UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Pesquisa de infecções por Flavivírus da encefalite de
Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por
inquérito sorológico e isolamento viral**

JAQUELINE RAYMONDI SILVA

Ribeirão Preto
2010

JAQUELINE RAYMONDI SILVA

**Pesquisa de infecções por Flavivírus da encefalite de
Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por
inquérito sorológico e isolamento viral**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
Opção: Bioagentes Patogênicos.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes
Figueiredo**

**Ribeirão Preto
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Jaqueline Raymondi

Pesquisa de infecções por Flavivirus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral.

p. 131: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada, opção Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

1. Flavivirus. 2. Cavalos. 3. Soroepidemiologia. 4. ELISA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jaqueline Raymondi Silva

Pesquisa se infecções por Flavivirus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Opção: Bioagentes Patogênicos.

Aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, Angela e Wagner, que são
parte essencial de todas as metas
alcançadas. Obrigada pela paciência,
confiança, ensinamentos, compreensão,
amor e carinho dedicados a mim, para que
esse sonho se tornasse realidade.*

*Ao meu irmão Alessandro, de quem sempre tive
apoio em todas as decisões tomadas e cuja
amizade sempre foi motivo de alegria e
inspiração para atividades futuras. Meu melhor
amigo e companheiro de todas as horas.*

*A todos os animais que participaram deste
estudo, de forma direta e indireta. Tenho
consciência que este trabalho não teria sido
feito sem a essencial ajuda destes seres
especiais.*

Amo vocês!!!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, por ter me dado a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, por ter me proporcionado as condições de realizar este trabalho, e pelos ensinamentos e orientação.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto e Prof. Dr. Afonso Dinis Costa Passos, pela discussão do trabalho e sugestões, que me ajudaram a aprimorar esta Dissertação, além da disponibilidade de participarem desta Comissão Julgadora.

Aos professores Rosângela Zacarias Machado e Cristiane Divan Baldani, por terem gentilmente cedido os soros de cavalos do estado de São Paulo.

Aos professores Juca e Valadão, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, e ao médico veterinário Thiago Demarchi Munhoz, pela coleta de soros de animais desta Faculdade.

À professora Joice Lara Maia Faria pela coleta de soros de cavalos do estado de Minas Gerais.

Ao médico veterinário Gustavo Puia Borges e sua esposa, por terem disponibilizado os soros de animais do estado do Mato Grosso do Sul.

À AMAN e ao 1º Tenente Otávio Augusto Brioschi Soares pela coleta e envio dos soros de animais da cavalaria desta unidade.

À Luana Maria Cristiny da Silva, pelo envio de amostras de equinos do estado da Paraíba.

Ao Curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP – USP, na pessoa de seus professores e funcionários, pelos ensinamentos e convivência.

À secretária da pós-graduação Ana Cristine S. Ferreira pela eficiência na condução de seu trabalho e por ter me ajudado tantas vezes durante o Mestrado.

Ao meu amado Jhimmy, pela paciência, amizade, companheirismo, otimismo, enfim, por ter me acompanhado durante toda a condução deste trabalho, sempre com muito bom-humor!

Aos meus colegas do laboratório, Glauciane, Alex, Vinícius, Gilberto, Pedro, Felipe e, especialmente, Juliana, pela convivência nestes anos de Mestrado, e pelo apoio e incentivo.

Aos virologistas do CPV: Rafael Prado, Alberto, Telma, Liz, Fábio, Vanessa, Luiza, Paula, Kléber, Natália, Aline, Mariana, Emiliana, Maira e todos os demais que, de uma forma ou

de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja pela ajuda em aspectos técnicos, ou pela convivência diária em momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos “rock’n roll”, Viviane, Johnny e Rafa, pela companhia, risadas, amizade e noites intermináveis no melhor lugar de Ribeirão Preto: Vila Dionísio.

À técnica mais “louquinha” do CPV, Soraya, por tudo de bom que fez por mim, desde a ajuda na condução dos experimentos, como a amizade proporcionada, e, principalmente, a alegria que ela traz ao laboratório.

Aos funcionários do CPV, Sueli, Paulo, Pavanelli e Hélder, pela força, e estando sempre dispostos a nos ajudar em tudo o que precisássemos.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial àqueles que participaram da disciplina do João, e aos demais “loucos” deste programa.

Aos meus queridos amigos “roommates”, Pará e Zé, pela amizade e convivência incrivelmente divertida.

Às minhas queridas amigas de Jaboticabal, Jacque, Adriana, Ju, Melina e Fernanda, e aos meus queridos Tiago e Umberto. Apesar da distância, a convivência e amizade de vocês me ajudaram a ser o que sou hoje.

À minha grande e melhor amiga Mônica. Obrigada por esses anos de amizade, apoio, incentivo, diversão, enfim, por ser esta amiga tão especial, que não tenho nem palavras para descrever.

À minha divertida família (vó Diva, Artur, Adriana, Carol, Gu, Regina, Thaís, Thiago, pessoal do Sul, e todos os outros) pelo apoio, mesmo à distância.

Aos meus bebês mais lindos do mundo, Pininho, Bolota, Nicodemus, Artemis, Sofia, e aos recém-chegados Astolfo e Rodolfo. Vocês são os “filhos” mais queridos que uma “mãe” pode querer.

À FAPESP pelo essencial apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. São tantas pessoas importantes que fica difícil lembrar-se de todas no momento.

Obrigada a todos vocês!

"A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."

Arthur Schopenhauer

RESUMO

SILVA, J. R. **Pesquisa de infecções por Flavivirus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral.** 2010. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Arboviroses são grave problema de saúde pública no Brasil e destas destacam-se aquelas causadas por Flavivírus, dos quais onze já foram descritos no Brasil. Destes, dois importantes em saúde pública, e que pertencem ao sorocomplexo da Encefalite Japonesa, são o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e o Rocio (ROCV). O vírus Oeste do Nilo (WNV), introduzido no continente americano em 1999, ainda não foi detectado no Brasil, contudo sua introdução é muito provável. Neste estudo, avaliou-se a circulação de SLEV, ROCV e WNV em cavalos, por tentativas de isolamento viral e inquérito soro-epidemiológico. As tentativas de isolamento viral, em 11 tecidos cerebrais de cavalos do estado da Paraíba, resultaram negativas. O inquérito sorológico, por IgG-ELISA tendo como antígeno peptídeos recombinantes do domínio III da proteína de envelope de SLEV, WNV e ROCV, foi utilizado em 753 soros de animais dos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraíba. Soros de 271 cavalos foram positivos para SLEV (35,98%), 254 para WNV (33,73%) e 144 para ROCV (19,12%). Portanto, o ELISA mostrou-se adequado, diagnosticando infecções prévias por estes Flavivírus. Também, observou-se intensa circulação destes vírus infectando cavalos nos locais de estudo. Ainda, obteve-se, pela primeira vez, evidencia de que WNV foi introduzido no Brasil e encontra-se a infectar cavalos nos estados pesquisados exceto Minas Gerais. Finalmente, o inquérito sorológico em cavalos mostrou-se uma abordagem adequada à vigilância das flavivirose por SLEV, ROCV e WNV no Brasil.

Palavras chaves: Flavivirus, cavalos, soroepidemiologia, ELISA.

ABSTRACT

SILVA, J. R. **Searching for Saint Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flavivirus infections in horses.** 2010. 131 p. Dissertation (Master) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Arboviruses are a serious public health problem in Brazil and, from these, the most important are caused by Flavivirus. Eleven Flavivirus have been described in Brazil. Of these, Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV) and Rocio Virus (ROCV) are major public health problems and belongs to the Japanese Encephalitis Serocomplex. West Nile Virus (WNV), introduced in the American continent in 1999, has not yet been detected in Brazil. In this study, it was evaluated the circulation of SLEV, WNV and ROCV in horses, by viral isolation attempts and a serosurvey. Viral isolation attempts were performed in 11 brain tissues of horses from Paraíba state with negative results. It was used for the serosurvey, an IgG-ELISA with recombinant peptides of domain III of SLEV, WNV and ROCV envelope protein as antigens. Sera from 753 animals from São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Paraíba states were tested, and 271 of them were positive for SLEV (35,98%), 254 for WNV (33,73%) and 144 for ROCV (19,12%). Therefore, this ELISA has been a suitable approach for diagnosis of ancient infections by these viruses. An intense circulation of flaviviruses infecting horses was observed in the study sites. Besides, it was found, for the first time, the presence of WNV in Brazil, infecting horses from all the studied states with the only exception of Minas Gerais. Finally, serosurvey in horses proved to be an appropriate approach for surveillance of Flavivirus infections by SLEV, WNV and ROCV.

Keywords: Flavivirus, horses, seroepidemiology, ELISA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Arbovírus	2
1.2. Flavivírus	3
1.3. Estrutura, genoma e Replicação dos Flavivírus	5
1.4. O domínio III da proteína E	8
1.5. Patogênese das infecções no sistema nervoso central por Flavivírus	10
1.6. Vírus Rocio (ROCV)	11
1.7. Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)	13
1.8. Vírus do Oeste do Nilo	16
1.9. Diagnóstico das infecções po SLEV, ROCV e WNV	19
1.10. Prevenção, controle e tratamento das infecções equinas por SLEV, ROCV e WNV	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Tentativa de isolamento de <i>Flavivirus</i> em equinos	26
3.1.1. Preparo dos tecidos de Sistema Nervoso Central Infectante	26
3.1.2. Inoculação em camundongos	26
3.1.3. Inoculação em células de mosquito C6/36	27
3.1.4. Produção de fluidos ascíticos imunes (MIAFs) de camundongos	29
3.2. Inquérito sorológico	30
3.2.1. Amostras de soros	30
3.2.2. Reação Imunoenzimática (ELISA) para rDIII de SLEV, WNV e ROCV	34
3.2.2.1. Triagem dos soros equinos	34
3.2.2.2. Titulação das amostras positivas	36

4. RESULTADOS	37
4.1. Resultados dos testes de isolamento viral.....	38
4.1.1. Resultados dos testes de isolamento viral em camundongos.....	38
4.1.2. Resultados dos testes de isolamento viral em células C6/36.....	38
4.2. Resultados do inquérito sorológico	40
4.2.1. Resultados dos testes sorológicos por Reação Imunoenzimática (ELISA) para rDIIIE de SLEV, WNV e ROCV em soros de equinos.....	40
4.2.2. Equinos sororeagentes para SLEV.....	42
4.2.3. Equinos sororeagentes para WNV	43
4.2.4. Equinos sororeagentes para ROCV	45
4.2.5. Equinos com soropositividade monotípica para SLEV, WNV ou ROCV	46
4.2.6. Equinos com soropositividade cruzada para SLEV, WNV ou ROCV	49
4.2.7. Títulos séricos para SLEV, WNV e ROCV dos animais positivos	50
4.2.7.1. Titulação dos soros de animais positivos com reação monotípica para SLEV, WNV ou ROCV	50
4.2.7.2. Titulação dos soros de animais positivos com reação cruzada entre SLEV, WNV e ROCV, segundo o estado de origem.....	52
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS	81
8. ANEXOS.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); solução reveladora do ELISA

BUSV – Vírus Bussuquara

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CPCV – Vírus Cacipacoré

CPV – Centro de Pesquisa em Virologia

DEN – Complexo dos vírus Dengue

DENV – Vírus Dengue

DIII – domínio III da proteína do envelope de Flavivírus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – proteína do envelope de Flavivírus

EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HI – teste de Inibição da Hemaglutinação

IFI – teste de Imunofluorescência Indireta

IFN – Interferon

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IGUV – Vírus Iguape

ILHV – Vírus Ilhéus

JEC – Complexo da Encefalite Japonesa

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

MAb – anticorpo monoclonal

MAC-ELISA – teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina M

MG – Estado de Minas Gerais

MIA – *Microsphere-based immunoassays* (teste imunológico baseado em microesferas)

MIAF – *Mouse Immuneascitic Fluid* (fluidos ascíticos imunes de camundongos)

MS – Estado do Mato Grosso do Sul

NS (1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b e 5) – proteína não estrutural dos Flavivírus

NY99 – primeira estirpe do Vírus do Oeste do Nilo isolada nos Estados Unidos

ORF – região de leitura aberta

PB – Estado da Paraíba

PBS – Solução salina tamponada com fosfatos

PBST - Solução salina tamponada com fosfatos acrescida de 0,05% Tween20

PRNT – teste de neutralização por redução de placas

rDIIIIE – peptídeo recombinante do domínio III da proteína do envelope de Flavivírus

RJ – Estado do Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucleico

ROCV – Vírus Rocio

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa

SDS – dodecil sulfato de sódio

SLEV - Vírus da Encefalite de Saint Louis

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – Estado de São Paulo

ssRNA – RNA fita simples

TBEC – Complexo da encefalite por carrapatos

TBEV – Tick-borne Encephalitis Virus (Vírus da Encefalite de Carrapatos)

UAMV – Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande

VEEV – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

WEE – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

WNV – Vírus do Oeste do Nilo

YF – Complexo da Febre Amarela

YFV – Vírus da Febre Amarela

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do ciclo dos arbovírus. Adaptado de http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Arbor/schemat.pd	03
Figura 2. Estrutura esquemática dos vírus pertencentes à família <i>Flaviviridae</i>. Representação do nucleocapsídeo icosaédrico circundando o RNA viral. Os vírus apresentam um envelope derivado da membrana de células hospedeiras, além da glicoproteína E, uma proteína membrana M, rearranjada como homodímero e associada a E. Fonte: http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html	06
Figura 3. Organização genômica dos Flavivírus. O genoma dos Flavivírus possui aproximadamente 11.000 nucleotídeos, contém apenas uma fase aberta de leitura, a qual codifica uma única poliproteína e que é posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte: http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no4/petersenG1.htm	06
Figura 4. Estrutura dimérica da proteína E de vírus do dengue mostrando seus 3 domínios: em vermelho domínio I, em amarelo domínio II e em azul domínio III. Fonte: adaptado de Modis et al, 2005.....	09
Figura 5. Esquema das lâminas de IFI.....	29
Figura 6. Locais de coleta dos soros e material de SNC de equinos utilizados no estudo.	33
Figura 7. Esquema de uma placa de ELISA.	36
Figura 8 A, B, C, D, E e F. As Figuras A, B e C representam o resultado obtido utilizando-se o MIAF anti - <i>Alphavirus</i> ; as Figuras D e E representam o resultado obtido utilizando-se o MIAF anti – <i>Flavivirus</i> . A Figura F corresponde a células C6/36 infectadas com ROCV, nas quais o MIAF anti- ROCV foi utilizado, o controle-positivo do teste.	39
Figura 9. Placa de ELISA com amostras positivas para SLEV. A metade da placa correspondente ao número 1 mostra as cavidades contendo peptídeo recombinante de DIII de	

SLEV, com alguns soros que reagiram contra a proteína; a metade da placa correspondente ao número 2 mostra as cavidades contendo extrato bruto de *E. coli* purificado. 40

Figura 10. Soropositividade dos equinos para SLEV em cada um dos 5 estados que tiveram animais participando do estudo..... 43

Figura 11. Soropositividade dos equinos para WNV em cada um dos 5 estados que tiveram animais participando do estudo..... 44

Figura 12. Soropositividade dos equinos para ROCV em cada um dos 5 estados que tiveram animais participando do estudo..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de amostras positivas e a positividade para SLEV, ROCV e WNV segundo o estado de origem dos equinos.	41
Tabela 2. Número de animais sororeagentes monotípicos para SLEV, WNV e ROCV, em relação àqueles dos 5 estados de origem.	48
Tabela 3. Número de equinos com soropositividades monotípicas, e respectivas positivities, considerando apenas os animais sororeagentes, nos seus estados de origem.	49
Tabela 4. Número de animais com soropositividades cruzadas para SLEV/WNV, SLEV/ROCV, WNV/ROCV, SLEV/WNV/ROCV e respectivas positivities, considerando os estados de origem dos animais.	50
Tabela 5. Amostras monotípicas para SLEV, WNV ou ROCV, e seus respectivos títulos, considerando o estado de origem dos animais.....	51
Tabela 6. Título dos soros dos 10 animais de São Paulo, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.	52
Tabela 7. Título dos soros dos 10 animais do Mato Grosso do Sul, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.....	53
Tabela 8. Título dos soros dos 10 animais do Rio de Janeiro, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.....	54
Tabela 9. Título dos soros dos 10 animais da Paraíba, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arbovírus

Classificados como arbovírus (*arthropod borne viruses*), de forma eminentemente epidemiológica, agrupam-se vírus de diferentes famílias, mantidos em ciclos envolvendo vetores artrópodes e animais vertebrados (FIGUEIREDO, 2007). Os arbovírus mantêm-se na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos) que transmitem estes microorganismos quando se alimentam do sangue de animais vertebrados; o ciclo se completa quando novos artrópodes se alimentam de animais infectados com o vírus.

O Brasil é um país de grande extensão territorial, situado predominantemente nos trópicos, com áreas florestais situadas no Norte, Nordeste, Sudoeste e Sudeste, e possui uma grande diversidade de plantas e animais, as condições adequadas para a ocorrência de zoonoses causadas por arbovírus. Além disso, o país possui cerca de 190 milhões de habitantes, a maioria deles vivendo em áreas urbanas infestadas por mosquitos vetores, dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Devido à constante chegada de pacientes virêmicos infectados em áreas silvestres de transmissão, aumentam os riscos de ocorrência de surtos de infecção em áreas urbanas densamente habitadas (FIGUEIREDO, 2000; FIGUEIREDO, 2007).

Ciclo de transmissão dos arbovírus

Figura 1. Esquema do ciclo dos arbovírus. Adaptado de <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Arbor/schemat.pdf>

1.2. Flavivírus

Dentre os arbovírus, são importantes os *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que inclui cerca de 70 espécies, 40 delas associadas a doenças humanas e, algumas delas, são arboviroses emergentes no Brasil. Os Flavivírus são classificados, na sua maioria, em quatro ramos principais: Dengue (DEN), Complexo da encefalite por carrapatos (TBEC), Complexo da Encefalite Japonesa (JEC) e Febre Amarela (YF).

No Brasil já foram identificados onze Flavivírus: Bussuquara (BUSV), Cacipacoré (CPCV), Dengue (DENV) 1, 2, 3 e 4, Iguaçu (IGUV), Ilhéus (ILHV), Rocio (ROCV) Vírus da Encefalite de Saint-Louis (SLEV) e Febre Amarela (YFV). Por meio do seqüenciamento de 1000 nucleotídeos da terminação 3' do gene NS5 destes Flavivírus, constatou-se que os mesmos agrupam-se em três ramos principais: Dengue, com subdivisão nos tipos 1, 2 e 4, ramo JEC, incluindo SLEV, CPCV, BUSV, ROCV, ILHV, IGUV e o ramo da febre amarela

(BALEOTTI et al, 2003). Levantamentos sorológicos realizados no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, durante os anos 90, mostraram uma intensa circulação destes vírus. Foi encontrada uma prevalência de anticorpos contra Flavivírus de 12,6%, sendo que 2,2% eram para ILHV, 7,1% para SLEV e 3,3% para ROCV (ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000). Prevalência de 7,3% de anticorpos contra Flavivírus também foi encontrada em uma população da região de Ribeirão Preto, sendo que 2,6% eram anticorpos anti-SLEV. Uma paciente apresentou anticorpos neutralizantes contra ROCV (FIGUEIREDO et al, 1986).

