 6 dias) e em 24 animais foi reportado quadro agudo (≤ 5 dias).

5.3.2 Parâmetros avaliados nas amostras enviadas

Os veterinários do serviço de defesa oficial foram responsáveis por 36,7% (33/90) de todas as coletas avaliadas enquanto que o serviço privado foi responsável pelo maior número de amostras enviadas com 60% (54/90) do total. Em 3% (3/90) das fichas não havia registro do serviço veterinário responsável pelo atendimento. Adicionalmente, 13% (12/90) das amostras foram provenientes de atendimento veterinário e/ou necropsia em universidade.

Das amostras encaminhadas para o laboratório oficial em um formulário não constava o meio de conservação da amostra e 44% das amostras (39/89) foram conservadas congeladas (-20°C) (tabela 9).

Tabela 9. Modo de conservação das amostras encaminhadas para diagnóstico inicial de raiva.

Modo de conservação	quantidade de amostras
Congelado	39
Refrigerado	23
Formolizado	3
Glicerina	1
Congelado/Formolizado	10
Refrigerado/Formolizado	10
Congelado/Refrigerado/Formolizado	3

Dos tecidos do SNC encaminhados para diagnóstico inicial de RABV, 44 amostras (49%) continham encéfalo acompanhado de fragmento da medula (figura 19). Duas amostras foram encaminhadas com tecidos extra neurais: fragmentos de fígado em uma e na outra amostra com fragmentos de rim, fígado e conteúdo estomacal.

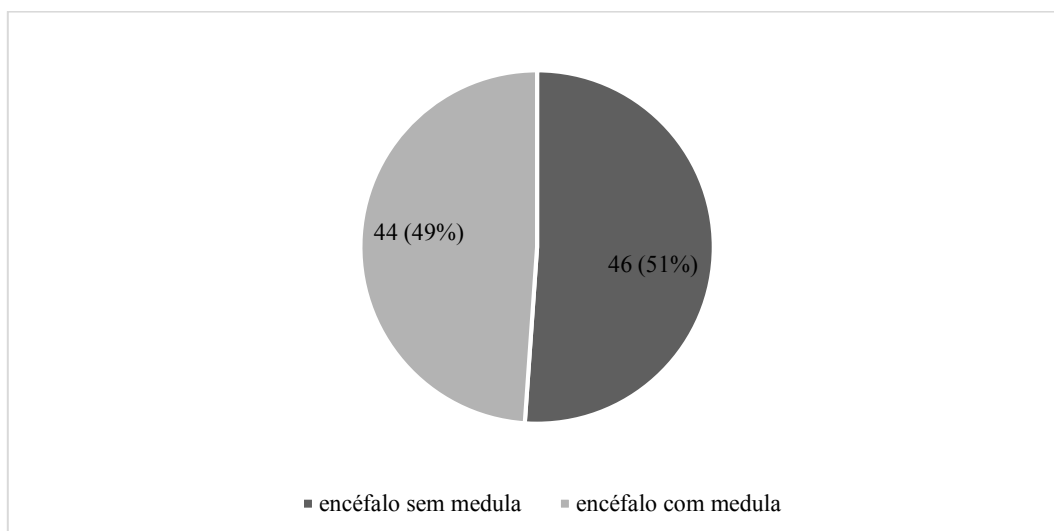


Figura 19. Gráfico representativo dos fragmentos de tecidos do SNC dos equídeos avaliados enviados com e sem medula

Em alguns formulários foi registrado envio de outros tecidos nervosos tais como cerebelo (5 amostras), trigêmeo (3 amostras), tronco encefálico (3 amostras), hipófise (2 amostras) e rede admirável (1 amostra).

Durante avaliação das amostras negativas para raiva e encaminhadas para diagnóstico das demais encefalites virais ao LPVA, não foi possível distinguir os fragmentos em grande parte das amostras e a classificação quanto a presença ou ausência da medula não foi realizada.

Em relação ao tempo entre o óbito do animal e a coleta de material (necropsia), em 3% (3/90) dos formulários não foi registrado essa informação. No restante, o tempo médio foi de aproximadamente 568 minutos (9 horas) com tempo mínimo de 0 minutos e tempo máximo de 5.280 minutos (mais de 80 horas). Além disso, o registro de coleta imediata e/ou tempo máximo de 1 hora foi observado em 14 formulários.

No entanto, este tempo foi menor no caso dos animais submetidos a eutanásia (16 formulários) com média de 434 minutos (aproximadamente 8 horas). Para os animais que vieram a óbito naturalmente (69 formulários), a média foi de 603 minutos (aproximadamente 10 horas). Adicionalmente, a avaliação entre o tipo de óbito do animal (eutanásia ou óbito natural) e o tempo entre a morte e a necropsia apresentou diferença estatística ($p = 0,03$) quando submetidos ao teste de *Kruskal Wills* indicando que as médias analisadas são significativamente diferentes.

Outro parâmetro avaliado, o tempo entre coleta e conservação das amostras, foi registrado em 87 formulários. A média do tempo foi aproximadamente de 116 minutos (cerca de 2 horas), sendo registrado um tempo de 0 minutos em 26 fichas (26/87-30%). No entanto, tempos acima de duas horas foram observados em 9 formulários e a descrição de mais de 10 horas entre coleta e conservação foi descrito em 5 formulários.

As amostras com maior tempo entre coleta e conservação foram em sua maioria, 67 % (6/9) congeladas para posterior envio para diagnóstico. Porém, 2 amostras foram somente refrigeradas e não houve envio de tecido no formol.

5.3.3 Resultados diagnóstico molecular

Todas as 76 amostras testadas foram negativas para os vírus WNV, SLEV, EEEV, WEEV e VEEV. Quatro amostras (5%) de equinos identificadas como UFMG 21, UFMG 30, UFMG 45 e UFMG 60 foram positivas para EHV-1.

5.3.4 Resultados da avaliação histopatológica

Autólise acentuada nos tecidos do SNC foi registrada em 5 (31%) materiais dificultando a avaliação dos tecidos e impossibilitou resultado em 2 amostras (12,5%). A análise da medula foi realizada em apenas um material (UFMG 13).

Das amostras avaliadas, 25% (4/16) apresentaram meningoencefalite e encefalite não supurativas sugestivas de infecção viral (figura 20). No entanto, 62,5% (10/16) das amostras não apresentaram alteração significativa nos tecidos do SNC.

Adicionalmente, na avaliação de 2 amostras foram encontradas alterações sugerindo patologias diferentes da encefalite viral. A avaliação de fragmentos de pulmão da amostra UFMG 8 resultou em alterações de broncopneumonia neutrofílica e linfoplasmocitária difusa acentuada com hiperplasia de BALT moderada, sugerindo um quadro de pneumonia. Enquanto que o fragmento de estômago avaliado na amostra UFMG 12 revelou áreas multifocais de infiltrado neutrofílico moderado associado a células com perda de núcleos e citoplasma hipereosinofílico sugerindo uma gastrite neutrofílica e necrotizante multifocal discreta.

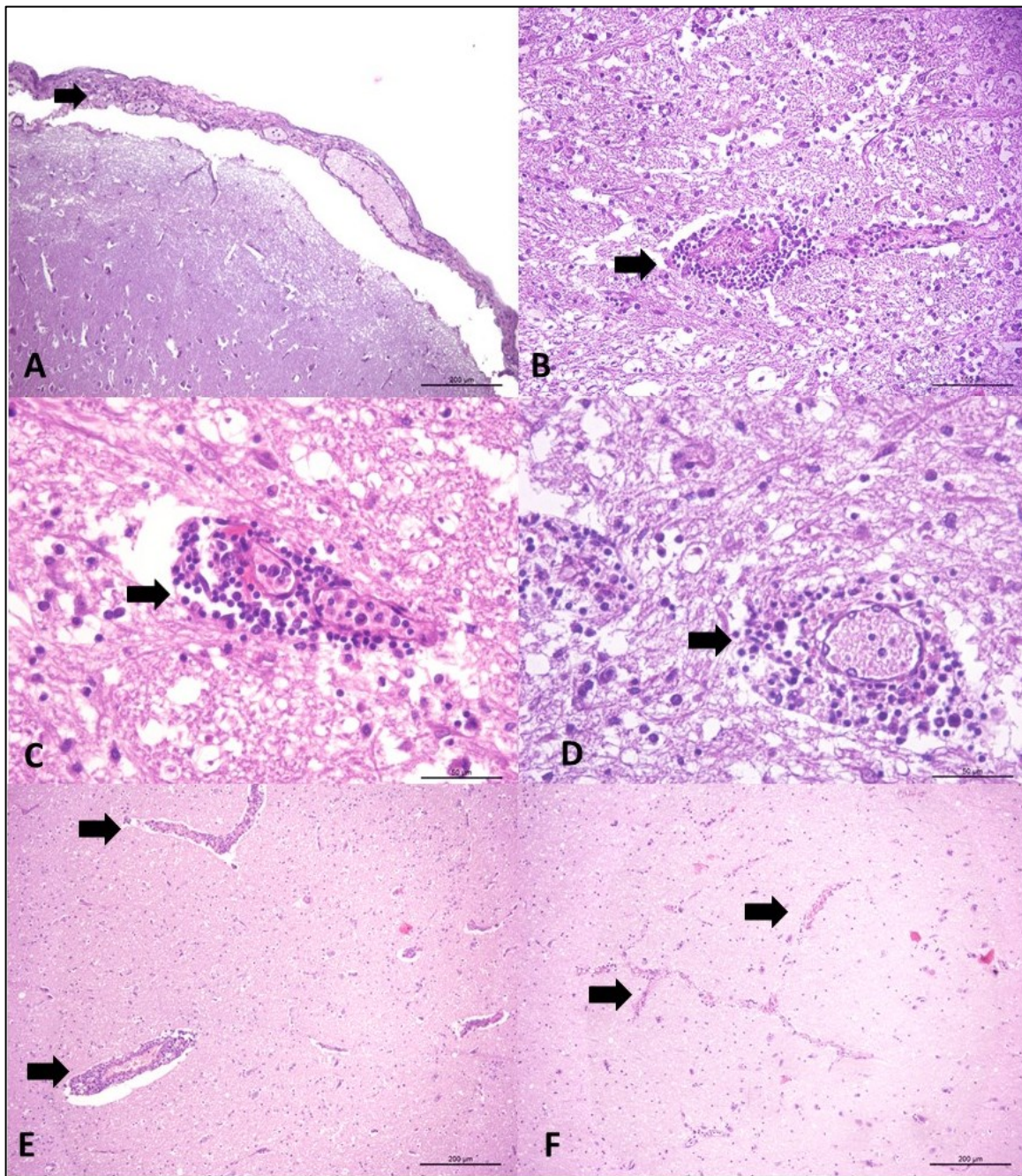


Figura 20. Resultados da avaliação histopatológica. A. Infiltrado linfoplasmocitário (marginação leucocitária – seta preta) moderado nas meninges sobre o córtex telencefálico (amostra UFMG 13). B. Infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário perivascular acentuado (seta preta) em um vaso sanguíneo da substância cinzenta da medula espinhal (amostra UFMG 13) C; D. Infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário acentuado (seta preta) ao redor de um vaso sanguíneo da substância cinzenta da medula espinhal (amostra UFMG 13). E. Infiltrado inflamatório linfocitário discreto (seta preta) ao redor de vasos sanguíneos da substancia cinzenta do córtex telencefálico (amostra UFMG 6). F. Infiltrado inflamatório linfocitário discreto (seta preta) ao redor de vasos sanguíneos da substancia cinzenta do córtex telencefálico (amostra UFMG 16).

5.4. Discussão

O rebanho equídeo brasileiro é um dos maiores do mundo, entretanto existe um déficit de importantes informações, principalmente aquelas relacionadas ao diagnóstico, imunização e principais enfermidades. Neste estudo, foram avaliados parâmetros relacionados aos animais e as amostras de SNC de equídeos que vieram a óbito através de formulários encaminhados com as amostras. Além disso, testes laboratoriais (molecular e histopatológico) foram realizados para diagnóstico das encefalites virais (após resultado negativo para raiva no laboratório oficial).

Neste estudo, o alto índice de formulários com informações incompletas (57%) reflete a ausência de dados, bem como a difícil obtenção dos mesmos. Os proprietários e veterinários constituem componentes participativos essenciais de todo o processo, trabalhando no fornecimento de informações. Além disso, os veterinários são responsáveis pela coleta, identificação, acondicionamento e conservação adequados das amostras, bem como pela biossegurança com uso adequado de equipamentos de proteção bem como no descarte de resíduos (OIE, 2018b).

O atendimento veterinário, em sua maioria privado, foi destinado principalmente para os equinos de raça sugerindo a associação deste serviço com estes animais que, na maioria das vezes, possuem um valor comercial de mercado superior (MAPA, 2016).

Contudo, em alguns formulários, aspectos como notificação ao serviço veterinário após o óbito do animal e falta de descrição dos sinais clínicos, sugerem a ausência de um veterinário durante o curso clínico da doença. Este dado corrobora com a baixa taxa de serviços veterinários destinado ao rebanho equídeo nacional (2%/ano), indicando que há uma pequena destinação destes profissionais para a equideocultura comparativamente com outras atividades como bovinocultura, avicultura e suinocultura (SINDAN, 2020).

Além disso, estes fatores mencionados podem estar associados com a caracterização do rebanho equídeo nacional, onde estima-se que 72% destes animais sejam usados em atividades secundárias em comparação com equinos destinados para esporte e lazer (MAPA, 2016).

No presente estudo, amostras de apenas dois asininos foram encaminhados para diagnóstico das encefalites virais. Um destes animais foi proveniente do estado do Ceará, que possui um dos maiores rebanhos de asininos no país (IBGE, 2020). O outro burro com desordem neurológica era da raça Pêga e veio de um município de MG, que também possui expressivo rebanho destes animais (IBGE, 2020).

Estes animais assim como os muars podem ser acometidos por diversas infecções virais incluindo vírus encefálicos como WNV (CAMARA *et al.*, 2020). Porém, as informações destas enfermidades nestes animais no Brasil são ainda mais precárias comparativamente aos equinos.

A coleta de informações como raça, idade e gênero do animal pode auxiliar na limitação de doenças do diagnóstico diferencial. A idade por exemplo, pode indicar a associação de

uma anomalia congênita e não uma causa infecciosa para a alteração neurológica do animal (SEINO, 2007).

Embora a maior parte dos animais apresentavam entre 5 a 9 anos de idade, 26% destes tinham idade inferior a 1 ano. O acometimento neurológico de equídeos com esta faixa de idade pode ser atribuído a encefalites virais como vírus da raiva e as arboviroses aqui estudadas (PIMENTEL *et al.*, 2009; RECH; BARROS, 2015). Contudo, outras condições não infecciosas são comumente vistas nos animais nos primeiros 12 meses de vida como a Mielopatia estenótica vertebral cervical e Mieloencefalopatia degenerativa equina (EDM), que são refletidas em graves síndromes neurológicas (MACKAY, 2005).