Outro Flavivírus, o vírus Oeste do Nilo (WNV), ainda não foi detectado no Brasil, contudo sua presença no país é altamente provável devido à rápida dispersão do agente no continente americano. Com a presença de aves migratórias que, infectadas, carregam este vírus e chegam rotineiramente ao Brasil, já poderia ter havido introdução do agente no país. O vírus já foi detectado em cavalos na Colômbia e Argentina e sua dispersão para o Brasil é muito provável. Também, é possível que o WNV permaneça silencioso no Brasil, por causa da proteção imune cruzada de pássaros nativos previamente infectados por Flavivírus, ou pela falta de um vetor que se alimenta do sangue de pássaros, humanos e cavalos. Contudo, a emergência do WNV no país é muito provável, considerando a quantidade de pássaros migratórios provenientes do Hemisfério Norte que podem ser reservatórios do agente (FIGUEIREDO, 2007).

SLEV, ROCV e WNV, objetos de estudo neste trabalho, são antigenicamente relacionados formando um complexo com o vírus da encefalite japonesa. Ao infectarem o homem, tais vírus causam doença febril aguda além de doenças do sistema nervoso central (SNC), como meningoencefalite (BURKE e MONATH, 2001). O ROCV surgiu na década de 70, no Vale do Ribeira, SP e desapareceu espontaneamente, sendo desconhecidos os determinantes deste surto. Contudo, anticorpos anti-ROCV tem sido detectados em cerca de

5% da população do Vale do Ribeira e também, em outras regiões do Brasil (FIGUEIREDO et al, 1986; ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000; STRAATMAN et al, 1997). O isolamento de SLEV em seres humanos é raro, apesar da detecção do vírus em aves e mamíferos de diversas regiões do país. Entretanto, nos últimos anos, um surto de SLEV ocorreu concomitantemente a uma grande epidemia de dengue, na Cidade de São José do Rio Preto, SP (MONDINI et al, 2007). A falta de pesquisa diagnóstica sistemática e também a similaridade entre os sintomas da infecção por SLEV com os do dengue faz com que casos não estejam sendo diagnosticados. Portanto, a pesquisa de SLEV, WNV e, provavelmente, ROCV infectando equinos é de suma importância no estudo da circulação de tais vírus. Além disso, o cavalo pode ser hospedeiro de SLEV, WNV e provavelmente ROCV, transmitindo o vírus a novos vetores. Daí, a necessidade de se realizar levantamentos soro-epidemiológicos para estes vírus em cavalos, assim como tentativas de isolamento viral em casos de encefalite nestes animais, o que permitiria caracterizar estes agentes, e, ademais, conhecer a dispersão dos mesmos.

1.3. Estrutura, genoma e Replicação dos Flavivírus

Os Flavivírus são envelopados e têm morfologia esférica, medindo cerca de 40-60 nm de diâmetro. Possuem genoma de RNA de fita simples não segmentado e de polaridade positiva. Com 10,5 kb, este genoma é composto de uma região 5' não codificadora contendo 96 nucleotídeos, uma sequência ORF (*open reading frame*) contendo aproximadamente 10300 nucleotídeos, e um terminal 3' não codificador contendo 631 nucleotídeos. O genoma contém dez genes e segue a seguinte ordem: 5'- C- preM – E - NS1- NS2A - NS2B - NS3 - NS4A - NS4B - NS5 -3' (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004). Três desses genes codificam proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (preM) e do envelope (E),

localizados no terminal 5' do genoma viral. Os sete genes restantes (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) são de proteínas não estruturais, localizados no sentido 3' do genoma. As Figuras 2 e 3 ilustram a organização estrutural e genômica dos Flavivírus.

Figura 2. Estrutura esquemática dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*. Representação do nucleocapsídeo icosaédrico circundando o RNA viral. Os vírus apresentam um envelope derivado da membrana de células hospedeiras, além da glicoproteína E, uma proteína membrana M, rearranjada como homodímero e associada a E. **Fonte:** http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/24.html

Figura 3. Organização genômica dos Flavivírus. O genoma dos Flavivírus possui aproximadamente 11.000 nucleotídeos, contém apenas uma fase aberta de leitura, a qual codifica uma única poliproteína e que é posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

Fonte: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no4/petersenG1.htm>

Os Flavivírus se ligam a receptores específicos presentes na superfície de células hospedeiras, e entram por endocitose. No interior da vesícula endocítica, a redução do pH desencadeia mudança conformacional irreversível na proteína E, de dímero para trímero.

Esta alteração favorece a subsequente fusão do envelope à membrana endossomal da célula hospedeira e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Este evento é seguido pela tradução imediata, na região perinuclear, da molécula de RNA de fita simples, que codifica as proteínas estruturais e não-estruturais. Após a síntese de uma poliproteína de 3.300 resíduos de aminoácidos, as proteínas virais são individualizadas pela clivagem por proteases específicas. A síntese de proteínas viral está associada ao retículo endoplasmático rugoso. A morfogênese viral ocorre nas membranas do retículo e os *virions* são liberados por exocitose, através da via secretória do complexo de Golgi (MUKHOPADHYAY et al, 2005). Os Flavivírus podem replicar em uma grande variedade de células, de diferentes tecidos, dependendo do hospedeiro. Estes tecidos incluem neurônios, células gliais, células do baço, fígado, coração, linfonodos e pulmões (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

As proteínas não estruturais dos Flavivírus têm funções na replicação e montagem viral. NS1 e NS4A participam da replicação viral, NS2A está envolvida na liberação de *virions*, NS3 e NS2B têm atividades proteolíticas e NS5 atua como RNA polimerase e metil-transferase RNA-dependentes, participando da metilação da estrutura de 5'-CAP. Os *virions* imaturos são transportados através da via secretória da membrana celular onde ocorre a clivagem final da proteína prM por ação da furina, e são secretados por exocitose (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

A proteína C é a primeira proteína a ser sintetizada, possui peso molecular (PM) de aproximadamente 14 kDa e é capaz de interagir com o ssRNA viral. Trata-se de uma proteína de carga positiva e constitui-se em um componente estrutural do nucleocapsídeo, estando, também, envolvida na montagem da partícula viral (CHAMBERS et al., 1990).

O prM possui 22 kDa e após sofrer clivagem proteolítica específica durante a maturação viral origina a proteína M, com 8 kDa. A presença de prM parece ser necessária

ao correto dobramento da proteína E. A clivagem de prM em M precede a extrusão viral da célula hospedeira, pois não se observa prM em *virions* extracelulares e M parece ser essencial na organização da estrutura superficial e na infectividade do vírus (LORENZ et al., 2002).

A proteína E possui PM entre 51 e 60 kDa e forma projeções de 5 a 10nm, com terminações arredondadas de cerca de 2nm de diâmetro, ao longo da superfície externa do vírus. É a principal e maior proteína estrutural dos Flavivírus, sendo responsável por atividades biológicas do ciclo viral, tais como a montagem da partícula viral, a interação com receptores celulares e a fusão da membrana, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes e possuir atividade hemaglutinante (ZHANG et al, 2004).

1.4. O domínio III da proteína E

A proteína E é um dímero, formado por dois monômeros que, por sua vez, são divididos em três domínios distintos (I, II e III), distinguidos por cristalografia de raio-X e especificamente arranjados na estrutura terciária da proteína. O domínio I é a porção central da proteína, que possui sítios de N-glicosilação e é flanqueado de um lado pelo domínio alongado de dimerização (domínio II), no qual está localizado o peptídeo de fusão em sua porção terminal (MODIS et al , 2003; REY et al , 1995). O domínio II promove a dimerização e carrega as voltas que se inserem na membrana celular hospedeira durante a fusão viral dependente de pH. Na outra extremidade do domínio I está localizado o domínio III, a porção de E com maior protrusão na partícula viral e que contém os 100 aminoácidos C-terminais, os quais formam uma estrutura de β -barreiras semelhante à imunoglobulina. A Figura 4 mostra dímero de E e seus domínios (MODIS et al, 2005). O domínio III (DIII) contém sítios de ligação a receptores celulares e é altamente antigênico, pois consiste primariamente de

epítomos lineares, alvos de anticorpos neutralizantes (BEASLEY et al 2001; BEASLEY e BARRET, 2002; CRILL et al 2001).

Figura 4. Estrutura dimérica da proteína E de vírus do dengue mostrando seus 3 domínios: em vermelho domínio I, em amarelo domínio II e em azul domínio III. Fonte: adaptado de Modis et al, 2005.

Devido às características do DIII de E, o mesmo tem sido estudado como candidato ao desenvolvimento de vacinas de subunidade contra diversos Flavivírus. O DIII age como competidor do vírus, prevenindo a ligação do mesmo a receptores celulares, o que resulta na inibição da entrada do vírus (CHU et al, 2006). Além disso, devido à forte capacidade de indução de anticorpos neutralizantes, os DIII de diversos Flavivírus, especialmente o WNV, têm sido empregados em experimentos de imunização para gerar anticorpos neutralizantes que protejam camundongos em desafios contra o vírus em questão. As pesquisas são promissoras e os resultados indicam que DIII gera resposta imune celular de padrão Th1, com indução de anticorpos fortemente neutralizantes e que apresentam reatividade cruzada a outros Flavivírus (ALKA et al, 2007, BERNARDO et al, 2008; SHUKLA et al, 2009; WAHALA et al, 2009). Construções de proteínas tetravalentes, contendo os DIII dos quatro soro-tipos dos vírus de Dengue, também tem sido empregadas com sucesso em experimentos com camundongos imunizados. DIII protege os animais no desafio contra os

quatro sorotipos de DENV e até mesmo contra outros Flavivírus (CHEN et al, 2007; ETEMAD et al, 2008; LENG et al, 2009).

Devido à extensa reatividade cruzada entre Flavivírus relacionados, o diagnóstico sorológico pode ser impreciso, e o uso de proteínas de DIII recombinantes tem sido proposto como fonte de antígenos mais específicos. Utilizando DIII, em alguns casos, foi possível distinguir respostas específicas ao vírus em questão, daquelas contra outros Flavivírus relacionados, ou diferenciar respostas contra Flavivírus de diferentes sorocomplexos, como vírus TBE e *mosquito-borne* (DOS SANTOS et al, 2004; SHUKLA et al, 2009). Portanto, proteínas recombinantes de DIII produzidas em sistemas procarióticos, permitiriam padronizar ELISAs *in-house* com especificidade e sensibilidade comparáveis às de *kits* disponíveis no mercado (SHUKLA, 2009).

1.5. Patogênese das infecções no sistema nervoso central por Flavivírus

As infecções por Flavivírus são iniciadas após a inoculação viral na pele pela picada de um artrópode infectado. Os vírus, então, replicam nos tecidos locais e linfonodos regionais sendo transportados pelos vasos linfáticos até a corrente sanguínea. Esta replicação viral em tecidos extra-neurais aumenta os títulos virais no sangue precedendo a invasão do SNC (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

Os mecanismos de neuroinvasão não são bem conhecidos. Estes mecanismos podem envolver difusão passiva através do endotélio capilar, replicação viral nas células endoteliais do SNC, ou transporte retro-axonal dos vírus em neurônios infectados do epitélio olfatório. O transporte retro-axonal é considerado uma importante via de disseminação viral quando a infecção se dá por exposição a aerossóis. Também, a inoculação intranasal pode resultar em encefalite fatal, provavelmente pela infecção direta dos neurônios olfatórios e disseminação

através do trato olfatório para o cérebro (BURKE e MONATH, 2001; CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

O curso da infecção com doença de diferentes gravidades é dependente de fatores inerentes ao vírus e ao hospedeiro. Entre os fatores relacionados ao hospedeiro que podem ter influência na patogênese, os mais importantes são a idade, sexo, susceptibilidade genética, infecção preexistente ou imunidade a agentes heterólogos (BURKE e MONATH, 2001).

Um estudo recente estabeleceu a utilização de camundongos Balb/C para o estudo da patogênese da infecção pelo Flavivírus Rocio. Neste estudo, após inoculação intra-peritoneal de ROCV, os animais desenvolveram meningoencefalite, com paralisia ascendente, evoluindo para óbito. Observou-se que ROCV atravessa a barreira hematoencefálica, atingindo o SNC poucas horas após a infecção, sendo detectado no hipocampo e na medula espinhal. As alterações histopatológicas da meningoencefalite somente são visualizadas de 4 a 6 dias pós infecção. Uma vez no SNC, o ROCV infecta células endoteliais, macrófagos/monócitos, células da micróglia, astróglia e neurônios, culminando em degeneração neuronal e apoptose. Além disso, a meningoencefalite provocada por ROCV induz uma resposta imune mista, dos tipos Th1 e Th2 (BARROS, 2009).

1.6. Vírus Rocio (ROCV)

O ROCV foi primeiramente isolado em 1975, de um caso fatal em humanos ocorrido durante surto de encefalite no Vale do Ribeira, SP (LOPES et al, 1978). O surto começou em 1973 e terminou em 1980. Neste intervalo, notificaram-se 1021 casos de encefalite, com uma letalidade de 10%. Entre os sobreviventes, 200 desenvolveram seqüelas de equilíbrio ou motilidade. Os casos de encefalite por vírus na região, antes da epidemia, eram raros, sendo

registrados de 1970 a 1973 somente 5 óbitos por encefalite viral, enquanto que nos anos epidêmicos de 1976 a 1977 ocorreram 47 óbitos (IVERSSON, 1980).

Os sintomas da encefalite por ROCV são febre aguda, dores de cabeça, anorexia, náusea, vômitos, mialgia e mal-estar seguidos por sinais da encefalite como alterações do estado de consciência, convulsões, distúrbios de reflexo, deterioração de funções motoras, irritação da meninge e síndrome cerebelar (FIGUEIREDO, 2000).

Com base em isolamentos virais e dados sorológicos, acredita-se que o ROCV mantém-se em um ciclo envolvendo pássaros silvestres, incluindo algumas espécies migratórias e mosquitos vetores dos gêneros *Aedes* e *Psorophora*. O ROCV já foi isolado do pássaro *Zenothrichia capensis* e do mosquito *Psorophora ferox* (LOPES et al, 1981).

Muitos aspectos da epidemiologia do ROCV ainda permanecem desconhecidos, e não se sabe quais os fatores responsáveis pelo seu surgimento e desaparecimento no Vale do Ribeira. Sabe-se que a epidemia de ROCV mostrou picos de infecção em períodos de temperaturas mais elevadas e maior pluviosidade, coincidindo com o período de maior proliferação do vetor. Neste caso, a epidemia se deslocou em onda a partir de Iguape para Peruíbe e, a partir daí, em direção leste-oeste e leste-sudeste, rumo ao estado do Paraná. Além da transmissão por vetores artrópodes, outras possíveis formas de transmissão da doença teriam sido através de aerossóis ou manipulação de animais silvestres infectados. Os grupos populacionais que tiveram as formas mais graves da doença foram os de idade extrema ou que apresentavam piores condições de vida. Ademais, maior quantidade de anticorpos anti-ROCV foi encontrada em indivíduos que mantinham contato com ambientes silvestres (IVERSSON, 1980).

Depois do surto de ROCV, constataram-se evidências sorológicas de sua circulação no Vale do Ribeira e em outras partes do estado de São Paulo, como no município de

Ribeirão Preto, assim como em outras localidades do Brasil, o que indica dispersão do agente pelo país, especialmente em áreas rurais situadas no Nordeste e Sudeste do país (FIGUEIREDO, 2007; ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000; STRAATMANN et al, 1997). Durante o período de 1978 a 1990, anticorpos anti-ROCV foram encontrados em aves de distintas regiões do estado de São Paulo, indicando a dispersão e circulação do vírus nestas áreas (FERREIRA et al, 1994).

O desconhecimento sobre as causas do surgimento e desaparecimento do ROCV na epidemia de grave encefalite no Vale do Ribeira, aliado a evidências da circulação deste vírus em outros locais, faz com que ROCV continue sendo uma constante ameaça para reemergência no país, preocupando as autoridades de saúde pública (FIGUEIREDO et al, 1986; FERREIRA et al, 1994; IVERSSON, 1980; ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000; STRAATMANN et al, 1997). Finalmente, apesar da infecção por ROCV não ter sido evidenciada em equinos, conhecendo o relacionamento filogenético deste vírus com agentes que infectam cavalos, como SLEV e WNV, é possível inferir que a infecção por ROCV ocorra nestes animais e inclusive, a pesquisa nos mesmos possa indicar uma eventual re-emergência deste vírus.

1.7. Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)

O SLEV encontra-se amplamente distribuído nas Américas, desde o Canadá até a Argentina (MARLEENE et al, 2004; MATTAR et al, 2005; MORALES-BETOULLE et al, 2006; PUPO, 2006). Nos Estados Unidos tem caráter endêmico, sendo responsável por surtos que acometeram 5000 pessoas, desde 1955 (CHARREL et al, 1999; JOHNSON et al, 2005).

O primeiro SLEV isolado no Brasil foi obtido, em 1960, de um pool de *Sabethes belisarioi* capturado na rodovia Belém-Brasília. Posteriormente, este vírus foi isolado de

animais e artrópodes, na região amazônica e no estado de São Paulo (FIGUEIREDO, 2000). Os reservatórios conhecidos para o SLEV são pássaros silvestres, primatas, preguiças, tatus e marsupiais, enquanto que os vetores são *Culex declarator* e *C. coronator* (FIGUEIREDO, 2000). Pássaros migratórios, provavelmente, dispersam o vírus nas Américas, fato evidenciado pelo isolamento da estirpe brasileira SLEV68, ligada filogeneticamente a estirpes norte-americanas. A dispersão no Continente Americano tem causado algumas mutações no vírus, provavelmente, por infecções simultâneas de estirpes distintas, como foi observado no isolado SLEV Guatemala69, que mostrou no gene E uma combinação das sequências de nucleotídeos de estirpes argentinas e norte-americanas (FIGUEIREDO, 2007). Além disso, em estudo filogenético com sequências nucleotídicas incluindo distintas estirpes do SLEV, constatou-se que as mesmas agrupavam-se segundo origem geográfica (CHARREL et al, 1999).

O isolamento de SLEV no Brasil a partir de seres humanos é raro. Antes de 2004, o vírus fora isolado de apenas dois indivíduos, os quais apresentavam febre com icterícia, mas ausência de sinais neurológicos (MONDINI, 2007). Em 2004, o SLEV foi isolado de um paciente com doença febril aguda e que teve diagnóstico de dengue (ROCCO et al, 2005). Apesar dos raros isolamentos humanos, soroprevalências de anticorpos anti-SLEV da ordem de 5% tem sido observadas em populações das regiões Norte e Sudeste do Brasil (FIGUEIREDO, 2000; LOPES, 1979). Estes dados sorológicos têm que ser cuidadosamente analisados, uma vez que pode haver reação cruzada entre anticorpos de diversos Flavivírus, e a população é vacinada contra o vírus da febre amarela e/ou está exposta aos vírus do dengue (FIGUEIREDO, 2000). Também foi observada uma alta prevalência destes anticorpos em aves de distintas regiões do estado de São Paulo, indicando intensa circulação do vírus nestas localidades (FERREIRA et al, 1994). Estas evidências mostram

que o SLEV circula como uma zoonose pelo Brasil, infectando seres humanos. Entretanto, a maioria destas infecções, causando doença febril aguda auto-limitada ou meningoencefalite, são confundidas com outras viroses como o dengue ou permanecem não diagnosticadas (MONDINI et al, 2007).

As infecções por SLEV podem cursar com doença febril aguda que produz febre, dores de cabeça, mialgia e mal-estar. Alguns pacientes apresentam clínica sugestiva de meningoencefalite (JOHNSON et al, 2007). A letalidade por SLEV na América do Norte é de 5 a 20% (TSAI, 1989).

A emergência do SLEV passou a ser um fato preocupante no Brasil a partir da constatação do primeiro surto no país, detectado na cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo. O surto ocorreu concomitante a uma epidemia de dengue (DENV-3) que atingiu, aproximadamente, 15000 pessoas. Como o dengue é doença disseminada no Brasil, a alta prevalência de anticorpos anti-SLEV sugere que a infecção pelo vírus não é diagnosticada corretamente e sua importância é subestimada (MONDINI et al, 2007).

O Brasil não possui programa de vigilância epidemiológica para o SLEV e os profissionais de saúde não estão familiarizados com o diagnóstico deste vírus. Apesar da maioria das infecções serem sub-clínicas ou causarem doença de baixa gravidade, a possibilidade da ocorrência de surtos acompanhados de quadro neuro-invasivo não deve ser descartada. Estudos epidemiológicos são necessários para que se conheçam reservatórios animais e vetores nos surtos de SLEV, bem como a magnitude das infecções por este vírus no país. Neste sentido, inquéritos sorológicos para SLEV em cavalos poderiam detectar animais infectados em distintos locais e níveis, o que permitiria reconhecer a circulação viral, determinar locais onde isto ocorre, e com base na soropositividade destes animais, inferir o risco para a ocorrência de infecções humanas.

1.8. Vírus Oeste do Nilo (WNV)

O WNV não foi notificado no Brasil até o presente momento, mas sua introdução no país é alvo de crescente preocupação pelas autoridades sanitárias, especialmente devido à sua rápida disseminação pelas Américas.

O vírus foi primeiramente isolado do sangue de uma mulher febril no distrito de West Nile, Uganda, em 1937. Em 1957, a ocorrência de casos de encefalite em idosos de Israel foi a primeira indicação que o vírus poderia causar sérias infecções do SNC (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; KOMAR, 2003). Portanto, WNV é um vírus do Velho Mundo que foi introduzido nas Américas há pouco mais de uma década. A estirpe NY99 do WNV foi primeiramente isolada de um corvo morto nos Estados Unidos. Subsequentemente, o vírus foi isolado das carcaças de 22 outras espécies de pássaros coletadas entre agosto e novembro de 1999. Esta estirpe viral era, provavelmente, oriunda do Oriente Médio, mas, surpreendentemente, se adaptou rapidamente a um ciclo americano com distintos pássaros-reservatório e vetores (KOMAR, 2003; FIGUEIREDO, 2007). O WNV rapidamente se espalhou pelos Estados Unidos, e, em 2002, o surto explodiu, com mais de 4000 casos de encefalite e 284 mortes. Também, na ocasião, ocorreram 15000 casos de encefalite em cavalos e 16500 pássaros foram encontrados mortos (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; KOMAR, 2003).

Seis anos após a introdução, o WNV já se encontrava praticamente em toda a América do Norte e veio se movendo em direção ao sul, sendo detectado em 2001 nas ilhas Cayman, em 2002 na ilha de Guadalupe e no México, em 2003 e 2004 em El Salvador e Cuba, em 2005 em cavalos na Colômbia e, finalmente, em 2006 foi isolado do cérebro de dois cavalos com encefalite na Argentina e foi detectado na Guatemala (FARFÁN-ALE et al,

2006; MARLEENE et al, 2004; MATTAR et al, 2005; MORALES et al, 2006; MORALES-BETOULLE et al, 2006; PUPO et al, 2006).

O WNV, como os demais Flavivírus, é mantido em ciclos incluindo mosquitos e hospedeiros vertebrados. Nos Estados Unidos, os principais vetores são mosquitos *Culex pipiens*, *C. restuans*, *C. quinquefasciatus* e *C. tarsalis*, mas outras espécies podem, eventualmente, contribuir para a transmissão em locais específicos (FIGUEIREDO, 2007). Modos alternativos da transmissão do WNV incluem transmissão vertical e por contato direto entre hospedeiros vertebrados (contatos sexual, fecal-oral, oral, e aerossóis) na ausência de vetores artrópodes (KOMAR, 2003). Também, ocorre infecção por transfusão de sangue e transplantes (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004). Fatores de risco relacionados à infecção de cavalos por WNV incluem presença de vegetação, *habitat* de animais que manteriam o ciclo viral, distância do local onde vive o animal para uma ave morta por WNV, fatores geológicos (cavalos que vivem em menores altitudes estão mais propensos à infecção) e status da vacinação (MONGOHO et al, 2007).

A infecção por WNV causa um espectro de manifestações clínicas, desde infecções sub-clínicas até graves encefalites que levam à morte. Os sintomas mais comuns são febre, complicações gastrointestinais, dores de cabeça, fraqueza muscular, mal-estar, fadiga. São sintomas indicadores de maior gravidade episódios de apnéia, dor abdominal, mudanças sensoriais de foco, conjuntivite, linfadenopatia e paralisia facial (KOMAR, 2003). Em equinos, como nos seres humanos, ocorrem desde infecções assintomáticas até fatais. São sinais de encefalite nos cavalos: mudanças comportamentais (sonolência, apreensão, depressão ou hiperexcitabilidade), ataxia, paralisia das patas, tremores e rigidez da musculatura. (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; KOMAR, 2003). Em aves, igualmente,

a infecção pode ser de assintomática de fatal, e a mortalidade entre as aves infectadas é alta (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; KOMAR, 2003).

Os pássaros selvagens são os principais reservatórios do WNV, muitos deles aves migratórias, possível razão pela qual o vírus se disseminou tão rapidamente pela América (FIGUEIREDO, 2007). Como as aves desenvolvem alta viremia no sangue, os mosquitos, ao se alimentarem, podem infectar-se e transmitir o agente a demais hospedeiros suscetíveis (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; FIGUEIREDO, 2007). Mamíferos, incluindo humanos e cavalos, parecem não desenvolver níveis suficientes de WNV no sangue para infectar os mosquitos e a potencial contribuição destas espécies no ciclo viral ainda não está estabelecida (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; FIGUEIREDO, 2007). Pouco é conhecido acerca das manifestações clínicas da infecção por WNV em outros vertebrados, mas já foram documentadas infecções em roedores, porcos, gatos, cães, macacos, cabras, ovelhas, bois, coelhos, esquilos e morcegos (BLITVICH, 2003). Na América do Norte, constatou-se a morte de alguns crocodilos causada pela infecção por WNV, e anticorpos anti-WNV foram encontrados em crocodilos no México (FARFÁN-ALE et al, 2006; KOMAR, 2003).

O Brasil possui plenas condições para a introdução do WNV já que possui características ecológicas que favorecem a transmissão de arbovírus, além de aves que migram do Hemisfério Norte para o país. Portanto, abundam no país uma grande variedade de espécies de pássaros, incluindo alguns já classificados como reservatórios do WNV, como o *Passer domesticus*, nas áreas urbanas, e também vetores do gênero *Culex*. Apesar das condições propícias, em 2004, um levantamento sorológico de 5000 pássaros silvestres provenientes de diferentes regiões brasileiras, não detectou animais infectados com o WNV (FIGUEIREDO, 2007). De maneira semelhante, em um inquérito soro-epidemiológico

conduzido no estado de São Paulo com aves silvestres, capturadas nos anos 2005 e 2006, a presença de anticorpos anti-WNV não foi detectada, sugerindo a ausência do vírus no estado, e, possivelmente, no Brasil (FREITAS, 2010).

Importa ressaltar a possibilidade de que WNV chegue ao Brasil e não seja detectado. Isto poderia ocorrer devido a manifestações clínicas das infecções por WNV mais brandas que aquelas observadas na América do Norte devido ao contínuo contato de nossa população com outros Flavivírus. Também, faltam laboratórios capazes de diagnosticar esta virose e, ainda, a resposta imune cruzada de anticorpos do WNV para dengue, febre amarela vacinal ou outros Flavivírus poderia levar a diagnósticos sorológicos errados. Desta forma, WNV no Brasil pode se tornar uma zoonose diagnosticada somente em equinos.

Para a vigilância epidemiológica de WNV, além do exame de pássaros migratórios, faz-se necessário o diagnóstico em seres humanos e cavalos, principalmente em casos de infecção no SNC. O sistema de saúde pública deve estar alerta aos casos suspeitos e ser capaz de fazer exames diagnósticos, bem como oferecer tratamento adequado para a doença. Finalmente, inquéritos sorológicos para WNV em cavalos poderiam detectar animais infectados em distintos locais e níveis, o que permitiria reconhecer a introdução viral, determinar os locais onde isto ocorreu e com base na soropositividade destes animais, inferir o risco para a ocorrência de infecções humanas.

1.9. Diagnóstico das infecções por SLEV, ROCV e WNV

O diagnóstico das infecções por SLEV, ROCV e WNV pode ser feito por métodos sorológicos, pelo isolamento viral, e pela detecção do RNA viral por reação em cadeia pela polimerase, precedida por transcrição reversa (RT-PCR) (KITAI et al, 2007).

Os métodos sorológicos mais utilizados são testes para detecção discriminada de IgM e IgG por ELISA e imunofluorescência indireta (IFI). O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) e o de Inibição da Hemaglutinação (HI) também são utilizados (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; KITAI et al, 2007). O diagnóstico de infecções virais em soros de cavalos tem sido realizado por MAC-ELISA e ELISA-IgG (KLEIBOEKER, 2004).

O MAC-ELISA permite detectar IgM anti-vírus em soros ou líquidos, sendo realizado em microplacas. A detecção de IgM específico tem importante valor diagnóstico em infecções recentes, uma vez que anticorpos da classe IgM mantêm-se detectáveis por apenas três meses em equinos (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; PURDY et al, 2004). A detecção de IgG anti-vírus por ELISA tem sido usada para estudos de soroprevalência em equinos, por ser extremamente sensível e pelo fato da IgG persistir por, pelo menos, 15 meses, após a infecção (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

O PRNT, por ser o mais vírus-específico dentre os testes sorológicos, é utilizado para excluir ambiguidades produzidas por reações cruzadas entre soros de infectados por Flavivírus. Entretanto, este teste é muito laborioso e moroso, não sendo utilizado como método diagnóstico principal nos laboratórios (JOHNSON et al, 2007; MARTIN et al, 2002).

Uma técnica baseada em microesferas (Microsphere-based immunoassays – MIAs) tornou-se nos últimos anos opção de diagnóstico sorológico, já que o teste pode ser realizado com grande rapidez, simplicidade e acurácia permitindo diferenciar anticorpos específicos contra WNV e vírus da encefalite japonesa. Dessa maneira, diferencia infecções naturais daquelas por vacina com Flavivírus (JOHNSON et al, 2005; JOHNSON et al, 2007 ; WONG et al, 2003).

Mais recentemente, um ELISA por bloqueio de epítipo foi desenvolvido para diferenciar infecções por Flavivírus com base na pesquisa de anticorpos, pois reduz reações

cruzadas (BLITVICH et al, 2003; KITAI et al, 2007). A especificidade deste teste deve-se ao uso de anticorpos monoclonais (MAb) específicos para o antígeno viral em questão (KITAI et al, 2007). Além disso, o método permite detectar anticorpos anti-Flavivírus em diversas espécies de mamíferos (BLITVICH, et al 2003).

A IFI tem grande valor diagnóstico em amostras de aves, mas a preparação dos tecidos pode ser perigosa e consome muito tempo. Em amostras de mamíferos, o IFI mostrou mais reações inespecíficas que em aves devido à ligação não específica do MAb conjugado à fluoresceína (KAUFFMAN et al, 2003).

As tentativas de isolamento viral podem ser realizadas a partir do líquor, sangue, ou tecidos, em células Vero, RK-13 ou células de mosquito, além da inoculação em cérebro de camundongos recém-nascidos (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004). As células C6/36 de *Aedes albopictus* são tão suscetíveis à infecção por arbovírus quanto os camundongos recém-nascidos e, nelas, os vírus têm grande potencial de replicação, atingindo títulos comparáveis aos obtidos em cérebros de camundongo (WHITE, 1987).

A detecção do genoma viral em materiais clínicos pode ser realizada pela RT-PCR que é muito utilizada nas infecções por Flavivírus (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004). Uma técnica molecular, a NASBA, tem sido usada para detecção de RNAs virais. Por esta técnica, o produto final da amplificação é uma fita simples de RNA, que pode ser detectada via ensaio alvo-específico, de polaridade oposta, permitindo a identificação de diferentes Flavivírus (LANCIOTTI E KERST, 2001).

A técnica de Imuno-histoquímica é utilizada no processamento de tecidos (incluindo córtex, cerebelo, cérebro e medula) de casos fatais, visando à detecção específica do Flavivírus infectante pelo uso de MAb específicos (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

1.10. Prevenção, controle e tratamento das infecções equinas por SLEV, ROCV e WNV

Nos Estados Unidos, várias estratégias de vacinação foram planejadas para proteger cavalos contra a infecção por WNV, que incluem vacinas inativadas, vacinas de DNA, vacinas vivas atenuadas e vacinas vivas geneticamente modificadas (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004). Ainda, utiliza-se predominantemente a vacina de vírus inativado para imunização de equinos, porém, outros produtos recentes, como vacina recombinante Canarypox WNV, poderão se tornar importantes meios de prevenção da doença em cavalos (NG et al, 2003; CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; MINKE et al, 2004). No momento não existem vacinas licenciadas para ROCV e SLEV.

Uma importante medida de prevenção destas flaviviroses é o manejo de cavalos visando prevenir a exposição a mosquitos infectados. (MARLEENE et al, 2004)

Não há tratamento antiviral disponível para as infecções por SLEV, ROCV e WNV. Contudo, estudos com IFN α 2b e ribavirina, em casos de infecção por WNV, encontram-se em andamento, e a aplicação do primeiro mostrou propriedades defensivas e terapêuticas, impedindo a citotoxicidade viral, quando aplicada antes da infecção por WNV. A ribavirina mostrou-se somente defensiva, mas não terapêutica (ANDERSON, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Detectar infecções pelos Flavivírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), Rocio (ROCV) e Oeste do Nilo (WNV) em equinos.

2.2. Objetivos específicos

- Testar a aplicabilidade de um teste imunoenzimático (ELISA) indireto utilizando, como antígeno, peptídeos recombinantes do domínio III da proteína de envelope de ROCV, SLEV e WNV, em soros de equinos;
- Avaliar o nível de anticorpos em equinos do Brasil para os Flavivírus ROCV, SLEV e WNV;
- Tentar o isolamento viral em cultura de células e camundongos, a partir de material clínico oriundo de equinos com encefalite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tentativa de isolamento de *Flavivirus* em equinos

Para a tentativa de isolamento de vírus foram utilizadas amostras de tecido cerebral colhidas de onze equinos, com diagnóstico clínico de encefalite, com evolução fatal. Tais animais, oriundos de uma propriedade no estado da Paraíba, foram atendidos na Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UAMV/UFCG).

3.1.1. Preparo dos tecidos de Sistema Nervoso Central Infectante

As amostras de tecido cerebral colhidas dos equinos, cedidas pela Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UAMV/UFCG), foram mantidas em nosso laboratório à temperatura de -70°C. No momento de uso, fragmentos de tecido cerebral de cada animal, foram macerados em gral e suspensos na diluição de 1:5 (p/v) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,04M pH 7,4 e, a seguir, centrifugados a 9720 g, em rotor pendular de 87 mm de raio (Mikro22, Alemanha), a 4°C, durante 10 minutos, com posterior filtração do sobrenadante (filtro 0.22 µm). As suspensões, assim preparadas, foram utilizadas nos procedimentos de inoculação em camundongos recém nascidos (24 a 48 horas de vida) e em cultivo de células de mosquito C6/36.

3.1.2. Inoculação em camundongos

Para o início das inoculações, 25 µL da suspensão cerebral de cada equino, conforme preparada no item 3.1.1, foram inoculados pela via intracerebral em cada camundongo recém-nascido (24 a 48 horas de vida), pertencente a ninhadas de 6 animais. As inoculações foram realizadas com

auxílio de agulhas 0.38 x 13 27.5 G^{1/2} e seringa de 1 ml. Os animais, mantidos em gaiolas plásticas, isoladas e com ar filtrado, foram observados até o surgimento de sinais clínicos característicos de infecção viral, ou seja, tremores, paralisia dos membros posteriores, falta de coordenação motora e problemas de desenvolvimento, ou, na ausência dos mesmos, até o 10 dia pós-infecção (d.p.i.), quando foram submetidos à eutanásia e armazenados a -70°C.

3.1.3. Inoculação em células de mosquito C6/36

Células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 foram cultivadas em frascos de 25 cm³ contendo 5,0 mL de meio Leibowitz L15 (GIBCO, USA), 10% de soro fetal bovino inativado, 10% de caldo triptose fosfato, 100U/ml de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a 28°C em estufa umidificada. Após a confluência do tapete celular, 200 µl de cada uma das suspensões de tecidos cerebrais, preparadas conforme descrito no item 3.1.1., eram depositadas sobre a camada de células C6/36, após a retirada do meio de manutenção. Em seguida, os frascos foram mantidos sob agitação branda a cada 15 minutos para adsorção viral. Após 1 hora, o inóculo foi retirado e fez-se reposição do meio de cultura. As células foram observadas diariamente até o 7 d.p.i., para observação de efeito citopático, sendo posteriormente armazenadas a -70°C.

A confirmação da infecção viral foi realizada por meio do teste de imunofluorescência indireta (IFI) nas células C6/36 infectadas com cada uma das suspensões de macerados de cérebros. Células infectadas e não infectadas (controle negativo) foram removidas do frasco de cultura e

adicionadas a *spots* de lâminas de microscópio. As lâminas foram acondicionadas em estufa a 37°C para completa secagem das células, seguido de fixação das mesmas em acetona gelada, por 15 minutos. Foram adicionados aos *spots* das lâminas 10µL dos MIAFs (fluidos ascíticos imunes de camundongos), preparados conforme descrito no item 3.1.4. Em síntese, tais MIAFs eram constituídos de uma mistura de MIAFs específicos para *Flavivirus* (MIAFs de ROCV, SLEV, ILHV, CACV, IGUV) e outra mistura para *Alphavirus* (MIAFs de WEE - encefalite equina do oeste, VEE – encefalite equina venezuelana, EEE – encefalite equina do leste), na diluição 1:10 em PBS, seguido de incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, e lavagem com tampão PBS durante 10 minutos. O conjugado, constituído de imunoglobulina caprina anti-IgG de camundongo acoplada ao isotiocianato de fluoresceína (SIGMA, USA), foi, então, adicionado aos *spots* da lâmina, na diluição de 1:100, em solução de azul de Evans diluído a 1:10 em PBS. As lâminas foram mais uma vez incubadas durante 30 minutos em câmara úmida, lavadas com PBS por 10 minutos e, finalmente, com água destilada, por 1 minuto. Após completa secagem, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada e visualizadas com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leitz, Alemanha). Todas as lâminas continham controles-negativos correspondentes às células não infectadas e controles negativos dos MIAFs utilizados, conforme mostrado na Figura 5. Paralelamente, foram montadas lâminas controle-positivo, nas quais as células utilizadas foram infectadas com o ROCV, e a elas se acrescentou o seu respectivo MIAF.

Figura 5. Esquema das lâminas de IFI.