Adicionalmente, a descrição da raça dos animais também é relevante pois algumas condições neuropatológicas podem estar relacionadas com determinadas raças nos cavalos. A abiotrofia cerebelar, por exemplo, embora não seja uma ocorrência exclusiva destes animais, é comumente descrita em cavalos da raça árabe e pode resultar em alterações como incoordenação, andar oscilante, postura de base aberta dos membros torácicos e pélvicos que podem aparecer logo após o nascimento ou ao longo do primeiro ano de vida (MACKAY, 2005).

Dos animais avaliados, 43% eram vacinados. Embora os demais não tiveram informação sobre a vacinação e/ou não eram vacinados, aspectos importantes foram observados. A associação da vacinação com equinos de raça, sugere uma preocupação maior com estes animais que possuem um valor comercial e que podem ser destinados a atividades como eventos e esportes (MAPA, 2016).

A ausência da data de imunização na maioria dos formulários é outro importante aspecto, pois é necessário a revacinação anual contra o vírus da raiva, bem como para outros patógenos de acordo com calendário vacinal, para garantir a manutenção da imunidade conferida (MAPA, 2009; LONG, 2014; KHUSRO *et al.*, 2020).

Adicionalmente, a prioridade da vacinação contra raiva sugere uma preocupação destes proprietários na atuação contra esta enfermidade, comparativamente as outras doenças com vacinação disponível no país, como Influenza, EHV-1 e 4, Encefamioelite equina (EEEV, WEEV) e tétano.

A vacinação contra raiva em equídeos foi instituída no Brasil em 2002 sendo realizada em animais acima de 3 meses de idade com vírus inativado (MAPA, 2002; MAPA, 2009). No entanto, as informações sobre o controle vacinal contra raiva nos rebanhos equídeos são incipientes não sendo conhecido o número estimado de animais vacinados. Além disso, a estimativa de equídeos vacinados para outros patógenos também é desconhecida.

A vacinação da população e/ou animais susceptíveis constitui uma importante medida de prevenção contra muitos agentes patogênicos e a negligência na sua implementação pode gerar graves consequências para a saúde humana bem como animal. Desta forma, a falta de vacinação observada neste trabalho, assim como a ausência de estimativa de animais vacinados no rebanho brasileiro, reflete uma preocupação.

Clinicamente a maioria dos animais apresentaram algum tipo de alteração neurológica. A indicação de sinais clínicos específicos, através da marcação ou uso do campo de observação, em alguns formulários proporcionou uma melhor compreensão do quadro clínico do animal, pois o formulário contém uma ampla gama de sinais clínicos abordados em conjunto não sendo possível a distinção destes.

No entanto, a ausência de informações clínicas ou a não marcação de sinais clínicos específicos pode ter ocorrido por falta de acompanhamento do animal. A ausência de avaliação clínica neurológica completa já foi descrita em outros trabalhos seja devido o animal ter sido encontrado morto e assim impossibilitou a avaliação clínica ou devido a não realização dos exames para investigar a viabilidade de todas as funções do sistema nervoso do animal (KLEIBOEKER *et al.*, 2004; SALAZAR *et al.*, 2004).

A execução de um exame clínico completo e bem realizado constitui uma importante etapa do diagnóstico das doenças neurológicas nos equídeos pois as diferentes patologias não apresentam sinais clínicos característicos (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; CHAPMAN *et al.*, 2018). Além disso, doenças não relacionadas ao SNC podem levar a sinais clínicos semelhante as encefalites virais. Isso pode ocorrer em um quadro de cólica, por exemplo, onde a intensidade da dor pode resultar em tremores e andar cambaleante do animal (FURR; REED, 2008).

A utilização do campo de observações nos formulários acrescentando dados clínicos, alterações visualizadas na necropsia e informações do histórico do animal auxilia no diagnóstico conclusivo. Neste trabalho, através destas informações adicionais foi possível sugerir um diagnóstico inicial de intoxicação, trauma e neoplasias que podem ser responsáveis pelos sinais clínicos descritos. Contudo, todos estes animais devem ser submetidos aos exames de PCR para todas as encefalites virais.

A avaliação do contato de pessoas com o animal que veio a óbito é relevante pois os profissionais que trabalham no manejo dos equídeos, principalmente os veterinários que realizam a necropsia e coleta de material dos mesmos, são considerados grupo de risco sendo expostos a agentes zoonóticos que acometem estes animais (ROBERTSON, 2008; KUMAR *et al.*, 2018; SACK *et al.*, 2020).

Carrieri e colaboradores (2006) identificaram RABV nas glândulas salivares de equinos positivos indicando um risco em potencial para o homem em contato com estes animais. Desta forma, embora a transmissão da raiva para o ser humano seja mais relacionada com animais domésticos como os cães, a transmissão pelo contato com saliva dos equídeos doentes pode acontecer (CONSALES; BOLZAN, 2007).

Além disso, contaminação durante a necropsia pelo vírus WNV, por exemplo, já foi observada em um estudante de veterinária que realizou a coleta do SNC de um equino com síndrome neurológica e positivo para o vírus (VENTER *et al.*, 2010).

Os parâmetros avaliados nas amostras foram direcionados para os fatores que influenciam a coleta, conservação e envio das amostras, sendo pontos críticos na execução dos exames laboratoriais (OIE, 2018b).

Inicialmente, o tempo avaliado entre o óbito do animal e a coleta de material foi variável. O menor tempo entre óbito e necropsia observado nos animais submetidos a eutanásia pode ser justificado pelo fato de o profissional veterinário que faz este procedimento é geralmente o mesmo que realiza a necropsia e assim a coleta do material.

A avaliação *post mortem* fornece informações que são um complemento para os dados epidemiológicos e clínicos do animal sendo de extrema importância no diagnóstico (ROBERTSON, 2008; OIE, 2018b). Contudo este exame, bem como as análises em laboratório será comprometido pelo processo de autólise da carcaça que destrói os tecidos e os patógenos que podem ser relevantes para o diagnóstico (OIE, 2018b; RECH; BARROS, 2015).

O SNC encontra-se relativamente protegido contra ação de bactérias putrefativas em comparação com outros órgãos. Desta forma, sugere-se que 24 a 36 horas após o óbito do animal este sistema ainda está viável para avaliação (RECH; BARROS, 2015). Portanto, em 4 animais deste estudo onde necropsia foi efetuada em tempo maior que 36 horas, a formação do diagnóstico conclusivo na avaliação macroscópica a campo bem como laboratorial pode ter sido comprometida devido a esse tempo.

No entanto, este tempo de 24 a 36 horas possui caráter didático e assim pode ser variável. O processo de putrefação se instala após o fim do *rigor mortis* que pode ter duração de 24 a 48 horas, porém este processo é influenciado por fatores que podem acelerar os fenômenos cadavéricos destrutivos, como a espécie animal, a temperatura ambiente e, principalmente, o tipo de morte. Nos casos de doenças infecciosas de curso clínico agudo, o processo de rigidez cadavérica tende a ocorrer mais rapidamente favorecendo assim o início do posterior processo de autólise. Além disso, temperaturas acima de 25°C, diminuição da umidade da carcaça e a falta de higiene do ambiente que propicia contaminações também favorecem o processo de putrefação (BANDARA; SEQUEIRA, 1999 a, b).

Adicionalmente, animais que sofreram um processo de elevação de temperatura (hipertermia) podem ter um processo de liquefação do encéfalo que apresentará uma consistência amolecida dentro de uma a duas horas após o óbito (ROBERTSON, 2015).

Desta forma, as alterações nos tecidos podem variar entre os cadáveres e todos os fatores intrínsecos e extrínsecos mencionados devem ser avaliados. Porém, apenas com o conteúdo dos formulários não é possível responder a todos estes aspectos. Através de metodologia em laboratório, o processo de autólise dos tecidos do SNC de dois animais (UFMG 3 e UFMG 7) foi constatado durante avaliação histológica e impossibilitou a análise destes tecidos, demonstrando a importância de evitar este processo.

Na coleta de material para avaliação molecular de agentes virais, o extenso tempo entre óbito e coleta bem como o tempo entre coleta e conservação pode comprometer o diagnóstico laboratorial. Alguns vírus, como RABV e WNV por exemplo, não resistem a altas temperaturas que resultam na degradação do material genético viral e na diminuição da quantidade de partículas virais viáveis que poderiam ser detectados e

isolados nestes tecidos (KLEIBOEKER *et al.*, 2004; FLORES; CARGNELUTTI, 2017). Segundo Kotait e colaboradores (1992) o isolamento de EEEV do SNC de um equino foi possível pois todo o processo de coleta após o óbito do animal, conservação e envio ao laboratório foi efetuado em até 8 horas.

Os dados referentes ao tempo entre coleta e conservação do material indicam um grave problema que pode ter influenciado diretamente nos resultados dos testes moleculares. Para viabilidade dos testes laboratoriais é necessário que as amostras sejam imediatamente acomodadas em recipientes adequados e mantidas sob baixas temperaturas até o processamento (OIE, 2018b). Nas coletas a campo por exemplo, o armazenamento inicial pode ser feito em caixas térmicas com gelo reciclável possibilitando a conservação imediata dos tecidos (MAPA, 2009).

Desta forma, a análise molecular de 5 amostras (UFMG 44, UFMG 55, UFMG 73, UFMG 85 e UFMG 87) pode ter sido comprometida pelo extenso tempo entre óbito e coleta somado ao curso clínico agudo registrado nos formulários, bem como de 7 amostras (UFMG 27, UFMG 33, UFMG 56, UFMG 66, UFMG 67, UFMG 77 e UFMG 83) que ficaram expostas a temperatura ambiente antes da conservação possivelmente influenciando o resultado negativo nos testes realizados.

No entanto, além dos fatores abordados deve-se considerar que muitas propriedades estão localizadas em zonas rurais de difícil acesso e que este fator também contribui para a atraso no atendimento veterinário e, conseqüentemente, na coleta do material.

Os fragmentos enviados foram avaliados quanto a presença de medula revelando mais de 50% de ausência deste seguimento do SNC nas amostras encaminhadas para diagnóstico de raiva e demais encefalites virais. Os arbovírus EEEV, WEEV, VEEV, WNV bem como o RABV e EHV-1 estão entre os agentes patogênicos que acometem a medula dos equídeos. Assim, a medula é essencial aumentando a probabilidade de detecção destes patógenos nestes animais (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; GREENLEE, 2014; RECH; BARROS, 2015; OLADUNNI *et al.*, 2019).

Para o exame laboratorial da raiva nos equídeos é necessário o envio de encéfalo (hipocampo, tronco cerebral, tálamo, córtex e cerebelo) e medula (MAPA, 2009). Carrieri e colaboradores (2006), identificaram as maiores concentrações do vírus da raiva (RABV) no tronco encefálico e medula, comparado aos demais fragmentos do SNC dos equídeos avaliados, assim como foi observado uma maior tendência de mortalidade dos camundongos inoculados com fragmento de medula indicando assim a importância deste seguimento do SNC no diagnóstico de RABV nestes animais.

Adicionalmente, em estudo avaliando através RT-PCR em tempo real tecidos do SNC de cavalos positivos para WNV, identificou uma concentração do RNA viral maior na medula dos animais acometidos (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Desta forma, a ausência de fragmentos da medula no diagnóstico de WNV pode gerar um resultado falso negativo (CANTILE *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

O modo de conservação das amostras a serem enviadas para diagnóstico está relacionada com os exames laboratoriais que serão realizados. Este parâmetro foi avaliado nas amostras que inicialmente eram destinadas ao laboratório oficial para diagnóstico da raiva.

As técnicas laboratoriais para diagnóstico *post mortem* de RABV são o isolamento viral através de inoculação em camundongos (prova biológica) e identificação do antígeno viral por imunofluorescência (IFA). Para estes procedimentos as amostras devem ser encaminhadas preferencialmente congeladas ou refrigeradas (WHO, 2018). Contudo, na impossibilidade de conservação das amostras a baixas temperaturas pode-se enviar os fragmentos em glicerina a 50% (MAPA, 2009).

Adicionalmente, nas amostras encaminhadas em formol a 10%, pode-se fazer exame histopatológico para identificação dos corpúsculos de Negri característicos da doença e testes de detecção de antígeno através de Imunohistoquímica (IHQ). Contudo, o envio de amostras em formol não é considerado um método de conservação adequado para diagnóstico de rotina desta enfermidade (WHO, 2018). Além disso, os corpúsculos de Negri são mais comumente visualizados na espécie bovina em comparação ao exame na espécie equídea (PEIXOTO *et al.*, 2000).

No envio ao laboratório, a recomendação é que as amostras sejam encaminhadas sob refrigeração no caso de o tempo de remessa até o laboratório ocorrer em até 24 horas e congeladas se este período exceder este tempo (BRASIL, 2009). Corroborando com esta indicação, a maioria das amostras deste estudo foram enviadas congeladas para testes de RABV.

Considerando que as amostras negativas devem ser direcionadas para diagnóstico das encefalites virais como WNV, EEEV, WEEV e VEEV, estas etapas também serão importantes para o exame dessas encefalites. O envio de tecidos exclusivamente no formol como foi observado em 3 amostras, pode comprometer a aplicação dos testes moleculares pois o processo de parafinização pode interferir na quantidade de ácido nucleico viral presente nas amostras (SCORSATO; TELLES, 2011). No estudo comparativo no diagnóstico de WNV, a quantidade de cópias do RNA viral foi maior nos tecidos frescos quando comparado com os tecidos fixados em parafina (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Adicionalmente, a conservação em formol impossibilita o isolamento viral e, portanto, não deve ser a única forma de acondicionamento dos tecidos (FLORES; CARGNELUTTI, 2017).

Os testes procedidos em laboratórios auxiliaram no diagnóstico das amostras encaminhadas para este estudo. Os resultados da avaliação histopatológica indicaram 4 animais com lesões sugestivas de infecção viral em fragmentos de medula e córtex. A presença de infiltrados de células de defesa, principalmente mononucleares, ocorrem em resposta a infecção viral no SNC destes animais e podem ser encontrados na infecção causada por vírus como EEEV, WEEV e WNV (CANTILE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2011; RECH; BARROS, 2015). Contudo, a ausência de alteração não descarta a ocorrência de encefalite viral pois algumas enfermidades neurológicas podem não

apresentar alteração na histologia ou esta ser muito discreta e dificilmente identificada (CANTILE *et al.*, 2000; 2001; SILVA *et al.*, 2011; RECH; BARROS, 2015).

Desta forma, os resultados da histopatologia devem ser associados a outros exames como biologia molecular e imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico final (CANTILE *et al.*, 2001). Sem os testes complementares não foi possível o diagnóstico conclusivo das amostras mencionadas.

No presente estudo, 5% das amostras de SNC refrigeradas foram positivas para EHV-1 na PCR. Este resultado corrobora com estudos publicados até o momento no Brasil (PIMENTEL *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2015a; CUNHA *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a amostra UFMG 13 avaliada por técnicas moleculares e histológicas foi fracamente positiva na RT-PCR para WNV, porém não foi possível resultado confirmatório mesmo após inoculação do material em cultivo celular (C636 e Vero). No entanto, alguns fatores da patogenia deste vírus nos equídeos podem dificultar seu diagnóstico. Existe uma variação na detecção deste arbovírus entre os indivíduos com a ocorrência de baixas quantidades do vírus nos diferentes seguimentos do SNC (BUNNING *et al.*, 2002; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Nenhuma das amostras foram positivas para as encefalites virais EEEV, WEEV e VEEV. Essas encefalites, exceto a encefalite Venezuela, já foram registradas no país, porém sem ocorrência de surto (DE NOVAES OLIVEIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

Adicionalmente, através de históricos fornecidos em alguns formulários foi possível a sugestão da causa do óbito de alguns animais relacionado com compressão cerebelar devido a neoplasias, dois casos de intoxicação e três casos sugestivos de lesão neurológica ocasionada por traumas.

Os resultados revelam um grande número de animais sem diagnóstico conclusivo, porém resultados semelhantes podem ser vistos em outros estudos desenvolvidos em diferentes regiões do Brasil (PIMENTEL *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; DE NOVAES OLIVEIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015)

No entanto, diversas patologias infecciosas e não infecciosas podem estar relacionadas com a síndrome neurológica nos equídeos. Na investigação das causas do óbito e/ou eutanásia de 159 equídeos do semiárido na região da Paraíba, um maior percentual (30,8%) dos animais apresentou afecção no SNC comparativamente a afecção em outros sistemas como locomotor (18,2%), digestório (16,9%) e cardiovascular (3,1%), por exemplo. A afecção do SNC dos 49 animais avaliados teve diferentes causas infecciosas como EHV-1, RABV, EEEV e tétano, e não infecciosas como intoxicação e traumas, porém 10,2% dos animais ficaram sem etiologia neurológica determinada (PIMENTEL *et al.*, 2009).

Além disso, em outro estudo com 218 amostras de equídeos, a investigação das encefalites de origem viral, mieloencefalite por protozoários (*Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*), encefalite de origem bacteriana e também causas não infecciosas

como leucoencefalomalacia, resultou em 55% das amostras sem diagnóstico conclusivo sugerindo dificuldades existentes na determinação da etiologia neurológica nestes animais (CUNHA *et al.*, 2016).

Após o primeiro isolamento nos anos 40 da encefalite equina do Leste no Brasil, este vírus voltou a ser isolado em 1985 devido a dificuldades desde a coleta e o envio para diagnóstico laboratorial (KOTAIT *et al.*, 1992; DE NOVAES OLIVEIRA, 2014).

No entanto, a maioria dos trabalhos publicados no Brasil, mesmo apresentando amostras sem diagnóstico laboratorial, não determinam com exatidão as possíveis causas destes resultados. Desta forma, sugere-se que fatores negativos no processo de coleta, conservação e envio da amostra influenciem diretamente no diagnóstico das encefalites virais nos equídeos contribuindo para a ausência de resultados.

5.5 Conclusões

Os resultados da avaliação da coleta, conservação e envio das amostras indicam a necessidade de melhoria na coleta a campo de equídeos com óbito por causas neurológicas.

Este estudo fornece um modelo de avaliação a partir do formulário oficial que poderá ser aplicado em um maior número de amostras expandindo para outros Estados contribuindo para obtenção de importantes dados do rebanho equídeo nacional.

5.6 Referência

- ALLEN, G. P. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 8, p. 1401–1405, 2006.
- BANDARRA, E. P.; SEQUEIRA, J. L. Tanatologia: fenômenos cadavéricos abióticos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p. 59–63, 1999a.
- BANDARRA, E. P.; SEQUEIRA, J. L. Tanatologia: fenômenos cadavéricos transformativos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 2, n. 3, p. 72–76, 1999b.
- BOOM (FALTA)
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, volume único, 3a. ed., p. 1-740, 2019a.
- BRASIL. Secretária de Defesa Agropecuária. Secretária de Defesa Sanitária Animal. As doenças dos animais no Brasil. Histórico das primeiras observações. Brasília: SNAP/SDSA, Boletim de Defesa Sanitária Animal, número especial, p. 1-101, 1988.
- BRUNO-LOBO, G. et al. III . Isolamento de um vírus sorològicamente de um caso de encefalomielite eqüina , ocorrido no Rio de Janeiro. **Anais de Microbiologia**, v. 9, n. 1951, p. 183–195, 1961.
- CAMARA, R. et al. animals Viral Diseases that A ff ect Donkeys and Mules. **Animals**, v. 10, n. 2203, p. 1–26, 2020.
- CANTILE, C. et al. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine

- encephalomyelitis in Italy. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 31–35, 2000.
- CANTILE, C. et al. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 4, p. 414–421, 2001.
- CARNEIRO, G. F.; CAVALCANTE LUCENA, J. E.; DE OLIVEIRA BARROS, L. The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 106–110, 2018.
- CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **BMC Vet Res**, v. 35, n.4, p. 467-483, 2004.
- CHAPMAN, G. E. et al. The challenges posed by equine arboviruses. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 4, p. 436–445, 2018.
- CONSALES C.A, BOLZAN. V. . August 18, 2006. **Review Literature And Arts Of The Americas: Rabies Review: Immunopathology, Clinical Aspects and Treatment**, v. 13, p. 5–38, 2006.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 228p, 1994.
- COSTA, E. A. et al. Diagnóstico etiológico de enfermidades do sistema nervoso central de equinos no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 391–399, 2015a.
- COSTA, E. A. et al. Epidemiological and clinical aspects of equine Herpesvirus encephalitis infection in horses that died with neurological signs from Minas Gerais state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 262–272, 2009.
- COSTA, E. A. et al. Molecular characterization of neuropathogenic equine herpesvirus 1 Brazilian isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 67, n. 4, p. 1183–1187, 2015b.
- COSTA, G. B. et al. Silent circulation of the saint louis encephalitis virus among humans and equids, Southeast Brazil. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–10, 2019.
- CUNHA, E. M. S. et al. Causes of Encephalitis and Encephalopathy in Brazilian Equids. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 8–13, 2016.
- CUNHA, E. M. S. et al. Causes of Encephalitis and Encephalopathy in Brazilian Equids. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 8–13, 2016.
- DE CASTRO-JORGE, L. A. et al. West nile virus infections are here! are we prepared to face another flavivirus epidemic? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–9, 2019.
- DE NOVAES OLIVEIRA, R. et al. Eastern equine encephalitis cases among horses in Brazil between 2005 and 2009. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2615–2620, 2014.
- FERNANDEZ, Z. et al. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.
- FLORES, E. F.; CARGNELUTTI, J.F. Diagnóstico laboratorial de infecções viricas. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia Veterinária – Virologia Geral e Doenças Viricas**. Santa Maria: Editora UFMS, 2017.p. 317-359.
- FULOP, L.; BARRETT, A. D. T.; PHILLPOTTS, R. *et al.* Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene sequences. **J Virol Methods**, v.44, p.179–188, 1993.
- FURR, M.; REED, S. Neurologic Examination. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.). **Equine Neurology**, Iowa: Blackwell Publishing p. 65-77, 2008.
- GREENLEE, J. E. **The equine encephalitides**. In: **Handbook of Clinical Neurology**, 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 123
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos. Disponível em:

<https://sidra.ibge.gov.br/> Acesso em: 25 de outubro de 2020

KHUSRO, A. et al. Equine Herpesvirus-1 Infection in Horses: Recent Updates on its Pathogenicity, Vaccination, and Preventive Management Strategies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 87, p. 102923, 2020.

KLEIBOEKER S. B. et al. Diagnosis of West Nile virus infection in horses. **J Vet Diagn Invest.** v.16, n.1, p. 2-10, 2004

KOTAIT, I. et al. Isolamento e identificação do Vírus da Encefalomielite eqüina, tipo Leste, em eqüinos do Estado de São Paulo, Brazil. **Arq Inst Biol**, v. 59, n. 1/2, p. 37–41, 1992.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952.

KUMAR, B. et al. Zoonotic Viral Diseases of Equines and Their Impact on Human and Animal Health. **The Open Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 80–98, 2018.

KUMAR, R.; PATIL, R. D. Cryptic etiopathological conditions of equine nervous system with special emphasis on viral diseases. **Veterinary World**, v. 10, n. 12, p. 1427–1438, 2017.

LONG, M.T. West Nile Virus and Equine Encephalites. **Vet Clin Equine**, v.30, p. 523–542, 2014.

LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology (3rd ed.) New York, NY: Blakiston Division McGraw-Hill, 1968.

MACKAY, R. J. Neurologic disorders of neonatal foals. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 21, n. 2, p. 387–406, 2005.

MAPA. Instrução normativa nº2, de 1º março de 2002. Aprova normas Técnicas para o controle da raiva dos herbívoros. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002.

MAPA. Instrução normativa nº50, de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília-DF: MAPA/SDA, 2009, p.1-124. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informação e Epidemiologia - Saúde Animal, MAPA, 2020. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm> Acesso em: 13 de março de 2021

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Brasília: MAPA, 56 p, 2016.

MARTINS, L. C. et al. First isolation of west nile virus in brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 1, p. 1–7, 2019.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Collection, submission, and storage of diagnostic specimens. **Terrestrial Animal Health Code**, p. 11-22, 2018b.

OLADUNNI, F. S.; HOROHOV, D. W.; CHAMBERS, T. M. EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–25, 2019.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.

PEIXOTO, Z. M. P. et al. Rabies laboratory diagnosis: Peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 72–75, 2000.

PFEFFER, M. et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 709–718, 1997.

PIMENTEL, L. A. et al. Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. **Pesquisa**

- Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 589–597, 2009.
- RECH, R.; BARROS, C. Neurologic Diseases in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 281–306, 2015.
- ROBERTSON, J. L. The basics of equine neuropathology. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.) *Equine Neurology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.157-166.
- ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.
- SACK, A. et al. Zoonotic Diseases from Horses: A Systematic Review. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 7, p. 484–495, 2020.
- SALAZAR, P. et al. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 2, p. 267–274, 2004.
- SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q. Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 541–548, 2011.
- SEINO, Central Nervous System Infections. In: SELLON, C. ; LONG, M. (Ed) . **Equine Infectious Diseases**. First ed. St.Louis, Missouri: Saunders Elsevier, p. 47-58, 2007.
- SILVA, A. S. G. et al. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 1, p. 445–453, 2019.
- SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921–923, 2013.
- SILVA, M. L. C. R. et al. Isolation and Characterization of Madariaga Virus from a Horse in Paraíba State, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 3, p. 990–993, 2015.
- SILVA, M. L. C. R. et al. Outbreaks of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 570–575, 2011.
- SINDAN. Sindicato Nacional de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil/> Acesso em 12 de março de 2021
- VASCONCELOS, P. F. da C. et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Rev. Inst. Medicina tropical**, v.33, n.6, p.465-476, 1991.
- VENTER, M. et al. Transmission of West Nile virus during horse autopsy.” *Emerging infectious diseases*, v. 16, n.3, p. 573-575, 2010
- WEAVER, S. C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. **Archives of virology. Supplementum**, n. 19, p. 33–44, 2005.
- WHO. World Health Organization Expert Consultation on Rabies, third report. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO Technical Report Series, No. 1012).

6. Capítulo 4 - Detecção do vírus de *West Nile* (WNV) em hemácias de equino no Brasil.

Resumo

West Nile virus (WNV) é responsável por infecções neurológicas em espécies de aves susceptíveis, em equídeos e em seres humanos, sendo considerado um problema global de saúde pública. Embora os equídeos sejam hospedeiros terminais no ciclo de transmissão viral, estes animais atuam como sentinelas auxiliando na identificação de WNV em uma região. A primeira identificação do RNA viral de WNV no Brasil foi em sistema nervoso central (SNC) de equídeos associado com quadro de encefalite aguda. A ocorrência concomitante de outras encefalites virais no rebanho brasileiro e a identificação de novos casos de WNV no país intensificaram a pesquisa por este arbovírus. No entanto, as dificuldades quanto a coleta a campo e conservação de tecidos do sistema nervoso central de equídeos com síndromes neurológicas, fomentaram a necessidade de aplicação de técnicas moleculares em outros materiais como sangue total. Desta forma, a aplicação da técnica de *nested* RT-PCR resultou na identificação do vírus associado as hemácias de um cavalo com quadro neurológico no Estado de São Paulo, região sudeste do Brasil. Esse diagnóstico sugere alternativas para vigilância de WNV no país resultando na detecção precoce do vírus com consequente adoção de medidas preventivas, bem como uma ampliação do conhecimento da situação epidemiológica deste arbovírus no rebanho equídeo brasileiro.

Palavras chaves: cavalo, encefalite viral, *nested* RT-PCR, WNV, eritrócitos, sangue total

6.1. Introdução

O vírus *West Nile* (WNV) é um vírus RNA de caráter zoonótico que pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Este arbovírus mantém seu ciclo de transmissão através de vetores invertebrados, mosquitos principalmente do gênero *Culex*, e aves silvestres (ciclo enzootico). Adicionalmente, equídeos e homem também podem ser infectados, porém, são considerados hospedeiros terminais apresentando baixa viremia sem consequente transmissão viral para o vetor (BUNNING *et al.*, 2002; COLPITTS *et al.*, 2012). Além da picada do mosquito, a transmissão para o homem pode ocorrer através de transplante de órgãos, amamentação, transplacentária e por transfusão de sangue (PEALER *et al.*, 2003; IWAMOTO *et al.*, 2003; HAYES; O'LEARY, 2004; RIOS *et al.*, 2007).

WNV é responsável por infecções neurológicas em aves susceptíveis, equídeos e em seres humanos. Embora apenas 20% da população humana apresente sinais clínicos mais brandos e 1% um quadro encefálico grave, este arbovírus é considerado um problema global de saúde pública por ser responsável por epidemias com elevada mortalidade (KRAMER *et al.*, 2008).

Os equídeos são considerados animais sentinelas auxiliando na detecção precoce do vírus em uma região pois a ocorrência clínica nesses animais geralmente antecede os casos na

população humana (PETROVIĆ *et al.*, 2018; YOUNG *et al.*, 2019). Além disso, em regiões sem vacinação, os equídeos auxiliam na vigilância soropidemiológica para detecção precoce da circulação viral (CDC, 2013; ECDC, 2013).

No entanto, apenas um percentual pequeno (8-10%) destes animais apresenta sintomatologia clínica neurológica que varia desde ataxia leve a moderada e casos encefálicos mais graves como fraqueza generalizada ou dos membros, paresia ou paralisia dos membros e fasciculações ou tremores musculares (CANTILE *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; MURGUE *et al.*, 2001; VENTER *et al.*, 2009).