3.1.4. Produção de fluidos ascíticos imunes (MIAFs) de camundongos

Para a produção de fluidos ascíticos imunes de camundongos (MIAFs) foram utilizados, como fonte de antígeno, as estirpes virais padrões de referência, ROC/SPH 34675 (ROCV) e SLE/SpAn 11916 (SLEV), adaptadas a camundongos e a cultivo de células de mosquito (*Aedes albopictus* C6/36). Tais estirpes, inicialmente isoladas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (LOPES et al., 1978; LOPES et al., 1979), são mantidas no banco de vírus do CPV-FMRP-USP. Em síntese, camundongos jovens (*Mus-musculus* – variedade albino *Swiss*) foram inoculados pela via intra-peritoneal semanalmente, durante quatro semanas consecutivas, com 100µL de suspensão da estirpe viral padrão, propagada em cérebro de camundongos e diluída a 1:20 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. Na primeira imunização, a suspensão viral foi acrescida a 100µL de adjuvante completo de Freund, enquanto nas imunizações seguintes utilizou-se 100µL de adjuvante incompleto de Freund. Em seguida à última imunização, foram injetadas, pela via intra-peritoneal, células de Sarcoma 180/TG. Os camundongos foram observados diariamente até desenvolverem ascite volumosa, rica em anticorpos (MIAFs), a qual foi coletada, centrifugada a 9720

g, em rotor pendular de 87 mm de raio (Mikro22, Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente; os sobrenadantes obtidos foram armazenados - 20°C. Os MIAFs obtidos, homólogos específicos de ambas as estirpes virais, foram utilizados como soros sabidamente positivos nos ensaios sorológicos realizados. Vale ressaltar que, por se tratar de experimentação com animais, todos os experimentos realizados em camundongos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, conforme o número do processo 161/2008 (Anexo A).

3.2. Inquérito Sorológico

No inquérito sorológico em equinos, realizados por meio de reações imunoenzimáticas (ELISA), os antígenos utilizados consistiram de peptídeos recombinantes produzidos em *Escherichia coli* e contendo todo o domínio III da proteína E (rDIIIE) do ROCV, SLEV e WNV. Tais antígenos foram preparados no CPV-FMRP-USP pela Doutoranda Juliana Helena Chávez.

3.2.1. Amostras de Soros

Os soros de equinos utilizados no presente estudo foram obtidos por punção da veia jugular, por meio de agulhas 1.20 x 40 18 G 1^{1/2} e tubos plásticos de 15 mL, tendo sido cerca de 10 ml de sangue de cada animal. O sangue foi centrifugado a 210 g, durante 10 minutos à temperatura ambiente, e os soros obtidos foram transferidos para microtubos plásticos e armazenados a -20 °C, até o momento de uso.

No estudo foram utilizados 753 soros de cavalos, dos quais 183 eram provenientes do estado de São Paulo, 15 do estado de Minas Gerais, 267 do

estado do Mato Grosso do Sul, 200 da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN) do estado do Rio de Janeiro e 88 do estado da Paraíba.

Os soros do estado de São Paulo eram parte de uma soroteca obtida durante o desenvolvimento da tese de Doutorado da aluna Cristiane Baldani Ferreira, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), campus de Jaboticabal. Os cavalos utilizados no estudo eram assintomáticos e a coleta foi realizada em regiões próximas ao município de Jaboticabal, no ano de 2004, por meio de contato prévio da aluna com proprietários dos animais, que permitiram a sangria de tais animais para o estudo. Além destes, foram colhidos soros de outros 17 equinos sangrados no ano de 2009, pelo médico veterinário Thiago Demarchi Munhoz. Onze destes equinos pertenciam ao Hospital Veterinário Laudo Natel, da FCAV/UNESP, e seis ao Setor de Eqüinocultura da referida faculdade. Estes animais não participaram do estudo de 2004. A idade e raça dos animais não foram informadas. A relação dos equinos do estado de São Paulo participantes do estudo está mostrada no Anexo B.

Os soros do estado de Minas Gerais foram coletados pela veterinária Joice Lara Maia Faria, docente da Universidade de Uberaba. Tais materiais foram obtidos de cavalos desta Universidade, em aulas práticas do curso de Medicina Veterinária ministradas pela docente. Os cavalos participantes do estudo também eram assintomáticos. A idade, raça e sexo dos animais não foram informados. A relação dos equinos do estado de Minas Gerais participantes do estudo está mostrada no Anexo C.

Os soros do estado do Mato Grosso do Sul utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo médico veterinário Gustavo Puia Borges. A coleta

destes materiais é parte do programa de vigilância epidemiológica para o vírus da anemia infecciosa equina no estado. Os soros eram coletados e triados para este vírus, e, depois de seis meses, descartados. Os equinos participantes deste estudo de soro-prevalência residiam nos municípios de Aquidauana, Bonito, Anastácio, Bodoquena, Dois Irmãos do Buriti e Nioaque, localizados no Sul do estado. Tais animais residiam em fazendas e não apresentavam sinais clínicos sugestivos de infecção viral. A idade, raça e sexo dos animais não foram informados. A relação destes equinos está mostrada no Anexo D.

Os cavalos oriundos do Rio de Janeiro são parte da cavalaria da Academia Militar Agulhas Negras (AMAN), sediada no município de Resende. Os soros destes animais foram coletados pelo médico veterinário Otávio Augusto Brioschi Soares, e gentilmente cedidos para realização dos testes imunoenzimáticos deste estudo. Os animais da cavalaria eram sadios e não apresentavam sinais clínicos sugestivos de infecção viral. A idade e raça dos animais não foram informadas. A relação dos equinos do estado de Rio de Janeiro participantes do estudo está mostrada no Anexo E.

Os animais participantes do estudo, oriundos do estado da Paraíba, eram atendidos por médicos veterinários da UAMV/UFCG. Alguns destes animais chegaram à UAMV apresentando sinais clínicos relacionados a disfunções no Sistema Nervoso Central, como encefalite, paralisia, recumbência e tremores, enquanto outros eram assistidos pela equipe de médicos veterinários a pedido dos proprietários, sem, contudo, apresentarem sinais clínicos sugestivos de infecção. Estes cavalos pertenciam a fazendeiros residentes em diversos municípios próximos a Patos, onde a UAMV está localizada. Os soros destes animais foram gentilmente cedidos pela médica

veterinária Maria Luana Cristiny da Silva, aluna de Doutorado da referida Universidade. Os municípios de origem, as fazendas, o sexo, idade e utilidade do animal constam no Anexo F. Os animais participantes das tentativas de isolamento viral não tiveram seus soros colhidos, e, portanto, não participaram do estudo de soro- prevalência para SLEV, WNV e ROCV. A figura 6 mostra os locais de origem dos equinos participantes do estudo, e os respectivos locais de coleta dos soros.

Figura 6. Locais de coleta dos soros e material de SNC de equinos utilizados no estudo.

3.2.2. Reação Imunoenzimática (ELISA) para rDIII de SLEV, WNV e ROCV

3.2.2.1. Triagem dos soros equinos

Os testes imunoenzimáticos (ELISAs) utilizados na triagem dos soros de equinos foram inicialmente realizados em diluições únicas (1:100) dos soros testes, frente aos peptídeos recombinantes do domínio III (rDIIIE) das estirpes virais do ROCV, SLEV e WNV, conforme citado anteriormente. Para o teste, microplacas de poliestireno de fundo chato (CORNING, USA) foram sensibilizadas com rDIIIE purificados, na concentração de 300 ng, diluídos em solução tampão carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6 (diluição de 1:40 a partir da concentração bruta), na quantidade de 50 µL por cavidade. O controle-negativo de antígeno consistiu de extrato bruto de *Escherichia coli* não induzida, purificado, na diluição de 1:40 em solução tampão carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6. Incubou-se as microplacas para sensibilização por 48h, a 4°C em câmara úmida, e, após esse período, as mesmas foram lavadas 1 vez com PBS pH 7,4, acrescido de Tween20 a 0,05 % (PBST). Em seguida, adicionou-se a solução bloqueadora (leite em pó desnatado a 10% em PBST), 150 µL por cavidade, incubando-se as microplacas durante 2 horas a 37 °C, e lavando-as novamente com PBST por 4 vezes. Posteriormente, adicionaram-se a cada cavidade das microplacas 50µL dos soros de cavalo em teste, na diluição padrão (1:100). O diluente dos soros e conjugado foi o mesmo utilizado no bloqueio das microplacas. Cada soro foi adicionado em duplicata às cavidades sensibilizadas com o antígeno, bem como às cavidades correspondentes ao controle-negativo. Como controle-positivo foram utilizados MIAFs vírus-específicos ao rDIIIE do teste, na diluição de 1:100. Para os testes realizados com rDIIIE de WNV, utilizou-se o MIAF anti-SLEV, que apresentou

reatividade ao peptídeo. Em seguida, incubou-se as microplacas em câmara úmida por 1 hora, a 37 °C . Após esse período, as microplacas eram novamente lavadas com PBST, durante 4 vezes. Em seguida, adicionaram-se 50 µL, a cada cavidade das microplacas, de imunoglobulina anti-IgG de cavalo, produzida em coelhos, conjugada à peroxidase (SIGMA, USA) na diluição 1:2000. Nas cavidades correspondentes aos controles-positivos, contendo MIAF, foi utilizada imunoglobulina caprina anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (SIGMA, USA) na diluição 1:2000, 50 µL por cavidade. Após incubação em câmara úmida por 1 hora a 37°C e 4 lavagens com PBST, 100 µL da solução reveladora ABTS (KPL,USA) foram adicionados às cavidades das microplacas, seguindo-se de uma incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida por adição de 100 µl de solução SDS (dodecil sulfato de sódio)10% a todos os orifícios da placa. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Titertek Multiscan, Flow, Finlândia) no comprimento de onda de 405nm. O ponto de corte das reações foi calculado a partir da média dos controles negativos somados ao valor do desvio padrão multiplicado por 3. Soros com valores de absorbância maiores que o ponto de corte foram considerados positivos. O esquema de uma microplaca preparada para este ELISA é mostrado na Figura 7.

Figura 7. Esquema de uma placa de ELISA.

3.2.2.2. Titulação das amostras positivas

Para titulação das amostras positivas, os testes de ELISA foram realizados conforme descrito anteriormente, utilizando os soros de cavalo diluídos a 1:100, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. Todas as titulações foram realizadas em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados dos testes de isolamento viral

4.1.1. Resultados dos testes de isolamento viral em camundongos

Nenhum dos camundongos, das 11 ninhadas inoculadas com amostras de SNC colhidas de equinos oriundos do estado da Paraíba, apresentou sinais de infecção no SNC, ou seja, tremores, paralisia dos membros posteriores, falta de coordenação motora e hipo-desenvolvimento.

4.1.2. Resultados dos testes de isolamento viral em células C6/36

Das onze amostras de tecido cerebral colhidas de equinos e submetidas ao teste de isolamento viral em culturas de células C6/36, nenhuma induziu a formação de efeito citopático nas culturas empregadas. Quando submetidas ao IFI, em nenhuma cultura foi observada a presença de vírus detectável (Figura 8).

Figura 8 A, B, C, D, E e F. As Figuras A, B e C representam o resultado obtido utilizando-se o MIAF anti - *Alphavirus*; as Figuras D e E representam o resultado obtido utilizando-se o MIAF anti – *Flavivirus*. A Figura F corresponde a células C6/36 infectadas com ROCV, nas quais o MIAF anti- ROCV foi utilizado, o controle-positivo do teste.

4.2. Resultados do inquérito sorológico

4.2.1. Resultados dos testes sorológicos por Reação Imunoenzimática (ELISA) para rDIII de SLEV, WNV e ROCV em soros de equinos

Do total de 753 amostras de soros de equinos testadas, oriundas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraíba e Mato Grosso do Sul, 412 (54,7%) foram positivas para SLEV, WNV e ROCV. Destas, 271 (36%) amostras foram positivas para SLEV, 255 (33,9%) amostras foram positivas para WNV e 144 (19,1%) foram positivas para ROCV. A Figura 9 ilustra uma placa com amostras positivas para SLEV obtida no ELISA.

Figura 9. Placa de ELISA com amostras positivas para SLEV. A metade da placa correspondente ao número 1 mostra as cavidades contendo peptídeo recombinante de DIII de SLEV, com alguns soros que reagiram contra a proteína; a metade da placa correspondente ao número 2 mostra as cavidades contendo extrato bruto de *E. coli* purificado.

Na tabela 1 estão sumariados os números de amostras positivas para cada vírus estudado, e as positivities segundo o estado de origem.

Tabela 1. Número de amostras positivas e a positividade para SLEV, ROCV e WNV segundo o estado de origem dos equinos.

UF	SLEV			WNV			ROCV		
	N	Positivos	%	N	Positivos	%	N	Positivos	%
SP	183	55	30%	183	53	29%	183	16	8,8%
MG	15	3	20%	15	----	----	15	----	----
MS	267	140	52,4%	267	95	35,6%	267	63	23,6%
RJ	200	41	20,5%	200	67	33,5%	200	34	17%
PB	88	32	36,4%	88	40	45,5%	88	31	35.2%
Total	753	271	36%	753	255	33,9%	753	144	19,1%

4.2.2. Equinos sororeagentes para SLEV

Dentre 753 animais estudados, 271 foram sororeagentes para SLEV, o que corresponde a uma positividade de 36%, conforme mostrado na Tabela 1.

De 271 animais sororeagentes para SLEV, 140 foram do estado do Mato Grosso do Sul, o maior número, seguido dos sororeagentes observados nos estados de São Paulo, com 55, Rio de Janeiro, com 41, Paraíba, com 32, e Minas Gerais, com 3.

Os percentuais de positividade em cada estado mostraram maior prevalência de animais sororeagentes no Mato Grosso do Sul (52,4%), seguido dos estados da Paraíba (36,4%), São Paulo (30%), Rio de Janeiro (20,5%) e Minas Gerais (20%). As positivities referentes aos estados de origem dos animais estão apresentadas na Figura 10.

Figura 10. Soropositividade dos equinos para SLEV em cada um dos 5 estados que tiveram animais participando do estudo.

4.2.3. Equinos sororeagentes para WNV

Dentre 753 animais participantes do estudo, 255 foram sororeagentes para WNV, uma positividade de 33,9%, conforme mostrado na Tabela 1.

Dos 255 animais sororeagentes para WNV, 95 foram do estado do Mato Grosso do Sul, com maior número de animais sororeagentes, seguido por aqueles observados nos estados do Rio de Janeiro, com 67, São Paulo, com 53, Paraíba, com 40 e Minas Gerais, que não teve animais sororeagentes.

Em relação aos animais dos 5 estados, houve maior positividade para WNV no estado da Paraíba, com 40 animais sororeagentes de 88 estudados (45,5%), seguido dos estados

do Mato Grosso do Sul (35,6%), Rio de Janeiro (33,5%), São Paulo (29%) e Minas Gerais, onde não foram obtidos animais sororeagentes. Positividades referentes aos estados de origem dos animais são mostradas na Figura 11.

Figura 11. Soropositividade dos equinos para WNV em cada um dos 5 estados que tiveram animais participando do estudo.

4.2.4. Equinos sororeagentes para ROCV

Dentre 753 animais estudados, 144 foram sororeagentes para ROCV, positividade de 19,1%, conforme mostrado na Tabela 1.

De 144 equinos que apresentaram anticorpos reagentes para ROCV, 63 foram do estado do Mato Grosso do Sul, com maior número de animais sororeagentes, seguido dos estados do Rio de Janeiro, com 34 animais, Paraíba, com 31 animais, São Paulo, com 16 animais, e Minas Gerais, que não teve animais sororeagentes.

Em relação aos animais oriundos de cada estado, houve maior número de sororeagentes para ROCV no estado da Paraíba, com 31 positivos dentre 88 (35,2%), seguido dos estados do Mato Grosso do Sul (23,6%), Rio de Janeiro (17%), São Paulo (8,7%) e Minas Gerais, onde não houve animais sororeagentes (Figura 12).

Figura 12. Soropositividade dos equinos para ROCV em cada um dos 5 estados que tiveram animais participando do estudo.

4.2.5. Equinos com soropositividade monotípica para SLEV, WNV ou ROCV

Do total de 753 equinos participantes do estudo, 216 (28,9%) animais reagiram com positividade monotípica para SLEV, WNV ou ROCV. Destes, 93 animais tiveram soros que reagiram com positividade monotípica para SLEV (12,4%), 77 reagiram com positividade monotípica para WNV (10,2%) e 46 reagiram com positividade monotípica para ROCV (6,1%).

Dentre os 93 animais cujos soros reagiram de maneira monotípica para SLEV, 18 foram do estado de São Paulo, de um total de 183 (9,8%); 3 foram do estado de Minas Gerais, de um total de 15 (20%); 56 foram do estado do Mato Grosso do sul, de um total de 267 (21%); 12 foram do estado do Rio de Janeiro, de um total de 200 (6%); 4 foram do estado da Paraíba, de um total de 88 (4,5%). Da mesma forma, dentre os 79 animais cujos soros reagiram de maneira monotípica para WNV, 18 foram do estado de São Paulo, de um total de 183 (9,8%); 19 foram do estado do Mato Grosso do Sul, de um total de 267 (7,1%); 34 foram do estado do Rio de Janeiro, de um total de 200 (34%); 6 foram do estado da Paraíba, de um total de 88 (6,8%). Ainda, dentre os 46 animais cujos soros reagiram de maneira monotípica para ROCV, 8 foram do estado de São Paulo, de um total de 183 (4,4%); 13 foram do estado do Mato Grosso do Sul, de um total de 267 (4,9%); 13 foram do estado do Rio de Janeiro, de um total de 200 (6,5%); 12 foram do estado da Paraíba, de um total de 88 (13,6%). Estes dados são apresentados na Tabela 2. Na Tabela 3 estão apresentados as positivities monotípicas considerando, apenas, os animais sororeagentes, em cada estado de origem. O percentual de soros que reagiram de maneira monotípica para SLEV, em relação aos soros reagentes totais para o vírus, foi de 34,3%. A positividade monotípica observada para o WNV, em relação aos soros reagentes totais para o vírus, foi de 30,2%. Para o ROCV, foi observada uma porcentagem de 32% de soros com reatividade monotípica, considerando os soros positivos totais obtidos para o vírus.

Tabela 2. Número de animais sororeagentes monotípicos para SLEV, WNV e ROCV, em relação àqueles dos 5 estados de origem.

UF	SLEV			WNV			ROCV		
	N	Positivos	%	N	Positivos	%	N	Positivos	%
SP	183	18	9,8%	183	18	9,8%	183	8	4,4%
MG	15	3	20%	15	---	---	15	---	---
MS	267	56	21%	267	19	7,1%	267	13	4,9%
RJ	200	12	6%	200	34	17%	200	13	6,5%
PB	88	4	4,5%	88	6	6,8%	88	12	13,6%
Total	753	93	12,4%	753	77	10,2%	753	46	6,1%

Tabela 3. Número de equinos com soropositividades monotípicas, e respectivas positivities, considerando apenas os animais sororeagentes, nos seus estados de origem.

UF	SLEV			WNV			ROCV		
	N	Positivos	%	N	Positivos	%	N	Positivos	%
SP	55	18	32,7%	53	18	34%	16	8	50%
MG	3	3	100%	---	---	---	---	---	---
MS	140	56	40,3%	95	19	20%	63	13	20,7%
RJ	41	12	29,3%	67	34	50,7%	34	13	38,2%
PB	32	4	12,5%	40	6	15%	31	12	38,7%
Total	271	93	34,3%	255	77	30,2%	144	46	32%

4.2.6. Equinos com soropositividade cruzada para SLEV, WNV ou ROCV

Dos 753 equinos estudados, 196 (26%) exibiram algum tipo de soropositividade cruzada entre os Flavivírus SLEV, WNV e ROCV. As reações cruzadas ocorreram entre SLEV/WNV, SLEV/ROCV, WNV/ROCV ou SLEV/WNV/ROCV. De 753 animais, 98 (13%) foram sororeagentes para SLEV e WNV, 18 (2,4%) para SLEV e ROCV ou WNV e ROCV e 62 (8,2%) foram positivos para os 3 vírus, SLEV, WNV e ROCV

Na Tabela 4 estão apresentadas as positivities das reações sorológicas cruzadas segundo os estados de origem dos animais (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Paraíba).

Tabela 4. Número de animais com soropositividades cruzadas para SLEV/WNV, SLEV/ROCV, WNV/ROCV, SLEV/WNV/ROCV e respectivas positivities, considerando os estados de origem dos animais.

UF	SLEV/WNV			SLEV/ROCV		WNV/ROCV		SLEV/WNV/ROCV	
	N	+	%	+	%	+	%	+	%
SP	183	29	15,9%	2	1,1%	---	0	6	3,3%
MG	15	---	---	---	---	---	0	0	0
MS	267	39	14,6%	13	4,9%	5	1,9%	32	12%
RJ	200	15	7,5%	3	1,5%	7	3,5%	11	5,5%
PB	88	15	17%	---	---	6	6,8%	13	14,8%
Total	753	98	13%	18	2,4%	18	2,4%	62	8,2%

4.2.7. Títulos séricos para SLEV, WNV e ROCV dos animais positivos

Nos testes realizados com soros de animais que exibiram reação monotípica, para qualquer dos três vírus, as titulações foram realizadas utilizando somente o antígeno correspondente. Nas titulações dos soros de animais que exibiram reações cruzadas, utilizaram-se todos os antígenos para os quais reagiram cada um destes soros.

4.2.7.1. Titulação dos soros de animais positivos com reação monotípica para SLEV, WNV ou ROCV

Dos soros de 216 animais que reagiram de forma monotípica para SLEV, WNV ou ROCV, 84 foram escolhidos aleatoriamente para serem titulados. Destes, 28 foram escolhidos por apresentarem reações monotípicas para SLEV, 28 para WNV e 28 para

ROCV. Estas titulações, considerando o estado de origem dos animais, são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Amostras monotípicas para SLEV, WNV ou ROCV, e seus respectivos títulos, considerando o estado de origem dos animais.

UF	SLEV		WNV		ROCV	
	N	Título	N	Título	N	Título
SP	6	100	7	100	5	100
					1	400
MG	3	100	----	----	----	----
MS	7	100	3	100	1	100
	1	400	1	400	3	400
	1	800	2	800	2	800
RJ	2	100	8	100	2	100
	3	400	1	400	2	400
	1	800		800	1	800
					2	1600
PB	2	100	5	100	7	100
	1	400	1	400	2	400
	1	800				
Total	28		28		28	

4.2.7.2. Titulação dos soros de animais positivos com reação cruzada entre SLEV, WNV e ROCV, segundo o estado de origem

Dentre os 196 animais cujos soros apresentaram reações cruzadas entre os 3 Flavivírus analisados (SLEV/WNV, SLEV/ROCV, WNV/ROCV ou SLEV/WNV/ROCV), 10 em cada estado de origem foram escolhidos, aleatoriamente, para titulação. Estes títulos séricos são mostrados nas Tabelas 6, 7, 8 e 9, segundo os estados de origem dos animais. Não se observaram reações cruzadas nos soros dos animais de Minas Gerais.

Tabela 6. Título dos soros dos 10 animais de São Paulo, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.

Amostras / tipo de reação cruzada	Título SLEV	Título WNV	Título ROCV
84 (SLEV/ROCV)	100	-----	800
87 (SLEV/ROCV)	100	-----	800
24 (SLEV/WNV)	400	100	-----
71 (SLEV/WNV)	400	100	-----
HV-17 (SLEV/WNV)	400	100	-----
94 (SLEV/WNV)	100	100	-----
17 (SLEV/WNV/ROCV)	800	400	400
19 (SLEV/WNV/ROCV)	400	400	100
23 (SLEV/WNV/ROCV)	100	100	800
49 (SLEV/WNV/ROCV)	100	100	800

Tabela 7. Título dos soros dos 10 animais de Mato Grosso do Sul, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.

Amostras / tipo de reação cruzada	Título SLEV	Título WNV	Título
54 (SLEV/ROCV)	100	-----	100
143 (SLEV/ROCV)	100	-----	400
38 (SLEV/WNV)	800	100	-----
134 (SLEV/WNV)	1600	400	-----
13 (WNV/ROCV)	-----	100	800
159 (WNV/ROCV)	-----	400	100
24 (SLEV/WNV/ROCV)	100	100	400
41(SLEV/WNV/ROCV)	1600	400	100
123 (SLEV/WNV/ROCV)	800	100	100
152 (SLEV/WNV/ROCV)	1600	100	100

Tabela 8. Título dos soros dos 10 animais do Rio de Janeiro, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.

Amostras / tipo de reação cruzada	Título SLEV	Título WNV	Título ROCV
4 (SLEV/ROCV)	100	-----	400
68 (SLEV/ROCV)	100	-----	400
26 (SLEV/WNV)	100	100	-----
50 (SLEV/WNV)	100	100	-----
101 (WNV/ROCV)	-----	400	800
130 (WNV/ROCV)	-----	100	1600
180 (WNV/ROCV)	-----	100	800
8 (SLEV/WNV/ROCV)	100	400	100
72 (SLEV/WNV/ROCV)	100	400	100
98 (SLEV/WNV/ROCV)	800	1600	100

Tabela 9. Título dos soros dos 10 animais da Paraíba, que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV. Ao lado de cada número de identificação dos animais especificou-se o tipo de reação cruzada ocorrida.

Amostras / tipo de reação cruzada	Título SLEV	Título WNV	Título ROCV
12 (SLEV/ WNV)	100	100	400
25 (SLEV/ WNV)	800	100	-----
45 (SLEV/WNV)	400	100	-----
32 (WNV/ROCV)	-----	100	-----
80 (WNV/ROCV)	-----	400	100
62 (WNV/ROCV)	-----	100	800
35 (SLEV/WNV/ROCV)	400	800	400
36 (SLEV/WNV/ROCV)	800	800	100
41 (SLEV/WNV/ROCV)	1600	400	100
75 (SLEV/WNV/ROCV)	100	100	100

5. DISCUSSÃO

As arboviroses, que são mantidas na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes e vertebrados, também, são um importante problema de saúde pública no Brasil. Mosquitos se infectam com estes vírus ao se alimentarem do sangue de animais infectados e transmitem-nos a animais suscetíveis. Dentre os arbovírus mais importantes ressaltam-se os Flavivírus. Estes podem ser classificados em quatro ramos principais: o ramo no qual estão agrupados os vírus do dengue dos sorotipos 1, 2, 3 e 4, o ramo da febre amarela, o ramo dos transmitidos por carrapatos e causadores de encefalite e o ramo dos vírus associados ao da encefalite Japonesa (JEV). Onze Flavivírus já foram identificados no Brasil (DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, CACV, BUSV, IGUV, ILHV, ROCV, SLEV e YFV). No caso dos SLEV, ROCV e WNV, que se agrupam no complexo antigênico com o vírus da encefalite japonesa e são causadores de surtos de doença febril aguda, bem como de meningoencefalites, o ciclo é mantido entre Culicídeos e aves, mas, incidentalmente, estes mosquitos podem transmitir os vírus a mamíferos, principalmente seres humanos e cavalos (FIGUEIREDO, 2007). Várias espécies de Culicídeos, gênero *Culex*, são vetores de Flavivírus, dentre as quais *C. tritaeniorhynchus*, *C. annulirostris*, *C. perexiguus*, *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *C. salinarus* e *C. restuans* (KOMAR, 2003). Outras espécies de Culicídeos que podem atuar como potenciais vetores são *Ochlerotatus triseriatus*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (BLITVICH, 2008; ROCHLIN et al, 2009; SEBASTIAN et al, 2008). *Cx. pipiens* e *Cx. restuans*, predominantemente ornitofílicos, são amplificadores de WNV e SLEV, e podem ocasionalmente se alimentar do sangue de mamíferos, transmitindo os vírus aos mesmos, enquanto *Cx. salinarus* é predominantemente mamalofílico, e

reconhecidamente, é um vetor competente do WNV e SLEV (KOMAR, 2003). Em regiões epizooticas de WNV em cavalos, há alta prevalência de *Cx. pipiens* infectados com o vírus, e tais mosquitos são responsáveis pela transmissão a estes animais (SEBASTIAN et al, 2008). Em outros estudos, foi encontrada uma alta quantidade de *C. salinarius* e *C. quinquefasciatus* em regiões onde a presença do WNV foi caracterizada em equinos (BLITVICH, 2008; ROCHLIN et al, 2009). Entretanto, espécies do gênero *Aedes* e *Ochlerotatus* são apontadas como maiores vetores de Flavivírus, pois são ornitofílicos e mamalofílicos (LEFRANÇOIS et al, 2006). De fato, *Ochlerotatus* é vetor competente de ROCV e considerado como um dos principais vetores de arboviroses no Brasil (MITCHELL e FORATINNI, 1984). Todos estes vetores, mesmo os que são predominantemente ornitofílicos, podem se alimentar do sangue de cavalos e, portanto, transmitir os vírus a estes animais (ROCHLIN et al, 2009). Cavalos são altamente suscetíveis à infecção por Flavivírus e extremamente sensíveis, apresentando sinais clínicos característicos de encefalite, como ataxia, fasciculações musculares, paralisia facial e dos membros, recumbência, hiper-agitação, hipertermia e comportamentos anormais (WARD et al, 2006).

Portanto, reconhecendo que equinos se infectam por flaviviroses transmitidas por *Culex*, supusemos que estes animais poderiam ser bons alvos para a detecção de SLEV, WNV e possivelmente, ROCV. Assim, neste trabalho, buscamos por evidências destas infecções utilizando 2 abordagens. Primeiramente, procurando pelos vírus por isolamento viral em casos de meningoencefalite. Tentaram-se estes isolamentos em materiais clínicos do SNC de 11 cavalos com encefalite, porém, sem sucesso. As tentativas de isolamento foram realizadas por inoculação em camundongos e células de

mosquito, para garantir que, caso houvesse vírus viáveis, os mesmos seriam isolados. Sabe-se que o isolamento em camundongos é considerado teste padrão-ouro e que células C6/36 são altamente suscetíveis à infecção por Flavivírus (FIGUEIREDO, 1990; LENDEL e WHITE, 1987). Porém, mesmo assim, ambos os resultados foram negativos. Por outro lado, as condições de coleta e armazenamento dos materiais utilizados para isolamento viral foram desconhecidas e neste caso, a degradação das partículas virais pode ter ocorrido, impossibilitando o isolamento. Também, sabe-se que os sinais clínicos da encefalite por SLEV e WNV em cavalos são indistinguíveis daqueles causados por outros agentes etiológicos. Assim, causas comuns de encefalite equina incluem Herpesvírus Equino do tipo 1, doença de Borna, raiva, Mieloencefalite Equina Protozoal, Encefalite Equina do Leste (EEE), Encefalite Equina do Oeste (WEE) e Encefalite Equina Venezuelana (VEE) (EPP et al, 2007b; LEBLOND et al, 2007, NELSON et al, 2004) Além disso, outras doenças do SNC em cavalos podem ser resultado de trauma, envenenamento, hepatoencefalopatia ou instabilidade cervical. Em um estudo realizado na França, de 72 casos suspeitos de encefalite equina causada por WNV, somente 32 (44%) tiveram a confirmação desta infecção, ressaltando que o vírus sabidamente circula no país e é causador comum da doença em equinos; nos demais cavalos não foi possível estabelecer o diagnóstico definitivo (LEBLOND et al, 2007). Em verdade, o diagnóstico de cavalos com desordens neurológicas representa um desafio aos veterinários e ocorre em aproximadamente 50% dos casos, principalmente porque o tempo envolvido e os custos podem ser fator de dissuasão para os proprietários. Muitos deles não encaminham seus animais, ou só os encaminham na fase aguda da doença,

quando dificilmente há recuperação dos cavalos, que morrem por causa da doença ou têm que ser submetidos à eutanásia (EPP et al, 2007b; KNOTTENBELT et al, 1996; TROCK et al, 2001, WARD et al, 2006). Todos estes fatores envolvidos dificultam ou atrasam o diagnóstico dos animais. Mesmo em cavalos submetidos à infecção experimental por WNV, não é possível observar lesões histológicas nos tecidos do cérebro, cerebelo, medula oblongata e medula espinhal por técnicas de histopatologia e imunohistoquímica (SHIRAFUJI et al, 2009). Neste caso, os materiais podem ter sido retirados quando os vírus não estavam mais presentes nestes tecidos. A técnica de RT-PCR, apesar de altamente específica e sensível, é capaz de detectar a presença viral somente nos estágios iniciais da infecção (período de viremia), antes do aparecimento de sinais clínicos suspeitos, portanto sua sensibilidade diagnóstica em cavalos clinicamente afetados é baixa (KLEIBOEKER et al, 2004). No presente estudo, considerando os aspectos aqui citados, os resultados negativos não descartam a possibilidade de infecção viral, entretanto os vírus, na ocasião da colheita do material, poderiam não estar mais presentes nos tecidos obtidos. Ainda, apesar dos resultados negativos, deve-se ressaltar que a vigilância de animais doentes é um fator preditivo relevante da circulação de Flavivírus, servindo de alerta para possíveis eventos epidêmicos que venham a ocorrer na região onde habitam os cavalos (LEBLOND et al, 2007; NIELSEN et al, 2008).

Como segunda parte do presente trabalho, procurou-se pela infecção pregressa por WNV, SLEV e ROCV nos equinos em um inquérito soro-epidemiológico, no qual os soros foram analisados por ELISA, desenvolvido em nosso laboratório, e que utiliza, como antígeno, o domínio III da proteína de

envelope destes vírus. Deste inquérito participaram 753 equinos, os quais, de maneira interessante, exibiram alta soropositividade para os 3 vírus, conforme passamos a discutir.

Apesar do monitoramento de cavalos com encefalite ser um bom método preditivo de infecções causadas por Flavivírus, a pesquisa sorológica nestes animais é mais indicada, pois, assim como ocorre em seres humanos, as infecções em cavalos são, na grande maioria, assintomáticas, o que impossibilita avaliar a real circulação dos vírus em áreas onde os animais estão presentes (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; KOMAR, 2003). O ELISA é um método rápido, eficaz e pouco laborioso, adequado à realização de grandes triagens séricas (HOBSON-PETERS et al, 2008). Os ELISAs mais utilizados em equinos visam à pesquisa de IgM e IgG anti-Flavivírus (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004). O ELISA de IgM é um método sensível, indicado para diagnóstico de cavalos clinicamente afetados, uma vez que a suspeita de infecção recente possibilita a busca de IgM no soro. Entretanto, os anticorpos tipo IgM têm curta duração nestes animais (cerca de 2 meses) e portanto, esta técnica não é adequada para estudos de soro-prevalência em cavalos assintomáticos ou que foram clinicamente afetados, mas não foram prontamente diagnosticados. Considerando isto, ELISA de IgG foi o método escolhido para o presente estudo pois, ao contrário do ELISA de IgM, possibilita a detecção de anticorpos tipo IgG de longa duração, o que permite diagnosticar infecções ocorridas no passado, assintomáticas ou não diagnosticadas, e, portanto, mostra-se útil para um inquérito soro-epidemiológico.

Anticorpos tipo IgG são detectados em soros de cavalos mesmo após longo tempo após a infecção e a busca pelos mesmos mostra-se uma útil ferramenta no estudo da epidemiologia de infecções causadas por Flavivírus (LEFRANÇOIS et al, 2006; EPP et al, 2007a). Em estudo realizado na França, onde soros de cavalos foram testados para WNV pelo ELISA de IgG, uma alta soro-positividade deste anticorpo foi observada (34%). Contudo, quando estas amostras positivas foram submetidas ao ELISA de IgM, somente pequena proporção de IgM-soropositivos foi obtida (7,5%), o que indica a curta persistência deste anticorpo após a infecção, nos cavalos (DURAND et al, 2005).

Do total de 753 cavalos analisados por IgG-ELISA para SLEV, WNV e ROCV, 412 foram positivos, o que representa uma soropositividade de 54,7% dos animais. A alta soropositividade encontrada para estes Flavivírus está acima da média de outros estudos de soro-prevalência, nos quais foram encontrados valores de 10% a 30% em cavalos e aves analisados (ALLONSO-PADILLA et al, 2009; BOSCH et al, 2007; DIAZ et al, 2008a; DURAND et al, 2005; KOMAR et al, 2005; LOROÑO-PINO et al, 2010; MATTAR et al, 2005; PUPO et al, 2006; ULLOA et al, 2003). Soropositividades elevadas, de 50% ou mais, foram encontradas, na grande maioria dos casos, em áreas onde ocorreram epidemias ou epizootias por Flavivírus (EPP et al, 2007a; KOMAR et al, 2001; SEBASTIAN et al, 2008). Entretanto, o inquérito sorológico em equinos realizado na ilha de Cozumel, México, em 2004, onde, aparentemente, não haviam ocorrido epidemias ou epizootias por Flavivírus, 62,5% dos animais analisados tinham anticorpos contra Flavivírus (FARFÁN-ALE et al, 2006). No Brasil, poucos inquéritos em equinos foram realizados buscando por infecções

pregressas por Flavivírus. Em 2 destes trabalhos observaram-se soropositividades de aproximadamente 25% (IVERSSON et al, 1993; SILVA et al, 1999). Somente um trabalho, realizado no Pantanal em 2009, apontou uma soropositividade de 44,8% para Flavivírus em equinos, indicando de forma similar ao presente estudo, uma alta distribuição destes vírus nos animais (RODRIGUES et al, 2010). A soropositividade observada indica, portanto, que pode estar havendo uma alta circulação de Flavivírus acometendo cavalos nos cinco estados analisados. Os resultados, também, sugerem que tais infecções podem estar sendo subestimadas devido à ausência de sinais clínicos apresentados por estes animais.

O ELISA desenvolvido no CPV-FMRP-USP, utilizando o domínio III da proteína de envelope de SLEV, WNV e ROCV mostrou-se uma ferramenta útil no presente estudo. O domínio III da proteína do envelope viral é altamente antigênico e alvo de anticorpos neutralizantes, sendo, por isso, um bom candidato para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas (BEASLEY e AASKOV, 2001; BEASLEY e BARRET, 2002; CRILL e ROEHRIG, 2001). O uso de subunidades da proteína E, notadamente o DIII, aumenta a especificidade dos testes sorológicos, permitindo a identificação de infecções causadas por diferentes Flavivírus (BEASLEY et al, 2004; HERRMANN et al, 2007; HOBSON-PETERS et al, 2008). Em cavalos, foi demonstrado que o epítipo T332, localizado no domínio III da proteína E de WNV, é alvo de anticorpos em cavalos naturalmente infectados pelo vírus. Além disso, a remoção de anticorpos anti-DIII dos soros destes animais reduz a capacidade neutralizante para o vírus (SANCHÉZ et al, 2006). Ainda, utilizando a proteína E como antígeno em um ELISA, observou-se uma alta correlação dos

resultados do teste com os obtidos com outro teste, considerado altamente específico, o teste de neutralização por redução de plaques (PRNT). Portanto, naquele trabalho, foi possível distinguir infecções causadas por WNV de outras causadas por diferentes Flavivírus, em soros de cavalos naturalmente infectados e vacinados (MAGNARELLI et al, 2008). Todos estes trabalhos ilustram as evidentes qualidades antigênicas do DIII da proteína E de Flavivírus e a sua adequada aplicação em testes diagnósticos, o que corrobora os resultados obtidos neste estudo, no qual o ELISA desenvolvido mostrou-se uma técnica sensível, detectando IgG contra os 3 vírus estudados, nos soros de animais previamente infectados.