No Brasil, o vírus foi identificado e isolado em equídeos da região sudeste do país em 2018, sendo associado a linhagem 1 de WNV altamente patogênica para estes animais (SILVA *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2019; SICONELLI *et al.*, 2021). Posteriormente, novas evidências da circulação do vírus em regiões antes negativas, fomentaram o aumento da vigilância com intensificação do diagnóstico para detecção precoce do WNV objetivando evitar sua disseminação (BEAUX *et al.*, 2019; BRASIL, 2019).

O diagnóstico de WNV nos equídeos é baseado na associação da suspeita clínica, exame após o óbito (necropsia) e testes laboratoriais confirmatórios (OSTLUND *et al.*, 2000; 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; OIE, 2018). Desta forma, as técnicas laboratoriais podem ser utilizadas para diagnóstico antes e/ou após o óbito do animal e são necessárias para confirmação e conclusão do diagnóstico (OIE, 2018).

A detecção do RNA viral através de técnicas moleculares (RT-PCR, tempo real) pode ser efetuada no sangue, soro, líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou tecidos do sistema nervoso central (SNC) dos animais (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004). Contudo, a identificação de WNV nos tecidos nervosos, principalmente medula, apresenta melhores resultados devido a probabilidade de cargas virais maiores serem encontradas nestes tecidos comparativamente a avaliação do sangue do animal por exemplo (BUNNING *et al.*, 2002; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Contudo, embora a infecção nos equídeos seja caracterizada por baixos títulos virêmicos, transitória (1-6 dias) e assim de difícil detecção, a identificação no sangue destes animais é possível de ser efetuada (KLEIBOEKER *et al.*, 2004; OZKUL *et al.*, 2013).

Adicionalmente, após a confirmação de transmissão de WNV por transfusão de sangue, os estudos nos doadores de sangue cresceram substancialmente na população humana (BUSCH *et al.*, 2008; LAI *et al.*, 2012; LANTERI *et al.*, 2014; LUSTIG *et al.*, 2016; BETSEM *et al.*, 2017). Dentre estes, uma pesquisa desenvolvida com sangue de doadores identificou a associação de WNV com as hemácias através de qRT-PCR, indicando uma maior possibilidade de detecção do vírus nestas células sanguíneas, comparativamente à detecção no plasma (RIOS *et al.*, 2007).

As condições de coleta e conservação das amostras são determinantes para execução das técnicas laboratoriais (OIE, 2018b). Condições que favorecem o processo de autólise dos tecidos, como temperaturas de armazenamento inadequadas, ou mesmo tempo prolongado entre o óbito do animal e a coleta de material, resultam na diminuição da

sensibilidade dos testes, com redução na capacidade de detecção do vírus (KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

No Brasil, a grande extensão territorial e a localização de propriedades de difícil acesso são fatores que contribuem para a piora das condições dos tecidos enviados para diagnóstico. Desta forma, há uma busca constante por novas possibilidades de diagnóstico para auxiliar na vigilância de WNV nestes animais.

Assim, buscando o diagnóstico precoce de WNV em equídeos, o presente estudo, reporta a primeira detecção deste vírus em hemácias de um equino no país através de técnicas moleculares.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Descrição do caso clínico

Um cavalo de 20 anos de idade, raça Trotador, residente da cidade de Suzano no Estado de São Paulo e sem histórico de vacinação, foi encaminhado para o Hospital da Faculdade Cruzeiro do Sul (Unicsul), em 18 de junho de 2019 apresentando dificuldade de locomoção com arrastamento de pinça do membro posterior e se apoiando quando engatado na carroça. O animal, que era empregado para trabalho de tração, segundo proprietário, apresentava as alterações mencionadas há aproximadamente uma semana.

Na avaliação clínica, foi observado uma diminuição da propriocepção dos membros posteriores no exame de abdução, porém, nenhuma alteração foi constatada na avaliação dos nervos cranianos. O cavalo foi diagnosticado com lombalgia e inflamação da articulação társica direita sendo efetuado tratamento com uso de anti-inflamatório e recomendação de retorno ao hospital para posterior infiltração na articulação.

No mês seguinte, o proprietário entrou em contato novamente relatando que o quadro de incoordenação do animal havia progredido e o mesmo não conseguia se manter mais em estação. O cavalo foi então internado no hospital veterinário no dia 15 de julho de 2019 iniciando tratamento para Mieloencefalite Protozoária Equina (EPM) como suspeita inicial, três dias após internação.

Entretanto, ocorreu evolução do quadro neurológico do paciente que apresentou convulsões, ataxia e decúbito, sendo efetuada eutanásia no dia 28 de julho, treze dias após internação.

Para diagnóstico, sangue em EDTA e soro foram coletados do animal no quarto dia após internação (19 de julho de 2019), congelados (-20°C) e encaminhados para o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para análise. O material foi recebido sob refrigeração (4 °C) no dia 8 de agosto de 2019.

Além disso, fragmentos do SNC do animal foram coletados e encaminhados para diagnóstico em laboratório oficial. Desta forma, não houve participação deste grupo de pesquisa em todo o processo de coleta, envio e análise destes tecidos.

A propriedade onde o animal residia é localizada em uma zona peri-urbana com presença de pontos de mata nas proximidades. Além do animal deste estudo, o local tinha mais dois equinos que não apresentaram sinais clínicos no período avaliado.

6.2.2. Processamento do material e extração do DNA/RNA

O sangue refrigerado (4 °C) foi submetido a centrifugação inicial de 420 xg por 10 minutos a 4°C para separação do plasma, leucócitos e células vermelhas (hemácias). Após separação dos componentes, as hemácias foram lavadas por centrifugação 420 xg por 10 minutos três vezes com PBS 1X na proporção 1:2. As amostras de soro não foram processadas.

Em seguida, o RNA total das amostras de hemácias, plasma e leucócitos, foi extraído utilizando mini kit de extração DNA/RNA PureLink (Invitrogen®) de acordo com recomendação do fabricante. O DNA da amostra de soro foi extraído utilizando mesmo kit.

A concentração e pureza do RNA/DNA extraído de cada amostra foi estimada através do aparelho NanoVue® (GE, Healthcare) por densidade óptica.

6.2.3 - Reação de *nested* PCR para EHV-1

O diagnóstico de herpesvírus equino 1 foi realizado por *nested* PCR direcionado para o gene ORF30, de acordo com Allen, 2006. Na primeira reação de PCR foram utilizados 0,5 µM dos oligonucleotídeos OF8 e OR2, juntamente com 2,5 µL de Tampão 10 X (Phoneutria), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de DNTP (Phoneutria), 0,5 µL de taq DNA polimerase (Phoneutria) (5U/ µL), 3 µL de DNA (100 ng) e 15,25 µL de água livre de DNase/RNase em um total de 25 µL de reação. As condições de ciclagem foram 94 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

Para a segunda reação foram utilizados os oligonucleotídeos OF7 (+) GGGAGCAAAGGTTCTAGACC e OR3 (-) AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG (256 pb) e a concentração dos reagentes utilizados foi igual a primeira reação, porém com 2 µL de amplicon da primeira reação e temperatura de anelamento de 55 °C.

O controle positivo utilizado foi isolado em linhagem celular contínua de rim de bovino (*Madin-Darby Bovine Kidney* - MDBK) a partir de um cavalo positivo para o vírus (COSTA *et al.*, 2015) e faz parte de um bando de amostras do LPVA.

6.2.4 – Reação *nested* RT-PCR para WNV

A investigação diagnóstica dos flavivírus foi realizada por reação de transcrição reversa (RT - PCR) gênero específica (958pb) utilizando os primers FG1 (+) TCAAGGAAGTCCACACATGAGATGTACT e FG2 (-) GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA direcionados ao gene da proteína não estrutural NS5 dos vírus do gênero (FULOP *et al.*, 1993).

Para a reação foi usado o kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) seguindo recomendações do fabricante. Foram utilizados 12,5 µL de mix buffer 2x, contendo 0,4 mM de cada dNTP e 3,2 mM de MgSO₄, 0,4 mM MgSO₄, 0,6 µM de cada iniciador (FG1/FG2), 1 µL de enzima *SuperScript III RT/Platinum Taq Mix*, 5 µL de RNA (100 ng) e 1,5 µL de água livre de DNA/RNase, para um total de 25 µL de reação.

As condições de ciclagem foram 45 °C por 30 minutos, 94 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 45 segundos, 68 °C por 45 segundos e uma etapa de extensão final de 68 °C por 7 minutos. A ciclagem térmica foi realizada em um Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA).

Os parâmetros para a segunda reação e os iniciadores WNVF2 (+) AACCKCCAGAAGGAGTSAAR e WNVR2 (-) AGCYTCRAACTCCAGRAAGC (370pb) foram utilizados de acordo com Silva et al (2019). Para controle positivo da reação *nested* PCR, foi utilizado o RNA de uma amostra de SNC de equino positivo para WNV proveniente do banco de amostras do LPVA (SILVA *et al.*, 2019).

Para todas as reações de PCR e RT-PCR foi utilizado como controle negativo o RNA extraído do SNC de equino que previamente testou negativo para os vírus do gênero flavivírus, alfavírus, bem como EHV - 1 e vírus da raiva. Além disso, um controle negativo “master - mix” usando água livre de DNA / RNase no lugar do ácido nucleico extraído (RNA/DNA) também foi utilizado.

Os resultados das reações foram visualizados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio. No gel foram aplicados 10 µL do amplicon adicionado a 2 µL de tampão de amostra 10X (Phoneutria) e a eletroforese ocorreu a 120V por 40 minutos, em tampão TBE 1X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando-se o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA (*ladder*), KASVI. Após a corrida, o resultado foi visualizado em luz UV.

6.2.5. Sequenciamento e análise das sequências

As bandas dos amplicons positivos (370pb) foram cortadas do gel de agarose 1% e posteriormente purificadas com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). As reações de sequenciamento foram realizadas em triplicata em ambas as direções usando os mesmos

iniciadores da *nested* RT-PCR, com o Kit de seqüenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA), e analisador de DNA ABI3730 (Applied Biosystems, EUA).

Os dados da seqüência de nucleotídeos foram analisados e montados para formação de *contig* com o auxílio programa on-line *Electropherogram Quality Analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/phph.pl>). Após, a seqüência gerada (325 pb) foi alinhada com demais seqüências de nucleotídeos de WNV depositados no GenBank através do programa on-line Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

6.3. Resultados e discussão

Após análise molecular, as amostras de hemácias e leucócitos foram positivas para WNV na *nested* RT-PCR (figura 21). Porém, o seqüenciamento foi possível apenas na amostra de hemácias confirmando a identidade do vírus WNV. Além disso, a seqüência avaliada (325 pb) apresentou grau de identidade de 99% com a seqüência brasileira West Nile virus strain BeAn854747 (GenBank MH643887), proveniente de amostra isolada em equino que veio a óbito com síndrome neurológica aguda em 2018, no Estado do Espírito Santo (Martins *et al.*, 2019). A amostra de plasma foi negativa para WNV.

Devido as características de EHV-1 como agente de doença neurológica em equinos, as amostras também foram testadas para este vírus sendo o resultado negativo.

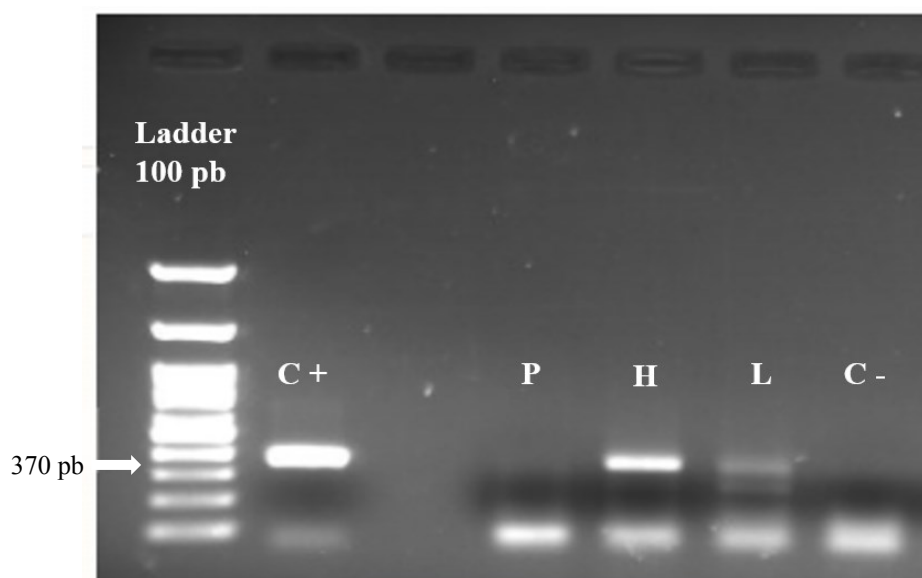


Figura 21. Gel de agarose 1% demonstrando resultado da 2ª reação da *nested*-RT-PCR específica para WNV. Ladder 100 pb, Kasvi. C+ controle positivo; C- controle negativo; P plasma; H hemácias; L leucócitos

Desta forma, descreve-se a detecção de WNV no sangue de um equino com quadro de doença neurológica, sendo a primeira descrição da identificação do RNA viral deste vírus associado às células vermelhas em cavalo no país.

Neste estudo, as hemácias apresentaram um resultado melhor sendo fortemente positivas resultando no sequenciamento da amostra. A detecção viral nas hemácias destes animais não havia sido observada até o momento.

Após transmissão do vírus via transfusão sanguínea em 2002 alertando para cuidados adicionais nos bancos de doadores em todo mundo, diversas pesquisas para diagnóstico de WNV no sangue foram efetuadas (RIOS *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2012; LANTERI *et al.*, 2014).

A ligação de WNV com células vermelhas do sangue foi descrita inicialmente por Rio e colaboradores (2007) através de estudo comparativo da detecção do vírus no plasma e hemácias de doadores de sangue utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real. Além disso, observou-se também que a detecção do RNA viral nos eritrócitos era superior ao plasma após a soroconversão, sendo observadas diferenças nas cargas virais do sangue total e do plasma de acordo com a fase da infecção. Desta forma, sugere-se que a presença de anticorpos neutralizantes contra WNV parece favorecer a associação do vírus aos eritrócitos (RIOS *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2012).

Complementarmente, em estudos posteriores, a detecção no sangue total foi possível por até 200 dias associada aos eritrócitos de alguns dos doadores avaliados (LAI *et al.*, 2012).

A coleta de sangue do equino avaliado ocorreu cerca de 30 dias após início dos sinais clínicos considerados mais brandos e 4 dias após a piora do quadro clínico que evoluiu para convulsões e decúbito. Considerando os estudos publicados usando como modelo o ser humano, sugere-se que a detecção viral ocorreu após a soroconversão favorecendo a detecção nas hemácias em comparação com o plasma que foi negativo. No entanto, não foi realizado testes sorológicos neste animal para identificação dos anticorpos em resposta a infecção por WNV.