O SLEV, por anos, foi raramente detectado a causar infecções humanas no Brasil. Porém sua possível emergência foi evidenciada no interior do Estado de São Paulo, onde um surto de SLEV ocorreu concomitantemente a uma epidemia de dengue, sugerindo que infecções podem ocorrer e ser erroneamente diagnosticadas, subestimando a importância do vírus (MONDINI et al, 2007). Dentre os cavalos sororeagentes para Flavivírus, 271 (36%) foram sororeagentes para SLEV, conforme ilustrado na Tabela 1. A maior parte dos sororeagentes foi encontrada no estado do Mato Grosso do Sul (140 animais), que também respondia pelo maior número de amostras, em relação aos demais estados. Contudo, Mato Grosso do Sul, além de ser o estado com maior número de sororeagentes, também exibiu a maior soropositividade em relação às amostras totais obtidas no estado (52,4%), seguido dos estados da Paraíba (36,4%), São Paulo (30%), Rio de Janeiro (20,5%) e Minas Gerais (20%), conforme ilustra a Figura 10. Em inquérito prévio, realizado em cavalos do Pantanal, Mato Grosso do Sul, ficou evidenciada uma alta soropositividade

para Flavivírus, e o maior número de animais sororeagentes possuíam anticorpos anti-SLEV, 21.81% (RODRIGUES et al, 2010). Estes resultados corroboram as evidências de alta circulação do SLEV no Mato Grosso do Sul observadas no presente estudo. Notadamente, o estado de Minas Gerais só apresentou animais sororeagentes para SLEV e não para WNV ou ROCV. Entretanto, poucos inquéritos soro-epidemiológicos foram realizados no Brasil buscando por anticorpos anti-SLEV, e dentre estes, somente alguns analisaram equinos (FERREIRA et al, 1994; FIGUEIREDO et al, 1986; IVERSSON et al, 1993; RODRIGUES et al, 2010; ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000; SILVA et al, 1999). Um destes estudos apontou animais sororeagentes para SLEV, enquanto outro não detectou estes anticorpos nos cavalos (IVERSSON et al, 1993; SILVA et al, 1999). Também, buscando por infecções por SLEV em outras espécies animais, inquérito sorológico para Flavivírus em aves do Estado de São Paulo mostrou uma maior soropositividade para SLEV em relação a outros Flavivírus (12,5%), sugerindo uma alta circulação deste vírus no estado (FERREIRA et al, 1994). No continente americano, diversos estudos de vigilância epidemiológica foram realizados com cavalos, buscando pela infecção por SLEV nestes animais. No México, foi encontrada uma soropositividade de 10% para SLEV em aves, cavalos e gado, entretanto, avaliando-se a somente os equinos, constatou-se uma soropositividade de 60% (ULLOA et al, 2003). É importante salientar que este inquérito foi realizado em uma região de floresta com pouca influência antrópica, assim como a região onde os soros dos animais do Mato Grosso do Sul foram obtidos, no bioma do Pantanal. No trabalho mexicano, concluiu-se que o vírus estaria circulando na região e infectando equinos devido às condições ecológicas favorecedoras da

proliferação de vetores. Porém, em outros estudos, observaram-se nula ou baixa soro-prevalência de anticorpos anti-SLEV em cavalos, o que sugere, naqueles locais, uma eventual manutenção viral endêmica em ciclos envolvendo primordialmente aves (BOSCH et al, 2007; MARLENEE et al, 2004; NELSON et al, 2003; PUPO et al, 2006). É importante ressaltar que pombos da espécie *Zenaida auriculata* são hospedeiros e potenciais amplificadores de SLEV, o que poderia contribuir para infecções ocorridas em ambientes urbanos e peri-urbanos, já que estas aves estão amplamente distribuídas nestes locais (DIAZ et al, 2008b). Em suma, os resultados observados no presente estudo sugerem que no Brasil esteja ocorrendo uma intensa circulação de SLEV, já que houve animais sororeagentes em todos os estados analisados e esta informação deve servir como um relevante fator de alerta para os profissionais da saúde, já que o Brasil não possui programa de vigilância epidemiológica voltado para este vírus.

A segunda maior soropositividade observada neste estudo ocorreu para o WNV. Trata-se de um vírus causador de encefalites e associado a *Culex*, que foi introduzido no continente americano em 1999, mas ainda não foi detectado no Brasil. Sua presença no país, contudo, é muito provável, já que o vírus se dispersou por praticamente todo o Continente Americano e já foi isolado mais ao Sul, na Argentina (MORALES et al, 2006). O Brasil, além de ser destino de aves migratórias provenientes do Hemisfério Norte, detém condições ecológicas e climáticas que favoreceriam a manutenção do WNV em ciclos zoonóticos, bem como a abundante presença dos vetores urbanos (BLITVICH, 2008; FIGUEIREDO, 2000; KOMAR e CLARK, 2006; RAPPOLE et al, 2000). No presente estudo, dentre os animais sororeagentes para Flavivírus, 255

(33,9%) foram para WNV, conforme ilustrado na Tabelas 1. O maior número de sororeagentes foi encontrado, novamente, no estado do Mato Grosso do Sul. Entretanto, apesar de ser o estado com maior número de positivos, a prevalência de animais infectados relativa a cada estado foi maior no da Paraíba, com 45,5% de animais sororeagentes, seguido pelos estados do Mato Grosso do Sul (35,6%), Rio de Janeiro (33,5%) e São Paulo (29%), como ilustra a Figura 11. Este é o primeiro estudo brasileiro que evidencia a introdução do WNV no país. Desde sua introdução no continente americano, o WNV se dispersou em direção à América do Sul, sem, contudo, ser detectado no Brasil. Nos Estados Unidos, país onde foi introduzido, o WNV se moveu no rumo sul até atingir a América Latina. O caminho migratório do vírus pôde ser seguido. Nos anos seguintes à sua introdução, o WNV foi detectado na Jamaica, Guadalupe, República Dominicana, México, El Salvador, Guatemala, Bahamas, Belize, Porto Rico, Cuba, Colômbia, Venezuela e Argentina (KOMAR e CLARK, 2006). No entanto, no Brasil não se observaram casos da febre do WNV ou evidência sorológicas de sua circulação (ARAÚJO et al, 2004; RODRIGUES et al, 2010, FREITAS, 2010). Desde sua introdução na América, o WNV foi responsável por várias epizootias envolvendo aves e, principalmente, cavalos, que foram seriamente afetados nos Estados Unidos, com cerca de 20000 casos de encefalite até o ano de 2005 (GERHARDT, 2006). Equinos, por serem altamente suscetíveis à infecção e por desenvolverem sinais clínicos mais frequentemente que os seres humanos, são uma forma de monitorar a circulação do WNV, servindo como alerta para o iminente surgimento de casos humanos (CORRIGAN et al, 2006; LEBLOND et al, 2007; NIELSEN et al, 2008; WARD e SCHUERMANN, 2008). Por outro

lado, a infecção por WNV, por resultar em alta mortalidade nos cavalos, tornou-se uma importante doença veterinária. Na América do Norte, fatores de risco que contribuem para a alta letalidade em cavalos já foram identificados, como, animais machos, com idade entre 8 e 14 anos, com coloração clara do pêlo e pernoitando em lugares desprotegidos (EPP et al, 2007b; SEBASTIAN et al, 2008).

As soropositividades observadas no presente estudo, com exceção do estado do Paraíba (45,5%) estão em concordância com as relatadas em estudos similares realizados em outros países. No México, relataram-se soropositividades de 15%, 22,7%, 25% e 31,6%, sendo que a última refere-se a cavalos assintomáticos para a doença (ALLONSO-PADILLA et al, 2009; LOROÑO-PINO et al, 2010; MARLENEE et al, 2004; ULLOA et al, 2009). Na França, a soropositividade de cavalos para WNV foi de 34% (DURAND et al, 2005). Analisando a infecção por WNV em outras espécies, na Argentina, a soropositividade de aves, migratórias e residentes, foi de 25,6% (DIAZ et al, 2008a). Em outros países da América do Sul, como Colômbia, Cuba e Venezuela, foram encontradas soropositividades menores em cavalos, de 9%, 9% e 4,3%, respectivamente (BOSCH et al, 2007; MATTAR et al, 2005; PUPO et al, 2006).

Soropositividades elevadas para WNV, como a encontrada neste estudo, no estado da Paraíba, 45,5%, são frequentemente observadas em locais com eventos epizooticos de WNV, como em Guadalupe, onde relataram-se 50% de animais sororeagentes, no ano de 2002, no ápice de uma epizootia. No Canadá, relataram-se 58% de sororeagentes em áreas de epizootia do vírus (EPP et al, 2007a; LEFRANÇOIS et al, 2006). Entretanto, nestes locais, o

monitoramento dos cavalos permitiu detectar animais clinicamente afetados, situação que não condiz com a dos equinos da Paraíba, que eram, na grande maioria, assintomáticos. Por outro lado, infelizmente, os cavalos sintomáticos, dos quais materiais clínicos de SNC foram submetidos a tentativas de isolamento viral, não participaram do inquérito sorológico para WNV, já que soros destes animais não foram disponibilizados. Em suma, nossos resultados indicam uma alta circulação de WNV no estado. Este resultado é semelhante ao obtido por FÁRFAN-ALE et al, 2006, que constatou a infecção por WNV em 58,3% dos animais assintomáticos analisados no México. Pode-se inferir que a alta prevalência de animais sororeagentes na Paraíba reflete a presença de aves migratórias, que partem do Hemisfério Norte e América Central pela rota das Ilhas Caribenhas/ Atlântico Norte, carreando o vírus até o continente sul-americano. Entre os destinos destas aves estão as regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, o que explicaria as maiores soropositividades encontradas nos estados da Paraíba e do Mato Grosso do Sul (RAPOLLE et al, 2000).

Em estudo realizado na Espanha, observou-se que a maior proporção de aves soropositivas para WNV encontrava-se entre aquelas com padrão de migração de longa distância, que, provavelmente, são infectadas na África durante o inverno europeu, e retornam à Europa durante o verão (LÓPEZ et al, 2008). Entretanto, estes dados devem ser cuidadosamente analisados, pois, existe a possibilidade destas aves terem sido infectadas localmente e de que aves virêmicas não conseguiriam completar o processo de migração e portanto, não carregariam o vírus ao local de destino (KOMAR e CLARK, 2006). Mesmo assim, as regiões costeiras representam localizações ideais para a

introdução do WNV, seguindo-se pela disseminação viral (PRADEL et al, 2009).

Em contraste às altas soropositividades para WNV encontradas na Paraíba e Mato Grosso do Sul, em São Paulo houve a menor proporção de cavalos sororeagentes, excluindo-se o estado de Minas Gerais, onde nenhum animal soropositivo foi encontrado. Alguns trabalhos apontam áreas cultivadas, como fator redutor das infecções por WNV em cavalos, provavelmente, devido ao menor número de animais nestas áreas, ou ao fato destas áreas não sustentarem populações de mosquitos vetores em nível adequado à transmissão do vírus para estes animais (WARD et al, 2009; PRADEL et al, 2009). Os animais participantes do estudo habitavam locais próximos a áreas de cultivo de cana-de-açúcar, que são apontadas como ambiente protetivo à infecção por WNV, o que poderia explicar o menor número de animais sororeagentes no estado de São Paulo (PRADEL et al, 2009).

Todos estes resultados apontam a circulação do WNV no Brasil, já que grande número de equinos sororeagentes para o vírus foram encontrados. Podemos exemplificar com um resultado oposto. Na Polônia, onde o WNV não foi introduzido, um inquérito soro-epidemiológico realizado em equinos não detectou a presença de animais sororeagentes e isto reforçou a idéia de que o vírus não chegou ao país (HUBÁLEK et al, 2008). As evidências da circulação do WNV no Brasil não existiam até então, mas os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a idéia de que o vírus foi introduzido, do contrário animais sororeagentes não seriam encontrados.

O ROCV causou uma epidemia no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, na década de 70, causando encefalite em cerca de 1000 indivíduos,

com uma letalidade de aproximadamente 10%. Contudo, este vírus desapareceu de maneira desconhecida, apesar da existência de evidências sorológicas da sua circulação em humanos e aves do estado de São Paulo e outras regiões do Brasil (FERREIRA et al, 1994; FIGUEIREDO et al, 1986). No presente estudo, foram encontrados 144 animais sororeagentes (19,1%) para ROCV, conforme apresentado na Tabela 1. A maior parte dos sororeagentes foi novamente observada no estado do Mato Grosso do Sul. A maior soropositividade relativa às amostras de cada estado foi obtida no estado da Paraíba, onde 35,2% dos animais foram sororeagentes para ROCV, seguido dos estados do Mato Grosso do Sul (23,6%), Rio de Janeiro (17%) e São Paulo (8,7%), como ilustra a Figura 12. Desde a epidemia de ROCV no Vale do Ribeira, São Paulo, estudos de soro-prevalência para este vírus foram realizados em seres humanos e aves, mas nenhum em cavalos (FERREIRA et al, 1994; FIGUEIREDO et al, 1986; LOPES et al, 1978; ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000; STRAATMAN et al, 1997). Estes estudos apontaram baixas soroprevalências de anticorpos anti-ROCV, que dificilmente ultrapassam 5%. Como o ROCV é um vírus associado a *Culex*, esperar-se-ia pela infecção em cavalos, como observado para WNV e SLEV. Portanto inquéritos sorológicos nesta espécie seriam uma útil ferramenta de vigilância epidemiológica. Ainda, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os trabalhos que relatam menor soropositividade para ROCV em comparação a SLEV (FERREIRA et al, 1994; ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000).

Também, no caso do ROCV, foi observado um maior número de animais sororeagentes no estado da Paraíba. Apesar do vírus originalmente ter sido detectado no estado de São Paulo, há evidências de sua circulação no estado

da Bahia, o que sugere uma possível dispersão do agente para a região Nordeste do Brasil (STRAAATMAN et al, 1997). Os resultados de animais sororeagentes da Paraíba corroboram a idéia da circulação do ROCV nesta região. Além disso, a presença de animais sororeagentes nos demais estados analisados sugere a dispersão do agente no país, o que corrobora trabalhos semelhantes, nos quais anticorpos anti-ROCV foram encontrados em seres humanos e aves não residentes na região do Vale do Ribeira (FERREIRA et al, 1994; FIGUEIREDO et al, 1986). Neste sentido, pode-se inferir a dispersão do ROCV por aves migratórias, visto que estudos mostram anticorpos contra o vírus nestes animais (FERREIRA et al, 1994). Entretanto, não há evidências sorológicas da circulação do ROCV em outros países da América Latina, onde a presença de vários Flavivírus é detectada (ULLOA et al, 2003; MATTAR et al, 2005).

De 412 animais sororeagentes, 216 reagiram com especificidade monotípica para SLEV, WNV ou ROCV, sugerindo, nestes casos, uma maior confiabilidade quanto ao vírus infectante, pela ausência de reações cruzadas. As positivities monotípicas para SLEV, WNV e ROCV foram de 12,3%, 10,2% e 6,1%, respectivamente. Sabe-se que reações cruzadas em testes sorológicos podem comprometer o diagnóstico em animais e seres humanos, já que a positividade pode não refletir a infecção ocorrida. Por isso, várias técnicas foram desenvolvidas para aumentar a especificidade dos diagnósticos (JOHNSON et al, 2007; MARTÍN et al, 2002; PURDY et al, 2004; WONG et al, 2003). É interessante observar que, no presente estudo, houve maior número de sororeagentes monotípicos em comparação aos sororeagentes com reações cruzadas, o que sugere uma alta especificidade do ELISA

desenvolvido com peptídeos do DIII de SLEV, WNV e ROCV. Dentre as reações monotípicas, foi possível observar alto número (46 animais – 32%) de animais com soropositividade monotípica para ROCV, como mostra a Tabela 3. ROCV, mesmo estando relacionado antigenicamente aos vírus do Complexo da Encefalite Japonesa, associados a *Culex*, está agrupado em um clado diferente daquele do SLEV, o que indica uma certa disparidade genética entre os dois vírus (BALLEOTI et al, 2003). Tal disparidade reflete-se em maior discrepância no peptídeo do DIII de E do ROCV em relação aos do SLEV e WNV, mais relacionados. Possivelmente, isto teria influenciado os resultados de ELISA obtidos para ROCV, conferindo maior especificidade de ligação dos anticorpos anti-ROCV em comparação aos anti- SLEV e WNV. Tal especificidade resultou em grande número de sororeagentes monotípicos e isto ocorreu, particularmente, em São Paulo, sugerindo que o vírus, ainda, poderia estar circulando no estado onde surgiu.

Com relação ao WNV, as reações monotípicas, inclusive, em 5 animais, com título igual ou maior que 400, corroboram o achado geral da soropositividade para este vírus por sugerir especificamente que o mesmo ou outro Flavivírus muito proximamente relacionado, estariam circulando e causando as infecções nestes locais. O maior número de equinos sororeagentes monotípicos ocorreu no Rio de Janeiro, 50,7%. Já no estado da Paraíba, onde a soropositividade geral era maior para WNV, pôde-se constatar que somente 15% dos animais eram sororeagentes monotípicos para o vírus.

Na titulação das amostras monotípicas para os vírus, pôde-se observar que uma grande parte atingiu, somente, o título de 100. SANCHÉZ et al, 2006, demonstraram que baixos títulos de IgG nos soros de cavalos naturalmente

infectados com WNV refletem uma menor proporção de anticorpos contra regiões do DIII da E viral, anticorpos com baixa afinidade de ligação ou presença de anticorpos direcionados contra a estrutura tridimensional da proteína E, presente na partícula viral. Entretanto, os baixos níveis de IgG não estavam correlacionados com perda de atividade neutralizante. Os autores concluíram que, em alguns cavalos, frações de anticorpos contra outros componentes do vírus são importantes na atividade neutralizante, enquanto que, em outros animais, a resposta contra o DIII era robusta, induzindo altos níveis de IgG. Portanto, a diferença nos títulos de anticorpos dos animais sororeagentes, variou de 100 a 1600, o que parece estar relacionado a diversos fatores, como, a época em que ocorreu a infecção e a aspectos inerentes à resposta imune do próprio animal.

De 412 animais sororeagentes, em 196 foi possível observar reações cruzadas entre os três Flavivírus analisados. As reações cruzadas no ELISA já eram esperadas, visto que alguns epítomos do DIII de E são conservados entre os vírus (WONG et al, 2003). Os títulos séricos de 40 animais, escolhidos aleatoriamente para a titulação e que apresentaram reações cruzadas entre SLEV, WNV e ROCV, estão apresentados nas Tabelas 6, 7, 8 e 9. Nelas, é possível observar que, na maioria dos casos, títulos 8 vezes mais elevados foram obtidos para somente um dos vírus avaliados, indicando que o mesmo seria o infectante do animal. Entretanto, algumas reações cruzadas nas quais grandes diferenças nos títulos não foram observadas, poderiam ser consequência de múltiplas infecções por Flavivírus. Experimentos feitos com cavalos imunizados pela vacina de JEV inativada, mostraram que a infecção subsequente com WNV aumentava grandemente os títulos de anticorpos

contra JEV, os quais, inclusive, eram muito maiores que aqueles observados para WNV. Portanto, após infecção primária causada por um Flavivírus, a infecção secundária, causada por outro vírus relacionado, age como desafio e anticorpos contra o primeiro vírus infectante são produzidos em altos teores (SHIRAFUJI et al, 2009). Com a titulação das amostras que apresentaram reações cruzadas, não é possível estabelecer com quantos Flavivírus o animal teria se infectado ao longo da vida, mas é possível inferir que o cavalo foi infectado com o vírus para o qual ele apresenta títulos de anticorpos 8 vezes mais elevados.