A identificação do vírus nas hemácias deste animal em um período além do considerado para viremia de WNV nos equinos, sugere novas perspectivas no diagnóstico *ante mortem* e a necessidade de entender mais sobre a patogênese deste vírus nestes animais.

Adicionalmente, estudos com RT-nPCR identificaram o vírus no sangue total (leucócitos e hemácias) de animais clinicamente doentes e também saudáveis. Contudo, a identificação do vírus não resultou no desenvolvimento posterior de desordem neurológica (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Desta forma, a interpretação da detecção do vírus no sangue destes animais como diagnóstico conclusivo deve ser avaliada com cuidado.

A infecção por WNV nos equídeos é em sua maioria assintomática e, quando evoluem para quadro neurológico, os sinais clínicos observados não são exclusivos deste patógeno sendo encontrado em diversas condições infecciosas e não infecciosas que causam afecção no SNC destes animais (FURR; REED, 2008). No Brasil concomitante a presença de WNV, outros importantes vírus encefálicos como raiva (RABV), as encefalites equinas do leste (EEEV), oeste (WEEV) e venezuelana (VEEV), vírus da Encefalite de

Saint Louis (SLEV) e EHV-1 devem ser incluídos no diagnóstico diferencial (SILVA *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2015).

Neste sentido, a associação com testes laboratoriais nos tecidos do SNC dos animais que vem a óbito é relevante no diagnóstico desta e de outras enfermidades neurológicas. Os vírus zoonóticos como RABV, WNV e as encefalites equinas (EEEV, WEEV e VEEV) são de notificação compulsória sendo obrigatório o envio do SNC para teste destes agentes (IN 50/2013) (MAPA, 2013). Conseqüentemente, a suspeita ou confirmação destas enfermidades devem ser notificadas ao serviço veterinário oficial e, mesmo a detecção procedida apenas no sangue, exige a notificação imediata como foi efetuado no caso do animal deste estudo (BRASIL, 2019; MAPA, 2013).

A avaliação dos tecidos do SNC do animal deste estudo resultou em negativo para WNV. Fatores como coleta, armazenamento inadequado, ausência de medula podem interferir nos testes resultando em um animal falso negativo (KLEIBOEKER *et al.*, 2004). Além disso, mesmo no SNC dos equinos, WNV pode estar em baixas cargas sendo dificilmente detectado (JOHNSON *et al.*, 2001). Porém, as condições de conservação, envio e os fragmentos de tecidos do animal deste estudo e encaminhados para diagnóstico não são de conhecimento deste grupo de pesquisa.

A identificação no sangue total, principalmente nas hemácias, demonstrou a circulação de WNV em uma região até então negativa para o vírus indicando sua expansão no país. A vigilância deste arbovírus nos equídeos é usualmente efetuada com pesquisa de anticorpos contra o vírus (sorovigilância) e/ou identificação do RNA viral no SNC dos animais que vem a óbito (ECDC, 2013; OIE, 2018). No entanto, os testes sorológicos apresentam como principal desvantagem a forte reação cruzada que ocorre entre os integrantes de *Flavivirus*, resultando em um animal falso positivo em regiões com circulação concomitante com outros vírus do gênero (LUSTIG *et al.*, 2018). Adicionalmente, no Brasil, problemas na coleta, conservação e envio de tecidos para diagnóstico realizados a campo são comumente observados comprometendo os resultados em laboratório, resultando em muitos animais sem diagnóstico conclusivo (COSTA *et al.*, 2015).

Desta forma, este diagnóstico nos eritrócitos sugere uma nova ferramenta para auxílio na vigilância epidemiológica de WNV através do *nested* RT-PCR. Conseqüentemente, a detecção precoce do vírus vai permitir medidas protetivas evitando sua disseminação.

6.4. Conclusões

A detecção de WNV no Brasil tem crescido desde 2018 alertando para a necessidade da intensificação da sua vigilância epidemiológica no país. Assim, novas ferramentas de diagnóstico como a utilizada neste estudo fornece subsídios que facilitam a execução da identificação precoce e conseqüente controle eficiente deste arbovírus.

6.5 Referências

ALLEN, G. P. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine

- herpesvirus-1 in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 8, p. 1401–1405, 2006.
- BETSEM, E. et al. Correlation of West Nile virus incidence in donated blood with West Nile neuroinvasive disease rates, United States, 2010–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 212–219, 2017.
- BUNNING, M. L. *et al.* Experimental infection of horses with West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 380–386, 2002.
- BUSCH, M. P. et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, p. 984–993, 2008.
- CANTILE, C. et al. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 4, p. 414–421, 2001.
- CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p.467-483, 2004.
- COLPITTS, T. M. *et al.* West Nile virus: Biology, transmission, and human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 635–648, 2012.
- COSTA, E. A. et al. Diagnóstico etiológico de enfermidades do sistema nervoso central de equinos no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 391–399, 2015.
- ECDC. West Nile virus risk assessment tool. **Stockholm**, 2013.
- FULOP, L.; BARRETT, A. D. T.; PHILLPOTTS, R. *et al.* Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene sequences. **J Virol Methods**, v.44, p.179–188, 1993.
- HAYES, E.B and O’LEARY, D. R. West Nile virus infection: a pediatric perspective. **Pediatrics**, v.113, p.1375–1381, 2004
- IWAMOTO, M. et al. Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. **New england jornal of medicine**, v.348, n. 22, p. 2196-2203, 2003
- JOHNSON, D J et al. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. **Emerging infectious diseases** v.7, n.4, p.739-741, 2001.
- KLEIBOEKER, S. B., et al. Diagnosis of West Nile virus infection in horses. **Jornal Veterinary Diagnosis Invest**, v. 16, p.2–10, 2004.
- KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 61–81, 2008.
- LAI, L. et al. Relative distribution of West Nile virus RNA in blood compartments: Implications for blood donor nucleic acid amplification technology screening. **Transfusion**, v. 52, n. 2, p. 447–454, 2012.
- LANTERI, M. C. et al. West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: Implication for transfusion and transplantation safety. **Transfusion**, v. 54, n. 12, p. 3232–3241, 2014.
- LUSTIG, Y. et al. Superiority of west nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2294–2297, 2016.
- MAPA. Instrução normativa nº50, de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- MURGUE, B. et al. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 0, p. 117–126, 2001.

- OIE, 2018. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. West Nile Fever. Disponível em: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/West-Nile-fever/> Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- OSTLUND, E. N. et al. Equine West Nile encephalitis, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 665–669, 2001.
- OSTLUND, E. N.; ANDRESEN, J. E.; ANDRESEN, M. West Nile encephalitis. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 16, n. 3, p. 427–441, 2000.
- OZKUL, A. et al. Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses, **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n.7, p.546-551, 2013
- PEALER LN, et al. West Nile Virus Transmission Investigation Team. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **N Engl J Med**, v.349, p. 236–245, 2003
- PETROVIĆ, T. et al. Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–19, 2018.
- RIOS, M. et al. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 2, p. 181–186, 2007.
- ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.
- SICONELLI, M. J. L. et al. Evidence for current circulation of an ancient West Nile virus strain (NY99) in Brazil. **bioRxiv**, v. n/n, n. n/n, p. 2–8, 2020.
- SILVA, A. S. G. et al. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transbound Emerg Dis**, v.66, n.1, p.445-453, 2019
- SILVA, M. L. C. R. et al. Outbreaks of eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 570–575, 2011.
- VENTER, M. et al. Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 877–884, 2009.
- YOUNG, J. J. et al. One Health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: relevance of equine data for blood safety. **Euro Surveill**, v.24, n.16, 2019.

7. Vírus de *West Nile* (WNV) em equídeos no Brasil: um novo desafio para os médicos veterinários

Resumo

O vírus de West Nile (WNV) é um arbovírus transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Culex*, sendo responsável por doença neurológica em aves susceptíveis, equídeos e ser humano. Este vírus foi identificado no Brasil inicialmente em 2009, através de um estudo soropidemiológico em equídeos e, desde então, a presença de anticorpos contra o vírus e/ou ácido nucleico viral tem sido identificado em seres humanos, equídeos e aves. Devido seu caráter zoonótico e graves epidemias causadas em diversos países, é considerado um problema global de saúde pública. O controle da ocorrência de WNV está intimamente relacionado com a atuação dos médicos veterinários na vigilância, principalmente, de casos em equídeos, animais considerados sentinelas na identificação da presença viral. Desta forma, este capítulo tem por objetivo auxiliar estes profissionais na coleta, envio e descarte adequado dos materiais.

Palavras-chaves: encefalites, equídeos, zoonoses, arboviroses

7.1- Introdução

O vírus do Nilo Ocidental (WNV) é um arbovírus com ciclo de transmissão entre vetores invertebrados, mosquitos principalmente do gênero *Culex* e espécies de aves susceptíveis que atuam como amplificadoras do vírus, caracterizando o ciclo enzoótico. Os humanos e os equídeos são considerados hospedeiros acidentais e terminais, uma vez que a viremia ocorre em níveis insuficientes para infectar os mosquitos, encerrando o ciclo de transmissão (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004).

Este vírus é um dos agentes etiológicos de doenças neurológicas em aves susceptíveis, equídeos e também no ser humano, integrando a lista de doenças de notificação obrigatória da OIE (OIE, 2018a).

Os equídeos são suscetíveis ao WNV e os surtos de doenças neurológicas nestes animais, geralmente, precedem os casos humanos (PETROVIC *et al.*, 2018). Assim, podem ser utilizados como indicadores, ou mesmo sentinelas da circulação desses agentes em uma área ou região (KOTAIT *et al.*, 2008). Consequentemente, a investigação diagnóstica da morte de equídeos com manifestações neurológicas é de extrema importância no processo de vigilância. Nesse sentido, a vigilância nestes animais tem sido essencial para fornecer um alerta precoce às autoridades de saúde pública e animal em vários países, incluindo o Brasil (EUCD, 2013; CDC, 2013; BRASIL, 2019)

Desde a identificação do RNA viral associado a síndrome neurológica em equídeos no ano de 2018 no Brasil, a identificação de WNV têm crescido nestes animais em diferentes regiões do país (BAYEUX, *et al.*, 2019).

Desta forma, considerando o crescente número de casos e a circulação de WNV no território nacional, o objetivo deste capítulo é orientar os médicos veterinários sobre a epidemiologia, sinais clínicos, ciclo de transmissão viral e realização da coleta adequada de material biológico em equídeos.

7.2- WNV no Brasil

WNV foi descrito pela primeira vez no Brasil em 2009, através da identificação de anticorpos em cavalos na região do Pantanal, Mato Grosso do Sul (PAUVOLID-CORREA *et al.*, 2011). Posteriormente, novas evidências sorológicas foram descritas em ave doméstica (*Gallus gallus domesticus*), cavalos e uma mula na mesma região e no Estado da Paraíba, bem como identificação dos anticorpos em humanos no Piauí, sugerindo a disseminação do vírus pelo país (MELANDRI *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; PAUVOLLID-CORREA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2015). Entretanto, somente em 2018, o vírus foi identificado e isolado do sistema nervoso central (SNC) de equídeos com afecção neurológica no estado do Espírito Santo (SILVA *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2019).

A indicação de uma maior disseminação do vírus em território nacional ocorreu com novos eventos reportados em 2019, caracterizados pelo acometimento de pacientes humanos no Piauí e de um cavalo com alteração neurológica em São Paulo (capítulo 4) e um equino no Ceará (OIE, 2018a; BAYEUX, *et al.*, 2020). Após, a identificação de novos casos em um equino no Estado do Piauí, bem como de dois equinos no Estado de São Paulo e um no Estado de Minas Gerais, com a detecção do vírus no sangue destes animais indicam a necessidade de ampliar o estudo epidemiológico e diagnóstico do vírus no país (COSTA *et al.*, 2021). Na figura 22, estão representados os estados brasileiros onde foi observada a ocorrência de WNV em diferentes hospedeiros (aves, equídeos e/ou humanos).

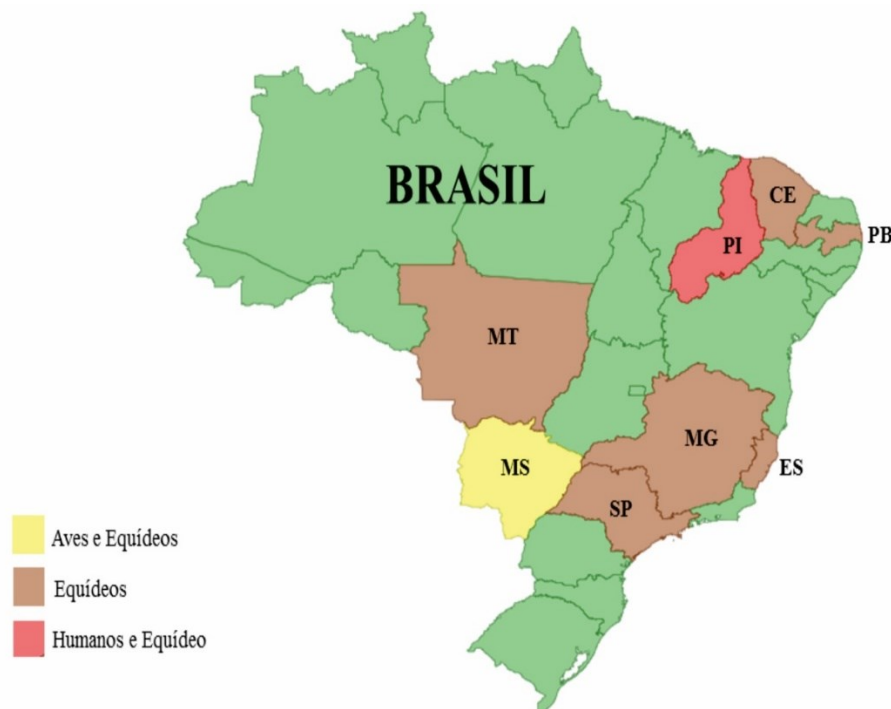


Figura 22. Estados brasileiros onde a presença de WNV foi reportada, por sorologia ou RT-PCR, em aves, equídeos e/ou humanos. Região Centro-Oeste (MT- Mato Grosso; MS- Mato Grosso do Sul); Região Sudeste (ES – Espírito Santo; Minas Gerais – MG; SP- São Paulo); Região Nordeste (CE – Ceará; PB – Paraíba; PI – Piauí).

7.3- Etiologia e o ciclo de transmissão de WNV

WNV é um vírus RNA envelopado com polaridade positiva e classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (COLPITTS *et al.*, 2012; ICTV, 2019). Este vírus integra o grupo dos arbovírus de grande importância para a saúde humana e animal, assim como os vírus da Dengue (DENV), da Zika (ZIKV), da Chikungunya (CHIKV), vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus das Encefalites Equinas do Leste (*eastern equine encephalitis virus* - EEEV), do Oeste (*western equine encephalitis virus* -WEEV) e Venezuelana (*venezuelan equine encephalitis virus* -VEEV). Os arbovírus são mantidos na natureza por ciclos complexos envolvendo hospedeiros invertebrados (mosquitos, carrapatos) e hospedeiros vertebrados, como mamíferos e aves silvestres e, embora esta não seja uma classificação taxonômica, é uma denominação muito utilizada (CHARREL, 2016; LAMBERT; LANCIOTTI, 2016).