Cavalos são altamente suscetíveis a infecções por Flavivírus por diversas razões, mas, principalmente, devido à exposição a vetores no período da noite, quando os mesmos se alimentam e pela preferência de alguns mosquitos por se alimentarem do sangue de grandes mamíferos (EPP et al, 2007b; PRADEL et al, 2009; ROCHLIN et al, 2009). Outros fatores de risco estão associados à presença da zoonose no local de habitação dos animais, o que poderia estar associado à temperatura, vegetação, locação dos animais próximos a rios ou cursos de água e à presença de mosquitos infectados (MONGOHO et al, 2007; PRADEL et al, 2009; SEBASTIAN et al, 2008; WARD et al, 2009). Altas temperaturas estão associadas a um aumento no risco de infecção de cavalos por Flavivírus devido à maior proliferação do vetor e diminuição do tempo do ciclo replicativo dos vírus no vetor (MONGOHO et al, 2007; PRADEL et al, 2009; WARD et al, 2009). Como a maior parte do território brasileiro apresenta altas temperaturas o ano inteiro, isso poderia favorecer a amplificação e transmissão destes vírus aos cavalos. A presença de cursos de água, também, é um fator de risco para infecção em cavalos, pois parte do

ciclo reprodutivo dos mosquitos ocorre na água (MONGO et al, 2007; NIELSEN et al 2008; PRADEL et al, 2009; ROCHLIN et al, 2009; WARD et al, 2009). Os equinos do estado do Mato Grosso do Sul habitavam a região do bioma Pantanal, onde existem muitos rios e cursos de água, especialmente na estação da cheia e isso pode ter contribuído para a grande circulação de Flavivírus infectando estes animais, que foi detectada neste estudo. A vegetação de grande porte, em países de clima temperado, é um fator de proteção aos cavalos já que, estas áreas, não suportam grandes quantidades de mosquitos (PRADEL et al, 2009; WARD et al, 2009). No Pantanal, onde a maior parte da vegetação tem formação de savana, predominantemente formada de arbustos e gramíneas, os cavalos da região poderiam estar expostos a um maior risco de infecções. Nos demais estados, os cavalos habitavam áreas peri-domiciliares, que, apesar de não caracterizarem um ambiente urbano, não tem vegetação natural. Em surtos de WNV ocorridos nos Estados Unidos, foi observado maior número de animais doentes em pastagens localizadas na área rural (WARD et al, 2006). Mesmo com a presença destes fatores de risco, o principal deles é a presença de mosquitos infectados próximos a áreas de habitação dos equinos. Em regiões com grandes quantidades de mosquitos infectados, há também uma grande quantidade de equinos doentes ou com anticorpos anti-WNV (EPP et al, 2007 b; PRADEL et al, 2009; ROCHLIN et al, 2009; SEBASTIAN et al, 2008; WARD et al, 2009). No Pantanal, foi observada grande quantidade de mosquitos Culicídeos se alimentando do sangue de cavalos, dentre estes, foram mais abundantes *Mansonia titillans*, *Psorophora albigena* e *Culex spp.* (PAUVOLID-CORRÊA et al, 2010). Tais mosquitos podem estar transmitindo Flavivírus aos

animais, o que resultou na grande circulação viral observada no presente estudo. A ausência de animais com doença ou sequela pode ser explicada pela ocorrência de múltiplas infecções por Flavivírus. Foi demonstrado que a prévia inoculação de hamsters com Flavivírus do Sorocomplexo da Encefalite Japonesa protegia estes animais do desafio com WNV, pois os mesmos mantinham-se aparentemente sem doença, enquanto que animais infectados somente com WNV exibiam sinais clínicos e tinham elevada letalidade (TESH et al, 2002). Como há intensa circulação de Flavivírus no Brasil, supomos que, os cavalos assintomáticos deste estudo podem ter sido previamente infectados com outros Flavivírus e a proteção imune cruzada reduziria as manifestações em infecções subsequentes.

Os fatores de infecção em cavalos, indiretamente, são, também, fatores de risco para seres humanos, pois os mesmos vetores que se alimentam de aves podem se alimentar do sangue humano e de cavalos, transmitindo o vírus (ROBERTS e FOPPA, 2006). Em áreas onde houve infecção de cavalos por WNV, o aparecimento de casos humanos pode ser observado 1 a 2 semanas após o encontro da doença nestes animais (CORRIGAN et al, 2006; WARD e SCHEURMANN, 2008). Portanto, havendo vetores que se alimentem do sangue de cavalos e seres humanos, o monitoramento de populações equinas, em proximidade a populações humanas, poderia predizer surtos por WNV (WARD e SCHEURMANN, 2008).

Neste estudo, evidenciou-se a circulação dos Flavivírus SLEV, WNV e ROCV em equinos dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Paraíba. Os dados obtidos com SLEV e ROCV indicam a ocorrência destas arboviroses, atualmente, no Brasil. Além disso, os cavalos

sororeagentes para WNV, sugerem, de forma inédita, que este vírus já tenha sido introduzido no país e conseqüentemente, que suas infecções poderiam não estar sendo corretamente diagnosticadas. Em suma, os resultados deste estudo alertam para a possível ocorrência de infecções por SLEV, WNV e ROCV em populações humanas no Brasil.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

- O ELISA, utilizando peptídeos recombinantes do DIII da proteína E de SLEV, WNV e ROCV como antígeno, mostrou-se adequado à detecção de IgG específico em cavalos, diagnosticando, desta forma, infecções prévias por estes Flavivírus.
- A alta soropositividade observada (54,71%) sugere que esteja a ocorrer uma intensa circulação de Flavivírus infectando cavalos nos locais de estudo, nos Estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo.
- Diagnosticou-se a infecção por SLEV em equinos de todos os locais estudados.
- Observou-se, de forma inédita, que o ROCV infecta cavalos e em locais não restritos ao Estado de São Paulo, onde o vírus foi originalmente detectado.
- Obteve-se, pela primeira vez, evidência de que WNV foi introduzido no Brasil e encontra-se a infectar cavalos nos Estados do Mato Grosso do Sul, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo, com base nas reações séricas monotípicas para este vírus.
- Inquérito sorológico em cavalos mostrou-se uma abordagem adequada à vigilância das flaviviroses por SLEV, ROCV e WNV no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

ALKA, BHARATI K, MALIK Y, VRATI S: Immunogenicity and protective efficacy of the E. coli expressed domain III of Japanese encephalitis virus envelope protein in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 196, p. 227-231, 2007.

ALLONSO-PADILLA, J.; LOZA-RUBIO, E.; ESCRIBANO-ROMERO, E.; CÓRDOBA, L.; CUEVAS, S.; MEJÍA, F.; CALDERÓN, R.; MILÍAN, F.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; WEAVER, S. C.; ESTRADA-FRANCO, J. G. The continuous spread of West Nile virus (WNV): seroprevalence in asymptomatic horses. **Epidemiology and Infections**, Cambridge, v. 137, p. 1163-1168, 2009.

ANDERSON, J. F.; RAHAL J. J. Efficacy of Interferon Alpha-2b and Ribavirin against West Nile Virus in vitro. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 107-108, 2002.

ARAÚJO, F. A. A; VIANNA, R. S. T.; ANDRADE FILHO, G. V.; MELHADO, D. L.; TODESCHINI, B.; CAVALCANTE, G. C.; FEDRIZZI, C. E.; MAGALHÃES, C. S.; SCHERER, A.; ALMEIDA, M. A. B.; PORTELLA, A. S.; SANTOS, E.; SCHERER, S. B.; DORETTO, L.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus do Nilo Ocidental e outros vírus. SVS **Boletim Eletronico Epidemiológico**, v. 4, n. 5. p. 1-8, 2004.

BALEOTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian *Flavivirus* Phylogeny Based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 379-382, 2003.

BARROS, V. E.; FERREIRA, B. R.; LIVONESI, M.; FIGUEIREDO L. T. M. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 141-147, 2009.

BEASLEY, D. W.; AASKOV, J. G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. **Virology**, New York, v. 279, n. 2, p. 447-58, 2001.

BEASLEY, D. W.; BARRETT, A. D. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 24, p.13097-100, 2002.

BEASLEY, D. W.; HOLBROOK, M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; COFFEY, L.; CARRARA, A. S.; PHILLIPPI-FALKENSTEIN, K.; BOHM, R. P.; RATTERREE, M. S.; LILLIBRIDGE, K. M.; LUDWIG, G. V.; ESTRADA-FRANCO, J.; WEAVER S. C.; TESH, R. B.; SHOPE, R. E.; BARRETT, A. D. Use of a recombinant envelop protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 2759-2765, 2004.

BERNARDO L, IZQUIERDO A, ALVAREZ M, ROSARIO D, 393 PRADO I, LÓPEZ C, MARTÍNEZ R, CASTRO J, SANTANA E, HERMIDA L, ET AL.: Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, p.194-199, 2008.

BLITVICH, B. J.; BOWEN, R. A.; MARLEENE, N. L.; HALL, R. A.; BUNNING, M. L.; BEATY, B. J. Epitope-Blocking Enzyme-linked Immunosorbent Assays for detection of West Nile Virus antibodies in domestic mammals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 6, p. 2676-2679, 2003.

BLITVICH, B. J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 71-86, 2008.

BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO, J.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A. E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER, L. West Nile Virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 4, p. 651-653, 2007.

BRANZONI, R. V. M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L.T. M. Duplex reverse transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of brazilian alphaviruses and

flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

BRIESE, T.; GLASS, W. G.; LIPKIN, W. I. Detection of West Nile virus sequences in cerebrospinal fluid. **The Lancet**, Amsterdam, v. 355, n. 9215, p. 1614-1615, 2000.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. FLAVIVIRUSES. IN: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.(eds). **Fields Virology**, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, p.1043-1126.

CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD J. West Nile infection of horses. **Veterinary Research**, Paris, v. 35, NUMERO, p. 467-483, 2004.

CHARREL, R. N.; LÉVY, N.; TESH, R. B. CHANDLER, L. J. Use of Base Excision Sequence Scanning for detection of genetic variations in St. Louis Encephalitis Virus isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1935-1940, 1999.

CHEN S, YU M, JIANG T, DENG Y, QIN C, QIN E: Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 26, p.361-367, 2007.

CHU, J. J.; LEONG, P. W.; 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**, New York, v. 349, n. 2, p. 463-75, 2006.

CORRIGAN, R. L. A.; WALDNER, C.; EPP, T.; WRIGHT, J.; WHITEHEAD, S. M.; BANGURA, H.; YOUNG, E.; TOWNSEND, H. G. G. Prediction of human cases of West Nile virus by equine cases, Saskatchewan, Canada, 2003. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 76, p. 263-272, 2006.

CRILL, W. D.; ROEHRIG J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 16, p. 7769-73, 2001.

DIAZ, L. A; KOMAR, N.; VISITIN, A.; JURI, M. J. D.; STEIN, M.; ALLENDE, R. L.; SPISANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W. R.; CONTIGIANI, M. S. West Nile Virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 4, p. 689-691, 2008a.

DIAZ, L. A; OCCELLI, M.; ALMEIDA, F. L.; ALMIRÓN, W. R.; CONTIGIANI, M. S. Eared dove (*Zenaida auriculata*, Columbidae) as host for St. Louis Encephalitis Virus (Flaviviridae, *Flavivirus*). **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 8, n. 2, p. 277-282, 2008b.

DOS SANTOS F, MIAGOSTOVICH M, NOGUEIRA R, SCHATZMAYR H, RILEY L, HARRIS E: Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.144-152, 2004.

DURAND, B.; DAUPHIN, G.; ZELLER, H.; LABIE, J.; SCHUFFENECKER, I.; MURRI, S.; MOTOU, F.; ZIENTARA, S. Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. **Veterinary Record**, London, v. 157, p. 711-713, 2005.

EPP, T.; WALDNER, C.; LEIGHTON, F. A.; BERKE, O.; TOWNSEND, G. G. Seroprevalence and risk factors for infection with West Nile virus in Saskatchewan horses, 2003. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 256-263, 2007a.

EPP, T. WALDNER, C.; WEST, K.; TOWNSEND H. Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. **Canadian Veterinary Journal**, Otawwa, v. 48, p. 1137-1145, 2007b.

ETEMAD B, BATRA G, RAUT R, DAHIYA S, KHANAM S, SWAMINATHAN S, KHANNA N: An envelope domain III-based chimeric antigen produced in *Pichia pastoris* elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, p. 353-363, 2008.

FARFÁN-ALE J. A.; BLITVICH, B. J.; MARLENEE, N. L.; LOROÑO-PINO, M. A.; PUERTO-MANZANO, F.; GARCÍA-REJÓN, J. E.; ROSADO-PAREDES, E. P.; FLORES-FLORES, L. F.; ORTEGA-SALAZAR, A.; CHÁVEZ-MEDINA, J.; CREMIEUX-GRIMALDI, J. C.; CORREA-MORALES, F.; HERNÁNDEZ-GAONA, G.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. F.; BEATY, B. J. Antibodies to West Nile Virus in asymptomatic mammals, birds and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 74, n. 5, p. 908-914, 2006.

FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M.; MARTI, A. T.; SOUZA, L. T. M; IVERSSON, L. B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil, I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 265-274, 1994.

FIGUEIREDO, L. T. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; FIORILLO, A. M. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 204-211, 1986.

FIGUEIREDO, L. T. M. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1990.

FIGUEIREDO, L. T. M.; BATISTA, W.C.; KASHIMA, S.; NASSAR, E.S. Identification of Brazilian Flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using *Flavivirus* universal primers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 357-362, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flavivirus. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 9, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FREITAS, P. P. S. Monitoramento e Vigilância Epidemiológica do vírus West Nile em aves silvestres capturadas no Estado de São Paulo, Brasil. 2010. 71 f. **Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2010.

GERHARDT, R. West Nile Virus in the United States (1999-2005). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, p. 170-177, 2006.

HERRMANN, S.; LESHEM, B.; LOBEL, L.; BIN, H.; MENDELSON, E.; BEN-NATHAN, D.; DUSSART, P.; PORGADOR, A.; RAGER-ZISMAN, B.; MARKS, R. S. T7 phage display of Ep15 peptide for the detection of WNV IgG. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 141, p. 133-140, 2007.

HOBSON-PETERS, J.; TOYE, P.; SÁNCHEZ, M. D.; BOSSART, K. N.; WANG, L.; CLARK, D. C.; CHEAH, W. Y.; HALL, R. A. A glycosilated peptide in the West Nile virus envelop protein is immunogenic during equine infection. **Journal of General Virology**, London, v. 89, p. 3063-3072, 2008.

HUBALEK, Z.; WEGNER, E.; HALOUZKA, J.; TRYJANOWSKI, P.; JERZAK, L.; SIKUTOVÁ, S.; RUDOLF, I.; KRUSZEWICZ, A. G.; JAWORSKI, Z.; WLODARCZYK, R. Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile Virus in Poland. **Viral Immunology**, New York, v. 21, n. 2, p. 247-253, 2008.

IVERSSON, L. B. Aspectos de encefalite por arbovírus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 9-35, 1980.

IVERSSON, L. B.; SILVA, R. A. M. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A; BARROS, L. R. S. Circulation of Eastern Equine Encephalitis, Western Equine Encephalitis, Ilheus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 355-359, 1993.

JOHNSON, A. J.; NOGA, A. J.; KOSOY, O.; LANCIOTTI, R. B.; JOHNSON, A. A.; BIGGERSTAFF, B. J. Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile Virus and anti-St. Louis Encephalitis Virus immunoglobulin M antibodies. **Clinical an Diagnostic Laboratory Immunology** , v. 12, n. 5, p. 566-574, 2005.

JOHNSON A.J.; CHESHER, R. C.; COSENTINO, G.; MASRI, H. P.; MOCK, R. O.; LANCIOTTI, R. S.; MARTIN, D. A.; PANELLA, A. J.; KOSOY, O.; BIGGERSTAFF, B. J. Validation of a Microsphere-Based Immunoassay for detection of anti-West Nile Virus and anti-St. Louis Encephalitis Virus Immunoglobulin M antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 9, p. 1084-1093, 2007.

KAUFFMAN, E. B.; JONES, S. A.; DUPUIS II, A. P.; NGO, K. A.; BERNARD, K. A.; KRAMER, L. D. Virus detection protocols for West Nile Virus in vertebrate and mosquito specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, N. 8, P. 3661-3667, 2003.

KITAI, Y.; SHODA, M.; KONDO, T.; KONISHI, E. Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus infections in equine sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington , v. 14, n. 8, p. 1024-1031, 2007.

KLEIBOEKER, S. B.; LOIACONO, C. M.; ROTTINGHAUS, A.; PUE, H. L.; JOHNSON, G. C. Diagnosis of West Nile infection in horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 16, n. 1, p. 2-10, 2004.

KNOTTENBELT, D. C. Equine neurological disease and dysfunction: a diagnostic challenge for the practitioner. Part 1: objectives and limitations of a

neurological examination. **Equine Veterinary Education**, Newmarket, v. 8, p. 196-199, 1996.

KOMAR, N.; PANELLA, N. A.; BURNS, J. E.; DUSZA, S. W.; MASCARENHAS, T. M.; TALBOT, T. O. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 621-625, 2001.

KOMAR, N. West Nile Virus: Epidemiology and ecology in North America. **Advances in Virus Research**, New York, v. 61, n. 1, p. 185-234, 2003.

KOMAR, N.; CLARK, G.G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 19, n. 2, p. 112-117, 2006.

LANCIOTTI, R. S.; KERST, A. J. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assays for rapid detection of West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 12, p. 4506-4513, 2001.

LEBLOND, A.; HENDRIKX, P.; SABATIER, P. West Nile Virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 7, n. 3, p. 378-383, 2007.

LEFRANÇOIS, T.; BLITVICH, B. J.; PRADEL, J.; MOLIA, S.; VACHIÉRY, N.; MARTINEZ, D. West Nile Virus in Guadeloupe, **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1081, p. 206-215, 2006.

LENG C, LIU S, TSAI J, LI Y, CHEN M, LIU H, LIEN S, YUEH A, HSIAO K, LAI L, ET AL.: A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes Infect**, v. 11, p.288-295, 2009.

LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.M.; SACCHETTA, L.A.; CALISHER, C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. 1. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p. 444-449, 1978.

LOPES, O.S.; SACCHETTA, L. A.; FRANCY, D. B.; JAKOB, W. L.; CALISHER, C. H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v.113, n. 2, p. 122-125, 1981.

LOPÉZ, G.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M. A.; TEJEDOR, C. G.; SORIGUER, R.; FIGUEROLA, J. Prevalence of West Nile Virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 8, n. 5, p. 615-621, 2008.

LORENZ, I.C.; ALLISON, S.L.; HEINZ, F.X.; HELENIUS, A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the

endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 12, p. 5480-5491, 2002.

LOROÑO-PINO, M. A.; FARFÁN-ALE, J. A.; GARCIA-REJON, J. E.; LIN, M.; ROSADO-PAREDES, E.; PUERTO, F. I.; BATES, A.; ROOT, J. J.; FRANKLIN, A. B.; SULLIVAN, H. J.; BLITVICH, B. J. Antibodies to influenza and West Nile viruses in horses in Mexico. **Veterinary Record**, London, v. 166, p. 22-24, 2010.

MAGNARELLI, L. A.; BUSHMICH, S. L.; ANDERSON, J. F.; LEDIZET, M.; KOSKI, R. A. Serum antibodies to West Nile virus in naturally exposed and vaccinated horses. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 57, p. 1087-1093, 2008.

MARLENEE, N. L.; LORONO-PINO, M. A.; BEATY, B. J. Detection of antibodies to West Nile and Saint Louis encephalitis viruses in horses. **Salud pública de México**, Cuernavaca, v.46, n.5, p.373-375, 2004.

MARTIN, D. A.; BIGGERSTAFF, B. J.; ALLEN, B.; JOHNSON, A. J.; LANCIOTTI, R. S.; ROEHRIG J. T. Use of Immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 3, p. 544-549, 2002.