O ciclo de transmissão de WNV ocorre por meio da picada de mosquitos, principalmente do gênero *Culex*, durante seu repasto sanguíneo em aves silvestres, caracterizando um ciclo enzoótico. Mais de 300 espécies de aves são consideradas susceptíveis. Dentre as diversas espécies aviárias descritas, está o pardal doméstico (*Passer domesticus*), amplamente distribuído pelas Américas incluindo as zonas urbanas do Brasil (KOMAR *et al.*, 2003; PELLO; OLSEN, 2013).

Além da transmissão do vírus para os hospedeiros vertebrados, os mosquitos possuem a capacidade de transmitir o patógeno para sua progênie, através de transmissão transovariana. Isso permite que o vírus permaneça no ambiente através da prole dos mosquitos infectados, mesmo quando as condições ambientais (por exemplo, temperatura) encontrem-se desfavoráveis para proliferação e atividade do vetor (NASCI *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005).

Ocasionalmente, a transmissão do WNV ocorre também em equídeos e humanos, através do repasto sanguíneo de mosquitos infetados (ciclo epizoótico). Esses hospedeiros são terminais, isto é, não desenvolvem viremia suficiente para que possam participar do ciclo de transmissão do vírus (COLPITTS *et al.*, 2012). Outras vias de transmissão para o ser humano são a transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e via placentária (RIOS *et al.*, 2007; CHANCEY *et al.*, 2015). Na figura 23 está representado o ciclo de transmissão do WNV.

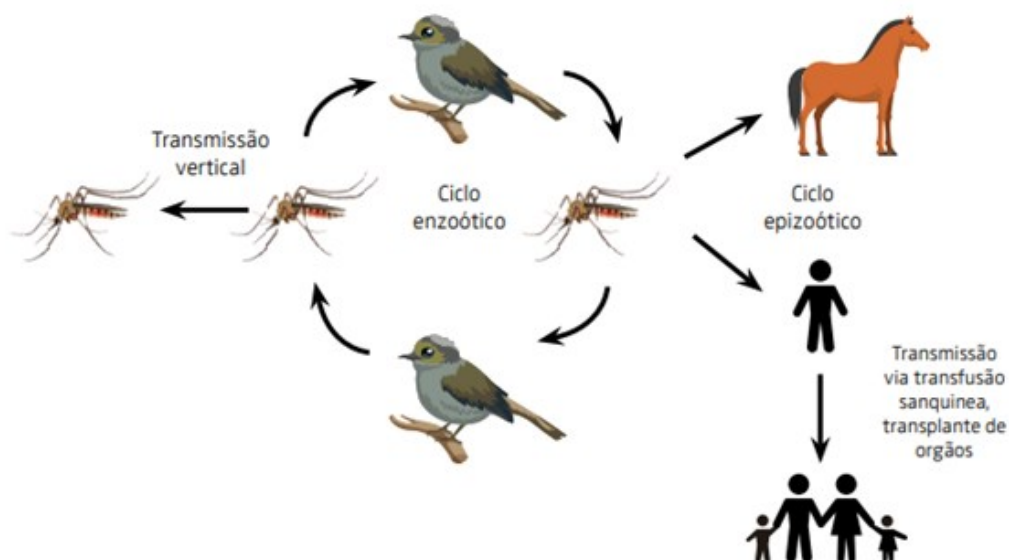


Figura 23. Ciclo de transmissão do vírus de West Nile

7.4- Ocorrência da WNV nos equídeos

WNV pode acometer equídeos de qualquer idade e sexo. A infecção por WNV nos equídeos é caracterizada por uma viremia transitória (1-6 dias) e com baixa carga viral, de caráter neurotrópico sendo sua ocorrência na forma subclínica mais comum. Entretanto, estima-se que em cerca de 8 - 10 % dos equinos infectados, a doença pode evoluir para uma meningoencefalite grave que pode resultar no óbito do animal (OSTLUND *et al.*, 2000; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVORT *et al.*, 2013). Nos asininos e muares esta proporção ainda não está muito clara, embora o acometimento clínico destes animais, principalmente dos asininos, pelo WNV já tenha

sido descrito (MURGUE *et al.*, 2001; SALAZAR *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2019; SCHVARTZ *et al.*, 2020).

A forma de apresentação clínica da doença mais grave é a neuroinvasiva, com acometimento neurológico e que ocorre após entrada do vírus no sistema nervoso central do animal (GOEHRING, 2008). Contudo, o mecanismo pelo qual o vírus consegue atravessar a barreira hematoencefálica ainda não foi elucidado (PETERSEN *et al.*, 2013; HABARUGIRA *et al.*, 2020a)

Os sinais clínicos neurológicos relacionados à infecção por WNV podem ser ataxia, fraqueza generalizada ou dos membros, paresia/paralisia dos membros, fasciculações ou tremores musculares, rigidez ou relutância em caminhar, marcha hiperométrica ou cambaleante, déficits proprioceptivos, movimentos de pedalagem, postura anormal da cabeça, ranger de dentes, convulsões, decúbito e/ou incapacidade de manter-se em pé e febre (CANTILE *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001; AUTORINO *et al.*, 2002; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; SALAZAR *et al.*, 2004; ANGENVOORT, *et al.*, 2013).

No Brasil, os sinais clínicos descritos em equídeos com quadro agudo de afecção neurológica foram tremores musculares, ataxia dos membros anteriores, decúbito lateral, disfagia, movimentos de pedalagem, paralisia de membros pélvicos, perda de sensibilidade e trismo mandibular (SILVA *et al.*, 2019).

No entanto, essas alterações mencionadas não são patognomônicas, sendo encontradas em outras encefalites que acometem esses animais. Desta forma, diferentes condições patológicas e agentes etiológicos estão associados às desordens neurológicas nos equídeos e, entre as causas de encefalites virais estão importantes zoonoses como raiva, encefalites equina do leste (EEE), oeste (WEE) e venezuelana (VEE) e a encefalite de Saint Louis (SLE) (RECH; BARROS, 2015; KUMAR; PATIL, 2017; CHAPMAN *et al.*, 2018).

A taxa de mortalidade resultante da infecção neurológica por WNV nestes animais é de 20 a 45%, porém sugere-se que esse percentual possa ser superior (CANTILE *et al.*, 2001; OSTLUND *et al.*, 2001). Contudo, a taxa de recuperação após infecção por WNV é maior que o percentual de óbito, com descrição na literatura de 50 a 80% de sobrevivência nos diferentes casos clínicos observados (CANTILE *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2004; KLEIBOEKER *et al.*, 2004)

7.5- Diagnóstico de WNV

O diagnóstico tem início com anamnese e exame clínico. A avaliação clínica do animal é uma das ferramentas de detecção da doença, sendo importante avaliar todo o sistema neurológico do animal. No entanto, a maioria dos equídeos são assintomáticos e, quando apresentam acometimento clínico, os sinais clínicos são semelhantes com outras enfermidades do sistema nervoso central, que devem ser incluídas no diagnóstico

diferencial (OSTLUND *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004; CASTILLO-OLIVARES & WOOD, 2004).

Desta forma, a confirmação deverá ser efetuada através de exames laboratoriais que podem ser utilizados para diagnóstico antes e/ou após o óbito do animal. Estes métodos podem ser diretos, onde tem-se a detecção do agente, antígenos e/ou ácido nucleico do vírus ou indiretos, com detecção dos anticorpos específicos contra o vírus (OIE, 2018). Na tabela 10 estão descritos o tipo de amostra clínica e os testes de diagnóstico para WNV (OSTLUND *et al.*, 2000; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; DE FILETTE *et al.*, 2012; ANGENVOORT *et al.*, 2013).

Tabela 10– Testes diagnósticos aplicados para amostras coletadas de equídeos antes e após o óbito

Amostras biológicas coletadas	Métodos diagnósticos
Soro Líquido cefalorraquidiano (LCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção de anticorpos (métodos indiretos): - Ensaio imunoenzimático (ELISA) - Teste de neutralização por redução de placas de lise
Soro LCR Sangue total (com EDTA) SNC (<i>post mortem</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção direta do vírus (métodos diretos) - *RT-PCR; RT-nPCR; RT-qPCR - Isolamento viral em cultivo de células - Imunohistoquímica (IHQ)

RT-PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase precedida da Transcrição Reversa; RT-nPCR: *nested* RT-PCR; RT-qPCR: tempo real

A eficiência dos testes sorológicos é influenciada pelo estágio da infecção no momento da coleta, se na fase inicial (aguda) ou no período de convalescência da doença, fase mais tardia. Os anticorpos IgM para WNV nos equídeos são detectáveis 6 a 10 dias após infecção (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004; ANGENVOORT *et al.*, 2013; OIE, 2018).

Adicionalmente, é importante destacar que, WNV e os outros agentes como vírus da raiva (RABV) e as encefalites equinas (EEEV, WEEV, VEEV) são de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial (SVO) na situação de qualquer caso suspeito ou diagnóstico laboratorial, segundo IN 50/2013 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013).

Contudo para que os exames laboratoriais apresentem resultados corretos e confiáveis, todo o processo desde a coleta, conservação e envio devem ser corretamente executados.

7.5.1. Coleta de material

Antes de qualquer procedimento para a coleta de amostras biológicas de animal com sinais clínicos neurológicos ou suspeito de doença neurológica, o veterinário deve atentar-se para algumas importantes informações que estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - O que o veterinário deve saber antes de proceder a coleta de material:

- 1 - O veterinário, assim como seu auxiliar na necropsia, deve estar com vacinação para raiva e tétano em dia, incluindo sorologia para verificação de título protetor (anticorpos) no caso da raiva.
- 2 - Para coleta de material, equipamentos de proteção individual (EPIs) devem ser utilizados: Dois pares de luvas, jalecos e/ou macacão que proteja os braços, máscara e óculos de proteção, além de botas e aventais laváveis e/ou descartáveis para uso na necropsia.
- 3 - Os instrumentos (tesouras, facas, machadinho) a serem utilizados na necropsia deverão estar limpos e higienizados com detergente e álcool 70%
- 4 - A necropsia deve ser realizada em local com sombra, sem incidência direta do sol.
- 5 - A identificação dos potes de coleta (nome do animal e órgão coletado) deve ser realizada antes do início da necropsia.
- 6 - Tenha sempre papel e caneta em mãos e peça para um auxiliar anotar todas as alterações observadas no animal durante o procedimento.

Na execução do diagnóstico *ante-mortem*, recomenda-se que o sangue total seja coletado em tubos com anticoagulantes, preferencialmente EDTA (tubo de tampa roxa) enquanto, para coleta do soro, o tubo não deve conter anticoagulante (tubos de tampa vermelha) ou tubos que contenham o gel separador (tubos de tampa amarela). O LCR deve ser acondicionado em tubo de polipropileno (tubo tipo *Falcon*) com tampa rosqueável ou no próprio tubo de coleta de soro (tubo de tampa vermelha), sem nenhum tipo de conservante.

Nos animais que vieram a óbito em surtos ou mortes agudas, o diagnóstico *post mortem* é fundamental, pois vai possibilitar a confirmação de um diagnóstico presuntivo ou mesmo apoiar uma suspeita. Além disso, as informações da necropsia são um complemento para os dados epidemiológicos e clínicos do animal (ROBERTSON, 2008; OIE, 2018b).

Desta forma, o exame macroscópico completo no momento da necropsia do animal é essencial para o diagnóstico definitivo e deverá ser executado por um médico veterinário que poderá reconhecer as particularidades de cada sistema, bem como as possíveis alterações encontradas (RECH; BARROS, 2015).

A realização da necropsia deve ser efetuada o mais rápido possível após o óbito do animal para evitar que o processo de autólise se instale nos tecidos (RECH; BARROS, 2015; OIE, 2018b). Além disso, recomenda-se que esta seja realizada em um local a sombra para que a alta temperatura (>25 °C) não favoreça o processo de putrefação (BANDARA; SEQUEIRA, 1999b). Estes cuidados são determinantes pois as análises em laboratório serão comprometidas pelo processo de autólise da carcaça que destrói os tecidos bem

como os patógenos que podem ser relevantes para o diagnóstico (RECH; BARROS, 2015; OIE, 2018b).

Para o diagnóstico de WNV, assim como de outros vírus neurotrópicos como RABV, EEEV, WEEV e VEEV, deverão ser coletados fragmentos de hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, tronco encefálico, tálamo e medula, conforme recomendado no Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) (MAPA, 2016).

Nos equídeos a medula é essencial para o diagnóstico de diversas enfermidades neurológica e o ideal é que os fragmentos sejam coletados nos três seguimentos (cervical, torácico e lombar) (RECH; BARROS, 2015). A infecção por WNV acomete a medula destes animais e a ausência da avaliação deste seguimento pode resultar em um animal falso negativo (CANTILE *et al.*, 2001; KLEIBOEKER *et al.*, 2004).

Adicionalmente, é importante que fragmentos de outros órgãos sejam coletados, principalmente para diagnóstico diferencial. Deve-se coletar fígado, baço, coração, rins, pulmões e intestinos, além de linfonodos e fragmentos de músculos quando estes estiverem com alguma alteração macroscópica visível (MARTIN, 2008a; MARTIN 2008b; ROBERTSON, 2008; OPAS, 2010).

Além da coleta de tecidos importantes para os testes, a amostra deve ser enviada em volumes adequados para que seja possível a execução de todos os testes iniciais assim como testes complementares que sejam necessários para conclusão do diagnóstico (OIE, 2018b). Em caso de dúvidas a respeito do volume e quais amostras devem ser coletadas, assim como o acondicionamento apropriado, recomenda-se que o veterinário entre em contato com o laboratório de diagnóstico previamente para esclarecimentos.

Durante a necropsia, as amostras coletadas devem ser acondicionadas em frascos apropriados e colocadas em gelo para resfriamento ou já armazenadas sob refrigeração (4°C) para evitar degradação do material, e assim a inviabilização dos vírus que podem estar presentes nos tecidos com consequente degradação do material genético viral (MAPA, 2009; LAMBERT; LANCIOTTI, 2016).

7.5.2. Como enviar o material para o laboratório?

Para o diagnóstico ser eficiente e preciso, o recebimento de material em condições adequadas é de extrema importância. Os fragmentos dos órgãos coletados devem ser armazenados em potes de boca larga, que possuam boa vedação, identificados de maneira legível e dentro de saco plástico duplo e resistente. Estes devem ser enviados refrigerados (2-8°C). Entretanto, quando o tempo entre coleta e chegada ao laboratório exceder o período de 24 horas, deve-se congelar (-20°C) o material para ser enviado (MAPA, 2009).

Os materiais como soro, sangue e LCR coletados antes do óbito do animal, devem ser preferencialmente mantidos sob refrigeração (2 a 8°C) com envio em até 48 horas após a

coleta, ou congelamento quando o período exceder 48 horas (RIOS *et al.*, 2007; LACENSC, 2017).

Além do envio do material fresco refrigerado, deve-se coletar fragmentos dos tecidos em formalina 10% tamponada (Para um litro de solução: 100 mL formaldeído 37%; 4 g de fosfato de sódio monobásico; 6,5g de fosfato de sódio dibásico e 900 mL de água destilada). A proporção a ser seguida é de 1:10 de tecido e solução de formalina tamponada, respectivamente. Dessa forma, o formaldeído fixará os tecidos para que seja possível o exame histopatológico que, somado aos outros testes laboratoriais, auxilia no diagnóstico conclusivo da doença (MAPA, 2009).

Para identificação do material, recomenda-se o uso de esparadrapos e/ou etiquetas marcadas com caneta esferográfica azul ou preta. O nome do animal ou o seu número de registro a ser preenchido nesta etiqueta deve ser o mesmo que consta no formulário enviado para o Laboratório do SVO, acompanhado da amostra (MAPA, 2016). Deve-se evitar as identificações de difícil leitura ou o uso de caneta hidrocor que sai facilmente na manipulação do material. Importante evitar o envio de *pool* de amostras de animais diferentes em um mesmo recipiente, sendo ideal utilizar um pote amostral por animal suspeito. Estes procedimentos facilitam a rastreabilidade, caso seja necessário fazê-la (OPAS, 2010).

Em seguida, os potes devidamente fechados contendo as respectivas amostras (embalagem primária), devem ser acondicionados em sacos plásticos (embalagem secundária) e colocados em caixa de isopor contendo gelo reciclável, ou gelos separados em sacos plásticos ou garrafas pets bem fechados, em quantidade suficiente para manter as amostras refrigeradas e/ou evitar seu descongelamento rápido (embalagem terciária). A caixa de isopor deve estar com a tampa com encaixe perfeito, vedada com auxílio de fitas (crepe, durex) e devidamente identificada com informações de remetente e destinatário. É obrigatório conferir se a caixa está bem fechada e sem vazamentos (MAPA, 2016). O fechamento incompleto de toda a embalagem coloca em risco a vida de pessoas que irão manipular o material durante o transporte até a chegada ao laboratório.

Deve-se enviar junto ao material, o histórico e informações clínicas do animal preenchidas corretamente no Formulário de Aquisição de Exames (FORM SN), disponível no site do órgão de saúde animal de cada estado. Além do preenchimento dos campos disponíveis no questionário, sugere-se anexar informações adicionais no campo de observação e identificar (sublinhando ou circulando) os sinais clínicos mais pertinentes.

Antes do envio das amostras, o veterinário deve seguir alguns passos descritos no Quadro 2. O envio das amostras, principalmente os fragmentos de SNC, deverão ser encaminhadas para o laboratório oficial de saúde animal, do SVO de cada Estado. No site do MAPA está disponível as informações e localização dos laboratórios oficiais de cada

região do país (<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/notificacao-de-doencas>).

Quadro 2 - Envio de amostras para diagnóstico – *Check list*

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Certificar se o material está corretamente armazenado ✓ Verificar a disponibilidade do laboratório oficial em receber as amostras ✓ Entrar em contato com o laboratório avisando sobre a data de envio e provável chegada do material ✓ Em caso de uso dos correios enviar o número de rastreamento para o laboratório |
|---|

O laboratório oficial executará o exame para raiva (imunofluorescência direta e prova biológica) e, em caso de diagnóstico negativo, as amostras serão encaminhadas para laboratórios credenciados e/ou oficiais de cada região (LACEN; Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária - LFDAs) pelo MAPA. Nestes laboratórios serão efetuados o diagnóstico de outras encefalites como WNV.

Importante destacar que tecidos em estado de autólise avançada devido à coleta tardia, acondicionados com quantidade de gelo insuficiente para refrigeração e tempo extensivo entre coleta e envio ao laboratório, não poderão ser utilizados para exames, comprometendo assim, a realização do diagnóstico.

7.5.3. Destinação de carcaças e resíduos

O descarte de carcaças e eventuais resíduos da necropsia devem ser efetuados rapidamente para evitar contaminação de pessoas, animais e do ambiente. O processo de eliminação das carcaças deve ser realizado por incineração, enterro ou qualquer outro procedimento que garanta a eliminação do agente infeccioso no ambiente, em locais onde animais e pessoas não tenham acesso e, principalmente, longe de cursos de água e/ou fontes subterrâneas (EMBRAPA, 2019).

Para facilitar essa limpeza, assim como o descarte da carcaça, sugere-se que a necropsia seja realizada em cima de lona grossa preta que deverá ser devidamente descartada após a necropsia, mas nunca enterrada com a carcaça.

O local onde foi realizado a necropsia, botas e aventais e instrumentais usados durante o procedimento, devem ser devidamente higienizados com água e sabão para retirada da sujeira e matéria orgânica e, em seguida, submetida a desinfecção.

A desinfecção química de instrumentais cirúrgicos, vestuários ou do ambiente onde foi realizada a necropsia do equídeo deverão seguir as recomendações descritas para o vírus da raiva (MAPA, 2017). Desta forma, são indicados o hipoclorito de 2 a 2,5% (encontrado

na água sanitária comercial uma concentração de princípio de cloro ativo entre 2% e 2,5%), formol a 10%, glutaraldeído a 1-2%, ácido sulfúrico a 2%, dentre outros, deixando a solução agir por no mínimo 30 minutos (OMS, 2004; MAPA, 2017).

Materiais perfuro-cortantes como agulhas, lâminas de bisturi e recipientes de vidros, devem ser acondicionados em recipientes com paredes rígidas que não serão perfurados (garrafas *pets* ou latas de leite em pó), e destinados pelo médico veterinário conforme orientações do serviço veterinário oficial. Em propriedades com maiores recursos recomenda-se que sejam utilizadas caixas próprias para descarte de resíduos perfuro-cortantes, e a destinação desse material através de contrato com empresa especializada em manejo de resíduos de serviços de saúde.

Materiais utilizados no processo como seringas, luvas, máscaras, toucas, jalecos e/ou macacões descartáveis, algodão, gazes e outros materiais descartáveis utilizados, exceto perfuro cortantes como já mencionado, devem ser destinados como infectantes sendo descartados como lixo de risco biológico. O preconizado é que estes materiais sejam descartados em sacos de lixos específicos da cor branca (OPAS, 2010). No entanto, caso não disponha dos recipientes específicos para descarte, antes de se iniciar qualquer procedimento de necropsia, entre em contato com órgão responsável pela investigação de zoonoses e saúde animal de sua região para que o material classificado como infectante e de risco biológico seja devidamente descartado.

O correto descarte do material é muito importante para que não se comprometa a saúde de outros animais, da população e do meio ambiente. Assim, sugere-se que o médico veterinário entre em contato com o órgão responsável pela investigação de zoonoses ou SVO de seu Estado, para que o material classificado como infectante e de risco biológico seja devidamente descartado, bem como para obter maiores informações da destinação apropriada das carcaças.

7.6 - Controle de WNV – Importância do médico veterinário

Um dos aspectos fundamentais no controle da transmissão dos arbovírus é a detecção precoce do vírus ou a identificação do aumento da sua atividade (CHARREL, 2016). Para WNV o monitoramento é realizado por meio de estudos de soroprevalência e detecção viral no SNC, principalmente em epizootias de aves e equídeos (PETROVIC *et al.*, 2018). Além disso, a detecção viral deste vírus em hemácias de equídeos com manifestação clínica também tem sido realizada no Brasil objetivando auxiliar na detecção precoce de WNV (COSTA *et al.*, 2021).

Os equídeos são considerados sentinelas, isto é, podem indicar a circulação do VNO em uma área e/ou região pois os casos clínicos nestes animais, geralmente, precedem os casos em humanos (ECDC, 2013; PETROVIC *et al.*, 2018). Conseqüentemente, o médico veterinário, que é responsável pela saúde desses animais, é essencial no processo de vigilância de WNV, atuando em parceria com os setores de saúde pública no combate desta zoonose.

A vigilância epidemiológica em equídeos tem sido implementada em vários países. Nos EUA e na Europa, o serviço veterinário passou a atuar em conjunto com setores de saúde humana na implementação dos programas de vigilância da prevalência de WNV. Esta ação resultou em um sistema de saúde único e no controle do vírus, principalmente por sua detecção precoce (OSTLUD *et al.*, 2001; ECDC, 2013). Desta forma, o médico veterinário possui papel importante no controle e combate de zoonoses sendo inserido em um novo conceito de “*One Health*” (YOUNG *et al.*, 2019)

Após os surtos que ocorreram em 1999 nos EUA, os veterinários do país foram orientados quanto à ocorrência da WNV nos equinos por um processo de educação continuada passando a atuar ativamente no campo. Assim, os novos casos de infecção pelo vírus em outras regiões no território norte-americano foram prontamente detectados e medidas de controle foram tomadas para prevenir novos surtos do vírus na população (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019).

Além dos programas de vigilância, medidas de combate ao vetor e outras vias de transmissão, o controle e prevenção de WNV é realizado, por meio da vacinação nos equídeos. As vacinas disponíveis comercialmente, quatro atualmente, são inativadas, confere proteção contra duas linhagens do vírus e são utilizadas em alguns países da Europa e em algumas regiões nos EUA onde o vírus é considerado endêmico e a vacinação foi adotada como medida de controle da disseminação viral nos rebanhos destes animais (ECDC, 2013; ANGENVOORT, *et al.*, 2013).

Contudo, a vacinação só pode ser utilizada segundo critérios técnicos estabelecidos pela organização de saúde animal de cada país atendendo a exigência da ocorrência endêmica do vírus na região (OIE, 2018a). No Brasil, a vacina contra WNV não foi licenciada, visto que, para inserção de um programa vacinal, é necessária uma avaliação completa da situação epidemiológica da doença, bem como a caracterização do vírus circulante.

Além disso, a implementação da vacinação deve considerar também a necessidade do uso dos equídeos para vigilância epidemiológica do vírus em uma região pois sua introdução interfere nos estudos de sorovigilância e a interpretação de determinados testes diagnósticos é dificultada pela presença de anticorpos contra o vírus (CDC, 2013; PETROVIC *et al.*, 2018).

Embora uma diminuição dos casos clínicos nos rebanhos equinos após implantação da vacinação em 2003 foi observada, aproximadamente 28 mil animais com infecção por WNV até final de 2017 nos EUA ainda foram reportados ao serviço veterinário oficial (BOSCO-LAUTH; BOWEN, 2019). Assim, a vacinação deve ser associada a outras medidas protetivas como, principalmente, o controle do vetor (DAVIDSON *et al.*, 2005).

No caso de humanos, a vacinação ainda não está licenciada, porém, inúmeros estudos têm sido realizados, propondo diferentes tipos de tecnologias (DE FILETTE *et al.*, 2012). Existe atualmente vacinas em fases de testes, incluindo algumas em testes 1 e 2 da fase clínica (ULBERT, 2019).

7.7- Considerações finais

O Brasil possui condições favoráveis para estabelecimento e propagação de muitos arbovírus, como WNV. Além das condições climáticas e territoriais propícias à proliferação e à atuação dos vetores, e à presença de vetores competentes e aves susceptíveis, o país possui um dos maiores rebanhos equídeos do mundo. Portanto, a presença de WNV indica a necessidade da atuação ativa do veterinário na detecção precoce do vírus prevenindo, assim, a ocorrência de surtos.

No entanto, embora este arbovírus seja uma preocupação importante para os veterinários e, também, para proprietários de equídeos no Brasil, entre as causas de encefalite nos equídeos brasileiros, a raiva constitui a mais importante zoonose a ser controlada nesses animais. Entre os anos de 1999 e 2019, um total de 3.783 animais foram positivos em todo território (MAPA, 2021). Desta forma, além da sua importância como zoonose, é prioridade no diagnóstico de equídeos com síndrome neurológica (BRASIL, 2009; COSTA et al., 2015a).

Além disso, apesar das doenças do sistema nervoso representarem parte importante nos diagnósticos de enfermidades nos equídeos, existe uma dificuldade na determinação etiológica relacionada, principalmente, com a coleta e envio incorreto de material após o óbito do animal.

O diagnóstico definitivo de doenças neurológicas nos equídeos deve incluir um histórico detalhado e completo, um exame clínico eficiente acompanhado sempre de um diagnóstico laboratorial que apresentará bons resultados mediante uma coleta e conservação adequada do material a ser avaliado. Todos estes aspectos são importantes para diminuir o número de animais sem diagnóstico conclusivo e o médico veterinário é responsável pela execução de todo este processo. Adicionalmente, a atuação conjunta de médicos veterinários, médicos e pesquisadores vai permitir uma resolução mais eficaz na detecção e controle de zoonoses como WNV.

Com base nas informações do texto, a Figura 24 descreve, resumidamente, o passo a passo da conduta do médico veterinário antes, durante e após a necropsia nos equídeos. Essas informações, bem como os materiais coletados durante o processo, são úteis para o diagnóstico, não apenas de WNV, mas da maioria das encefalites (virais, bacterianas, fúngicas ou parasitárias). A coleta e envio do material é de responsabilidade do médico veterinário e são etapas essenciais do processo, sendo que as recomendações devem ser prontamente seguidas para que seja possível o diagnóstico laboratorial.



Figura 24. Passo a passo das etapas de coleta, acomodação e envio das amostras para o laboratório e procedimento após a necropsia. Fonte: Fotos 1, 3 e 5 - Manual Pan Americano de coleta - Mapa/OPAS, 2010; Foto 2 – imagem cedida pelo veterinário Marcos Antônio Correia Rodrigues da Cunha; Foto 4 - Manual Técnico de Controle de raiva dos Herbívoros – MAPA, 2009.

7.8 Referências

- ANGENVOORT, J. et al. West Nile viral infection of equids **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 168–180, 2013
- AUTORINO, G. L. et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.1372–1378, 2002.
- BAYEUX, J. J. M. et al. Epidemiological surveillance of West Nile virus in the world and Brazil: relevance of equine surveillance in the context of “One Health” **Braz J Vet Res Anim Sci**.v. 56, n. 4, p. e164335, 2019.
- BOSCO-LAUTH, A. M.; BOWEN, R. A. West Nile Virus: Veterinary Health and Vaccine Development. **Journal of Medical Entomolog**, v.56, n.6, p.1463-1466, 2019.
- BRASIL, 2018. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 1º MARÇO DE 2018. Febre do Nilo Ocidental – Orientações ao Serviço Oficial de Saude Animal. Disponível em: <http://www.aged.ma.gov.br/files/2018/06/febre-do-nilo.pdf>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- BRASIL, 2019. Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental no Brasil, 2014 a 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde. INFORME nº1, julho 2019.

- CANTILE, C. et al. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. **Veterinary Pathology**, v.38, p.414–421, 2001.
- CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p.467-483, 2004.
- COSTA, E. A. et al. West Nile virus detection in horses in three Brazilian states. bioRxiv-The preprint server for biology. <https://doi.org/10.1101/2021.01.06.425363>, 2021. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- CHANCEY, C.; GRINEV, A.; VOLKOVA, E. and RIOS, M. Review Article The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. **BioMed Research International**, p. 1-25, 2015.
- CHAPMAN, G. E, et al. The challenges posed by equine arboviruses. **Equine Veterinary Journal**, v.50, n.4, p.436-445, 2018.
- CHARREL, R.N. Diagnosis of arboviral infections--A quagmire of cross reactions and complexities. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.14, n.1, p.11-12, 2016.
- COLPITTS, T. M., et al. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 635–648, 2012.
- DAVIS, L. E., et al. West Nile Virus Neuroinvasive Disease. **Neurological Progress**, v. 60, p. 286-300, 2006.
- DE FILETTE, M. et al. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. **Veterinary Research**, v. 43, n. 16, p. 1-15, 2012.
- ECDC, 2013. European Centre for Disease Prevention and Control. West Nile virus risk assessment tool Stockholm: ECDC; 2013, p. 1 – 24.
- EMBRAPA, 2019. Métodos de destino final de animais mortos de médio e grande porte no Brasil. Informativo técnico. Rodney de Arruda Mauro; Marta Pereira da Silva. Informativo técnico. P. 1-14. 2019.
- GOEHRING, L. Viral diseases of the nervous system. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.) Equine Neurology. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.169 – 186.
- HABARUGIRA, G. et al. West Nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One health” implications. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1–51, 2020a.
- HAYES, E. B. et al. Epidemiology and transmission dynamic of West Nile Virus Disease. v. 11, n. 8, 2005.
- ICTV, 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- KOMAR, N., et al. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 311 – 322, 2003.
- KOTAIT, I.; ITO, F., CARRIERI, M. L., et al. Programa de Vigilância de Zoonoses e Manejo de Eqüídeos do Estado de São Paulo. **BEPA- Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 54, 2008.
- KLEIBOEKER, S. B., et al. Diagnosis of West Nile virus infection in horses. **Jornal Veterinary Diagnosis Invest**, v. 16, p.2–10, 2004.
- KUMAR, R.; PATIL, R. D. Cryptic etiopathological conditions of equine nervous system with special emphasis on viral diseases. **Veterinary World**, v. 10., n.12, p. 14271438, 2017.
- LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE SANTA CATARINA. Manual de orientação para coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas, 2017. Disponível em: <<http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/MCT01.pdf>> Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.
- LAMBERT, A.J.; LANCIOTTI, R. S. Laboratory Diagnosis of Arboviruses. In: VASILAKIS, N.; GUBLER, D.J. (Ed.). Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Poole, UK: Caister Academic Press, 2016.p. 270-275.

- MAPA, 2009. Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília-DF: MAPA/SDA, 2009, p.1-124. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021
- MAPA. Instrução normativa nº50, de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- MAPA; 2016. PNCRH: Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros. Procedimentos para coleta de amostras suspeitas de raiva e EET.
- MAPA,2017. Programas de saúde animal: raiva dos herbívoros e eeb – Revisão sobre Raiva Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animale-vegetal/saude-animale-vegetal/programas-de-saude-animale-vegetal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/RevisosobreRaiva2017.pdf> . Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- MARTIN, F. Miscellaneous Infections of the Central Nervous System. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.) *Equine Neurology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008a, p.231-233.
- MARTIN, F. Clostridial neurotoxins Botulism and Tetanus. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.) **Equine Neurology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008b, p.221-229.
- MARTINS, L. C., et al. First isolation of West Nile virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1-19, 2019.
- MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.8,p.1073–1075, 2012.
- MURGUE, B. et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. **Emerging Infectious Diseases**, vl.7, n.4, p. 692- 696, 2001.
- NASCI, R. S., et al. West Nile Virus in Overwintering Culex Mosquitoes, New York City, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 742-744, 2001
- OMETTO, T. et al., “West nile virussurveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.107, n.11, p.723–730, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Manual de segurança biológica em laboratório, 2004. Disponível em: <<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf>>. Acesso em: 27 outubro 2019.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico. Cooperação Técnica MAPA/OPAS/ANAFTOSA para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil, 2010. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/33893>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- OIE, 2018a. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. West Nile Fever. Disponível em: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/West-Nile-fever/> Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.
- OIE, 2018b. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Collection, submission, and storage of diagnostic specimens. Disponível em: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> Acesso em: 26 de março de 2021
- OSTLUND, E. N., et al. Equine West Nile encephalitis, United States, **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p.665–669, 2001.
- PAUVOLID-CORRÊA, A.; VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 3, p. 463-72, 2008.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467 -474, 2011.

- PAUVOLID-CORREA, A., et al. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, 2014.
- PELLO, S. J.; OLSEN, G. H. Emerging and reemerging diseases of avian wildlife. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 357–381, 2013.
- PETERSEN, L. R.; BRAULT, A. C.; NASCI, R. S. West Nile virus: Review of the literature. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 3, p. 308–315, 2013.
- PETROVIĆ, T., et al. Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. **PLoS ONE**, v. 13, n.4, 2018.
- RECH, R.; BARROS, C. Neurological diseases in horses. **Veterinary Clinics Equine**, v. 31, p. 281–306, 2015.
- RIOS, M. et al. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 181–186, 2007
- ROBERTSON, J. L. The basics of equine neuropathology. In: FURR, M.; REED, S. (Ed.) *Equine Neurology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.157-166.
- SILVA, L. C. et al., “Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v..108, n.7, p.921–923, 2013.
- SILVA, A. S. G. et al. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transboundary Emerging Disease**, v. 1, n. 9, p. 445–453, 2019.
- SCHVARTZ, G., FARNOUSHI, Y., BERKOWITZ, A. *et al.* Molecular characterization of the re-emerging West Nile virus in avian species and equids in Israel, 2018, and pathological description of the disease. **Parasites Vectors** v.13, n. 528, 2020.
- VIEIRA, M. A. C. S., et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.93, n. 2, p. 377-379, 2015.
- ULBERT, S. West Nile virus vaccines – current situation and future directions, **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.15, n.10, p.2337-2342, 2019
- YOUNG, J. J. et al. One Health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: relevance of equine data for blood safety. **Euro Surveill.**, v.24, n.16, 2019.

8. Considerações finais

O presente estudo destacou a importância do diagnóstico das encefalites virais nos equídeos com ênfase no vírus do Nilo Ocidental (WNV), uma importante zoonose com grande potencial epidêmico.

O aperfeiçoamento das técnicas moleculares desenvolvido neste trabalho proporcionou a primeira identificação do material genético de WNV em amostras de SNC de equídeos com síndrome neurológica no Brasil. A técnica se mostrou eficaz não apenas para detecção do agente viral no tecido nervoso, mas também nas hemácias de um cavalo com desordem neurológica. Desta forma, apresentamos novas perspectivas para diagnóstico e consequente auxílio na vigilância epidemiológica de WNV no país.

Diante dos resultados da crescente detecção de WNV no Brasil e o potencial problema de saúde pública deste arbovírus, esforços devem ser direcionados para pesquisas proporcionando maior conhecimento da cadeia epidemiológica do vírus no país.

Neste contexto, o médico veterinário tem papel relevante em todo o processo do diagnóstico de importantes zoonoses como WNV atuando na linha de frente desde a coleta a campo até o envio do material ao laboratório.

A avaliação deste estudo dos aspectos de coleta e envio de material a campo sugerem uma necessidade urgente de melhoria. Desta forma, publicações (caderno técnico e artigo em revista de educação continuada) foram geradas a partir de parcerias de diversos setores da Escola de Veterinária (UFMG), o Conselho de Medicina Veterinária de São Paulo (CRMVSP) e o de Minas Gerais (CRMVMG) objetivando auxiliar os médicos veterinários quanto a todo o processo de diagnóstico de equídeos com síndrome neurológica, desde o exame clínico até envio do material para o laboratório.

Assim, esperamos que a presente tese e os trabalhos gerados a partir destes estudos, possam contribuir valiosamente para a vigilância epidemiológica das encefalites virais no rebanho equídeo brasileiro proporcionando uma prevenção e controle da ocorrência de importantes zoonoses nestes animais e, consequentemente, na população.

9. Trabalhos e publicações

- 9.1 SILVA, A. S. G** et al. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transboundary and emerging diseases*, v. 66, n.1, p. 445-453, 2019. doi:10.1111/tbed.13043
- 9.2 BAYEUX, J. J. M., SILVA, A. S. G., QUEIROZ, G. A.,** et al. Epidemiological surveillance of West Nile virus in the world and Brazil: relevance of equine surveillance in the context of “One Health. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 56, n.4, e164335, 2019. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.164335>
- 9.3 SILVA, A. S. G.** et al. Febre do Nilo Ocidental em equídeos no Brasil: novo desafio aos médicos-veterinários. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, São Paulo*, v.19, n.1, 2021. e38082. Doi 10.36440/recmvz.v19i1.38082
- 9.4** Caderno Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Procedimentos para diagnóstico das doenças neurológicas em equídeos, n. 99, p. 1-50, 2021.

ANEXO 1

Tabela 11. Sequências avaliadas para escolha dos primers utilizados no estudo

Vírus	Fragmento (gene)	GenBank	País	Hospedeiro
SLEV	Genoma completo	KM267635	Brasil	Humano
SLEV	Poliproteína	GU808534	Brasil	Humano
SLEV	Poliproteína	GU808536	Brasil	<i>Culex sp.</i>
SLEV	Poliproteína	GU808532	Brasil	<i>Culex declarator</i>
SLEV	Poliproteína	GU808537	Brasil	Ave (<i>Myrmotherula hauxwelli</i>)
SLEV	Poliproteína	GU808546	Brasil	Ave (<i>Saltator maximus</i>)
SLEV	Poliproteína	GU808538	Brasil	Ave (<i>Geotrygon montana</i>)
SLEV	Glicoproteína E	KF718857	Brasil	Equino
SLEV	Glicoproteína E	KJ847419	Brasil	Humano
SLEV	Glicoproteína E	KJ801827	Brasil	Mosquito (sem identificação)
SLEV	NS5	AY825077	Brasil	Sem informação
WNV	Genoma completo	NC009942	EUA	Sem informação
WNV	Genoma completo	AF260967	EUA	Equino
WNV	Genoma completo	DQ211652	EUA	Sem informação
WNV	Poliproteína	DQ080071	México	Equino
WNV	Poliproteína	DQ080069	México	Equino
WNV	Genoma completo	GQ379161	Argentina	Equino
WNV	Genoma completo	GQ379160	Argentina	Equino
WNV	Poliproteína	MH819471	Canadá	<i>Culex sp</i>
WNV	Poliproteína	JN716372	Colômbia	Ave (<i>Phoenicopterus ruber</i>)
WNV	Genoma completo	AY660002	México	Sem informação
WNV	Poliproteína	AY532665	EUA	Passagem célula (C6/36)
EEEV	Genoma Completo	KR132531	Brasil	Equino
EEEV	Poliproteína estrutural	GU001923	Brasil	Mosquito (sem identificação)
EEEV	Poliproteína estrutural	GU001931	Brasil	Mosquito (sem identificação)
EEEV	Poliproteína estrutural	GU001935	Brasil	Ave
EEEV	Genoma completo	KJ469637	Brasil	<i>Aedes</i>
EEEV	Genoma completo	KJ469640	Brasil	<i>Culex</i>
EEEV	Genoma completo	KJ469641	Brasil	<i>Culex</i>
EEEV	Genoma completo	KJ469558	Brasil	Sem informação

EEEV	Genoma completo	KJ469598	Brasil	Macaco prego (<i>Cebus apella</i>)
EEEV	Genoma completo	EF151503	Brasil	Sem informação
EEEV	Genoma completo	KU840334	EUA	Equino
EEEV	Genoma completo	KU840334	EUA	Equino
EEEV	Genoma completo	KU840345	EUA	Equino
EEEV	Genoma completo	KU840346	EUA	Equino
EEEV	Genoma completo	KU840347	EUA	Equino
EEEV	Genoma completo	KU840348	EUA	Equino
WEEV	Genoma completo	KJ554991	EUA	<i>Culex</i>
WEEV	Genoma completo	GQ287647	México	<i>Culex</i>
WEEV	Genoma completo	GQ287646	Argentina	<i>Culex</i>
WEEV	Genoma completo	GQ287645	EUA	Equino
WEEV	Genoma completo	GQ287641	EUA	<i>Culex</i>
WEEV	Genoma completo	KT844541	Guiana	Equino
WEEV	nsP1	AY348559	Brasil	Sem informação
WEEV	nsP4	U60407	EUA	Sem informação
WEEV	nsP4	HM640251	Uruguai	Homem
WEEV	Poliproteína não estrutural	FJ786260	EUA	<i>Culex tarsalis</i>
WEEV	Poliproteína estrutural	DQ393794	Canadá	Sem informação
WEEV	Poliproteína estrutural	DQ393793	Canadá	Sem informação
WEEV	Poliproteína estrutural	DQ393792	Canadá	Sem informação
WEEV	Poliproteína estrutural	DQ393791	EUA	Sem informação
WEEV	Poliproteína estrutural	DQ393790	EUA	Sem informação
WEEV	Poliproteína estrutural	FJ786265	Canadá	Homem
WEEV	Poliproteína estrutural	FJ786264	EUA	<i>Culex tarsalis</i>
WEEV	Poliproteína estrutural	FJ786262	EUA	Tartaruga (<i>Gopherus berlandieri</i>)
WEEV	Poliproteína estrutural	DQ432027	EUA	Sem informação
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792625	Brasil	Macaco
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792624	Brasil	<i>Culex portesi</i>
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792623	Brasil	Sem informação
VEEV	nsP1	AY348558	Brasil	Sem informação
VEEV	Genoma completo	KC344485	Colômbia	Equino

VEEV	Genoma completo	KC344483	Peru	Equino
VEEV	Genoma completo	KC344516	Venezuela	Equino
VEEV	Genoma completo	KC344484	Colômbia	Equino
VEEV	Genoma completo	KC344481	México	Equino
VEEV	Genoma completo	KC344463	México	Equino
VEEV	Genoma completo	KC344430	Peru	Equino
VEEV	nsP1	U94615	Brasil?	Sem informação
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792625	Brasil	Macaco
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792624	Brasil	<i>Culex portesi</i>
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792622	Trinidad	Roedor
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792623	Brasil	Sem informação
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792621	Trinidad	Roedor
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792620	Trinidad	Roedor
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792610	Trinidad	<i>Culex portesi</i>
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792615	Trinidad	Camundongo
VEEV	Poliproteína estrutural	FJ792619	Trinidad	Mosquito (sem identificação)