MATTAR, S.; EDWARDS, E.; LAGUADO, J.; GONZÁLEZ, M.; ALVAREZ, J.; KOMAR, N. West Nile Virus antibodies in colombian horses. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. 1497-1498, 2005.

MINKE, J.M.; SIGER, L.; KARACA, K.; AUSTGEN, L.; GORDY, P.; BOWEN, R. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. **Archives of Virology**, New York, v. 18, p. 221–230, 2004.

MITCHELL, C. J.; FORATINNI, O. P. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. **Journal of medical entomology**, Lanham, v. 21, p. 34-37, 1984.

MODIS Y, OGATA S, CLEMENTS D, HARRISON S: A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proce Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 6986-6991, 2003.

MODIS Y, OGATA S, CLEMENTS D, HARRISON S: Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313-319, 2004.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 2, p. 1223-31, 2005.

MONDINI, A.; CARDEAL, I. L. S.; LÁZARO, E.; NUNES S. H.; MOREIRA, C. C.; RAHAL, P.; MAIA, I. L.; FRANCO, C.; GÓNGORA, D. V. N.; GÓNGORA-RUBIO, F.; CABRERA, E. M. S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, F. G.; BRONZONI, R. V. M.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M. L. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 1, p. 176-178, 2007.

MONGO, M. N.; KHAITSA, M. L.; DYER, N. W. Environmental and ecological determinants of West Nile virus occurrence in horses in North Dakota, 2002. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 135, n. 1, p. 57-66, 2007.

MORALES, M. A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, J. B.; VISSANI, A.; TRONO, K.; GUTIERREZ, G.; PIGRETTI, S.; MENCHACA, H.; GARRIDO, N.; TAYLOR, N.; FERNANDEZ, F.; LEVIS, S.; ENRIA, D. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v.12, n. 10, p. 1559-1561, 2006.

MORALES-BETOULLE, M. E.; MORALES H.; BLITVICH B. J.; POWERS A. M.; DAVIS E. A.; KLEIN R.; CORDÓN-ROSALES, C. West Nile Virus in horses, Guatemala. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v.12, n. 6, 2006.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Review of Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

NELSON, D. M.; GARDNER, I. A.; CHILES, R. F.; BALASURYA, U. B.; ELDRIDGE, B.F.; SCOTT, T. W.; REISEN, W. K.; MacLACHLAN, N. J. Prevalence of antibodies against Saint Louis encephalitis and Jamestown Canyon viruses in California horses. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 209-215, 2004.

NG, T.; HATHAWAY, D.; JENNINGS, N.; CHAMP, D.; CHIANG, Y. W.; CHU, H. J. Equine vaccine for West Nile Virus. **Development in biologicals**, Karger, v. 114, p. 221-227, 2003.

NIELSEN, C. F.; REISEN, W. K.; ARMIJOS, M. V.; MacLACHLAN, N. J.; SCOTT, T. W. High subclinical West Nile Virus incidence among nonvaccinated horses in the northern California associated with low vector abundance and infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, n. 1, p. 45-52, 2008.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; TAVARES, F. N.; ALENCAR, J.; SILVA, J. S.; MURTA, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; PELLEGRIN, A. O.; GIL-SANTANA, H.; GUIMARÃES A. E.; SILVA, E. E. Preliminary investigation of culicidae species in South Pantanal, Brazil, and their potential importance in arbovirus transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.52, n. 1, p. 17-23, 2010.

PRADEL, J.; MONFRAY, K. C.; MOLIA, S.; VACHIÉRY, N.; ROUSTEAU, A.; IMBERT, D.; MARTINEZ, D.; SABATIER, P.; LEFRANÇOIS, T. Risk factors for West Nile virus seropositivity of equids in Guadeloupe. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 92, p. 71-18, 2009.

PUPO, M.; GUZMÁN, M. G.; FERNÁNDEZ, R.; LLOP, A.; DICKINSON, F. O.; PÉREZ, D.; CRUZ, R.; GONZÁLEZ, T.; ESTÉVEZ, G.; GONZÁLEZ, H.; SANTOS, P.; KOURÍ, G.; ANDONOVA, M.; LINDSAY, R.; ARTSOB, H.; DREBOT, M. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. 1022-1024, 2006.

PURDY, D. E.; NOGA, A. J.; CHNG, G. J. Noninfectious recombinant antigen for detection of St. Louis Encephalitis Virus-Specific antibodies in serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 10, p. 4709-4717, 2004.

RAPPOLE, J. H.; DERRICKSON, S. R.; HUBÁLEK, Z. Migratory birds and spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2000.

REY, F. A.; HEINZ, F. X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2-Å resolution. **Nature**, London, v. 375, p. 291–298, 1995.

ROBERTS, R. S.; FOPPA, I. M. Prediction of equine risk of West Nile Virus infection based on dead bird surveillance. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2006.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L.; BISORDI, I.; PETRELLA, S. M.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. L.; BESSA, T. A.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. B.; CERRONI, M. P.; MARTIN, A. P.; BARBOSA, V. M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005.

ROCHLIN, I.; GINSBERG, H. S.; CAMPBELL, S. R. Distribution and abundance of host-seeking Culex species at three proximate locations with different levels of West Nile Virus activity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 4, p. 661-668, 2009.

RODRIGUES, S. G.; OLIVA, O. P.; ARAUJO, F. A. A.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; HENRIQUES, D. F.; SILVA, E. V. P.; RODRIGUES, D. S. G.; PRAZERES, A. S. C.; TAVARES-NETO, J.; VASCONCELOS, P. F. C. Epidemiology of Saint Louis encephalitis vírus in the Brazilian Amazon region and in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 1, p. 81-86, 2010.

ROMANO-LIBER, N. S.; IVERSSON, L. B. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 236-242, 2000.

SANCHÉZ, M. D.; PIERSON, T. C.; DeGRACE M. M.; MATTEI, L. M.; HANNA, S. H.; PIERO, F.; DOMS, R.W. The neutralizing antibody response against West Nile virus in naturally infected horses. **Virology**, New York, v. 359, p. 336-348, 2006.

SHIRAFUJI, H.; KANEHIRA, K.; KAMIO, T.; KUBO, M.; SHIBAHARA, T.; KONISHI, M.; MURAKAMI, M.; NAKAMURA, Y.; YAMANAKA, T.; KONDO, T.; MATSAMURA, T.; MURANAKA, M.; KATAYAMA, Y. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 71, n. 7, p. 969-974, 2009.

SHUKLA J, BHARGAVA R, DASH P, PARIDA M, TRIPATHI N, RAO P: Cloning and expression of domain III of the envelope gene of Japanese encephalitis virus: evaluation for early clinical diagnosis by IgM ELISA. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 158 , p. 165-170, 2009.

SEBASTIAN, M. M.; STEWART, I.; WILLIAMS, N. M.; POONACHA, K. B.; SELLS, S. F.; VICKERS, M. L.; HARRISON, L. R. Pathological, entomological, avian and meteorological investigation of a West Nile Virus epidemic in a horse farm. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, p. 134-139, 2008.

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

STRAATMAN, A.; SANTOS-TORRES S.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; TAVARES-NETO, J. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus ROCIO (*Flaviviridae*) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 6, p. 511-515, 1997.

TESH, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; GUZMAN, H.; ARAUJO, T. P.; XIAO, S. Immunization with heterologous Flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 245-251, 2002.

TROCK, S.C.; MEADE, B. J.; GLASER, A.; OSTLUND, E. N. LANCIOTTI, R. S.; CROPP, B. C.; KULASEKERA, V.; KRAMER, L. D.; KOMAR, N. West Nile virus outbreak among horses in New York state, 1999 and 2000. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 745-747, 2001.

TSAI, T. F.; MITCHELL, C. J. St. Louis encephalitis, p. 431-458. In MONATH, T. P. (ed), **The arboviruses: epidemiology and ecology**. CRC Press, Boca Raton, Florida.

ULLOA, A.; LANGEVIN, S. A.; MENDEZ-SANCHEZ, J. D.; ARREDONDO-JIMENEZ, J. I.; RAETZ, J. L.; POWERS, A. M.; VILLAREAL-TREVIÑO, C.; GUBLER, D. J.; KOMAR, N. Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandón Forest Region of Chiapas, Mexico. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2003.

ULLOA, A.; FERGUSON, H. H.; MENDEZ-SANCHEZ, J. D.; DANIS-LOZANO, R.; CASAS-MARTÍNEZ, M.; BOND, J. G.; GARCÍA-ZEBADÚA, J. C.; OROZCO-BONILLA, A.; JUÁREZ-ORDAZ, J. A.; FARFAN-ALE, J. A.; GARCÍA-REJÓN, J. E.; ROSADO-PAREDES, E. P.; EDWARDS, E.; KOMAR, N.; HASSAN, H. K.; UNNASCH, T. R.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A. West Nile Virus activity in mosquitoes and domestic animals in Chiapas, Mexico. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 9, n. 5, p. 555-560, 2009.

WAHALA W, KRAUS A, HAYMORE L, ACCAVITTI-LOPER M, DE SILVA A: Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, New York, v. 392, p. 103-113, 2009.

WARD, M. P.; SCHUERMANN, J. A.; HIGHFIELD, L. D.; MURRAY, K. O. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 118, p. 255-259, 2006.

WARD, M. P.; SCHUERMANN, J. A. The relationship between equine and human West Nile virus disease occurrence. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 378-383, 2008.

WARD, M. P.; WITTICH, C. A.; FOSGATE, G.; SRINIVASAN, R. Environmental risk factors for equine West Nile virus disease cases in Texas. **Veterinary research communications**, Amsterdam, v. 33, p. 461-471, 2009.

WHITE, L. A. Susceptibility of Aedes albopictus C6/36 cells to viral infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.25, n. 7, p. 1221-1221, 1987.

WONG S. J.; BOYLE, R. H.; DEMAREST, V. L. WOODMANSE, A. N.; KRAMER, L. D.; LI, H.; DREBOT, M.; KOSKI, R. A.; FIKRIG, E.; MARTIN, D. A., SHI, P. Immunoassay targeting nonstructural protein NS5 to differentiate West Nile Virus infection from Dengue and St. Louis Encephalitis Virus infections and from flavivirus vaccination. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4271-4223, 2003.

ZHANG Y, ZHANG W, OGATA S, CLEMENTS D, STRAUSS J, BAKER T, KUHN R, ROSSMANN M. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, Philadelphia, v. 112, p. 1607-161, 2004.

8. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 161/2008, sobre o projeto intitulado *"Inquérito sorológico em eqüinos do Estado de São Paulo para detecção de anticorpos contra o vírus Rocio, da encefalite de Saint Louis e do Oeste do Nilo"*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Luiz Tadeu Moraes Figueiredo** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **16 de fevereiro de 2009**.

(We certify that the protocol nº 161/2008, about "Serological investigation in horses of São Paulo state for detection of antibodies against Rocio, Saint-Louis Encephalitis and West Nile Viruses", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO - ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 02/16/2009 meeting).

Ribeirão Preto, 16 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Relação dos cavalos do estado de São Paulo utilizados no estudo.

Equino (Número)	Nome	Data de Colheita	Local
1	Gandi	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
2	Talento	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
3	Quilha	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
4	Candura	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
5	Galicéia	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
6	Ruck	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
7	Ita	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
8	Nespra	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
9	Xena	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
10	Copeu	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
11		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
12		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
13	Taoka	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
14	Viesta	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
15	Emirada	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
16	Gerusa	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
17	Gaita	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
18	Janota	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
19	Janguei	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
20	Calçada	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
21	Famaca	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
22	Eliete	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
23	Gazela	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
24	Honra	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
25	Jainá	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
26	Emirada	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
27	Hirochima	29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
28		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
29		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
30		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
31		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
32		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
33		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
34		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
35		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
36		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
37		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
38		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
39		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
40		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
41		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
42		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
43		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
44		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
45		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
46		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
47		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
48		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
49		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão

50		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
51		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
52		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
53		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
54		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
55		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
56		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
57		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
58		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
59		29/05/2004	Fazenda Santa Lúcia, Município de São Simão
60	Samira	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
61	Flora	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
62	Ramises	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
63	Alan	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
64		02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
65	Jade	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
66	Last Date	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
67	Argus	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
68	Blue Eyes	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
69	El Ali	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
70	Zero Zero	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
71	Amin	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
72	Hania	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
73	Sayde	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
74	Mel	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
75	Osama	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
76	Nazeer	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
77	Princesa	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
78	Dalila	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
79	zaná	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
80	Khadija	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
81		02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
82	Xonada	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
83	Liphard	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
84	Kaia	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
85	Altiva	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
86	Cigana	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
87	Queen	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
88	unknown	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
89	Unbela	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
90	Sabiá	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
91	Antônio	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
92	Amora	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
93	Tulipa	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
94	Petruquio	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
95	Balumbe di Bambi	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
96	Katarina	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
97	Wine	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
98	Nina	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
99	Alegria	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
100	Aragon	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
101	Decorado	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP

102	Astor	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
103	Mohamed	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
104	Átila	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
105	Nerita	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
108	Big Boy	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
109	Queen (Die)	02/06/2004	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
110	Sereia	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
111	Java	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
112	Presença	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
113	Marruá	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
114	Novela	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
115	Grinaldo	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
116	Naja	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
117	Nívea	23/01/2004	Haras Guarani (Med. Vet. Cássia M. B. Orlandi)-Votuporanga
121	Baiana	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
122	Bonbinho	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
123	Faisca	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
124	Cassino	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
125	Manhoso	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
126	Boneca	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
127	Pampa	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
128	Alasad	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
129	Cigano	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
130	Menina	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
131	Menina I	23/08/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
132	Morena	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
133	Gaucho	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
134	Gaucho (poni)	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
135	Roxim	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
136	Canário	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
137	Morena	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
138	Índio	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
139	Garota	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
140	Bainho	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
141	Cacique	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
142	Famoso	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
143	Dino	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
144	Cabrito	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
145	Alazona	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
146	Serena	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
147	Pombinha	11/10/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
148	Xuxa	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
149	Corola	08/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
150	Subaru	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
151	Gaucho I	08/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
152	Gaucho II	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
153	Princesa	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
154	Gaucho III	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
155	Sem Nome	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
156	Moleque	01/11/2003	Projeto Carroceiro- Jaboticabal
157	Andorinha	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
158	Brahma	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)

159	Altiva	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
160	Estintor	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
161	Elegância	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
162	Espuleta	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
163	Arnada	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
164	Cascata	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
165	Quartelheira	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
166	Hola	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
167	Haiti	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
168	Herói	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
169	Estória	08/06/2004	Colina (Ana Silvia)
170	Dakar	08/06/2004	Barretos (Ana Silvia)
171	Zen	08/06/2004	Barretos (Ana Silvia)
1	Zureta	11/03/2009	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
2	Orquídea	11/03/2009	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
3	Cenourinha	11/03/2009	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
4	Bruaci	11/03/2009	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
5	Latifa	11/03/2009	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
6	Zaran	11/03/2009	Setor de Equinocultura FCAV-UNESP
7	HV-06	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
8	HV-08	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
9	HV-09	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
10	HV-11	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
11	HV-13	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
12	HV-17	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
13	HV-Preto S/H	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
14	HV-Preto C/H	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
15	HV-Tordilho	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)
16	HV-Pampa	11/03/2009	Hospital Veterinário Laudo Natel (FCAV-UNESP)

ANEXO C – Relação dos cavalos do estado de Minas Gerais utilizados no estudo.

Identificação Equino	Data de coleta
SN	17/09/2008
SN 1	17/09/2008
SN 2	17/09/2008
SN3	17/09/2008
3	17/09/2008
7	17/09/2008
20	24/09/2008
21	24/09/2008
24	24/09/2008
26	24/09/2008
27	24/09/2008
30	24/09/2008
35	24/09/2008
81	24/09/2008
Chalana	24/09/2008

ANEXO D – Relação dos cavalos do estado do Mato Grosso do Sul utilizados no estudo.

Identificação	Número freezer	Número lacre	Data de armazenamento	Município
2	1	9893	08/01/2009	Bonito
3	1	9893	08/01/2009	Bonito
4	1	9893	08/01/2009	Bonito
5	1	9893	08/01/2009	Bonito
6	1	9893	08/01/2009	Bonito
7	1	9893	08/01/2009	Bonito
8	1	9893	08/01/2009	Bonito
9	1	9893	08/01/2009	Bonito
10	1	9893	08/01/2009	Bonito
11	1	9893	08/01/2009	Bonito
12	1	9893	08/01/2009	Bonito
13	1	9893	08/01/2009	Bonito
14	1	9893	08/01/2009	Bonito
15	1	9893	08/01/2009	Bonito
16	1	9893	08/01/2009	Bonito
17	1	9893	08/01/2009	Bonito
18	1	9953	14/01/2009	Aquidauana
19	1	9953	14/01/2009	Aquidauana
20	1	9955	15/01/2009	Bodoquena
21	1	9955	15/01/2009	Bodoquena
22	1	9954	17/01/2009	Aquidauana
23	1	9956	17/01/2009	Aquidauana
24	1	9896	19/01/2009	Anastácio
25	1	9896	19/01/2009	Anastácio
26	1	9896	19/01/2009	Anastácio
27	1	9896	19/01/2009	Anastácio
28	1	9896	19/01/2009	Anastácio
29	1	9896	19/01/2009	Anastácio
30	1	9900	27/01/2009	Anastácio
31	1	9900	27/01/2009	Anastácio
32	1	9900	27/01/2009	Anastácio
33	1	9900	27/01/2009	Anastácio
34	1	9900	27/01/2009	Anastácio
35	1	9900	27/01/2009	Anastácio
36	1	9900	27/01/2009	Anastácio
37	1	9900	27/01/2009	Anastácio
38	1	9899	04/02/2009	Bodoquena
39	1	9899	04/02/2009	Bodoquena
40	1	9899	04/02/2009	Bodoquena

41	1	9960	17/02/2009	Aquidauana
42	1	9960	17/02/2009	Aquidauana
43	1	9960	17/02/2009	Aquidauana
44	1	9957	27/02/2009	Bodoquena
45	1	9957	27/02/2009	Bodoquena
46	1	9957	27/02/2009	Bodoquena
47	1	9957	27/02/2009	Bodoquena
48	1	9957	27/02/2009	Bodoquena
49	1	9957	27/02/2009	Bodoquena
50	1	9958	27/02/2009	Bodoquena
51	1	9958	27/02/2009	Bodoquena
52	1	9958	27/02/2009	Bodoquena
53	1	9958	27/02/2009	Bodoquena
54	1	9958	27/02/2009	Bodoquena
55	1	9959	03/03/2009	Anastácio
56	1	9959	03/03/2009	Anastácio
57	1	9898	09/03/2009	Bonito
58	1	9897	09/03/2009	Aquidauana
59	1	9897	09/03/2009	Aquidauana
60	1	9872	10/03/2009	Dois Irmãos do Buriti
61	1	9872	10/03/2009	Dois Irmãos do Buriti
62	1	10060	11/03/2009	Aquidauana
92	1	826	06/06/2008	Aquidauana
93	1	826	06/06/2008	Aquidauana
94	1	826	06/06/2008	Aquidauana
95	1	827	09/06/2008	Aquidauana
96	1	827	09/06/2008	Aquidauana
97	1	827	09/06/2008	Aquidauana
98	1	827	09/06/2008	Aquidauana
99	1	827	09/06/2008	Aquidauana
100	1	828	10/06/2008	Anastácio
101	1	1096	11/06/2009	Aquidauana
102	1	1097	12/06/2009	Aquidauana
103	1	1098	19/06/2008	Antônio João
104	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
105	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
106	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
107	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
108	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
109	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
110	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
111	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
112	1	1099	27/06/2008	Bodoquena
113	1	1099	27/06/2008	Bodoquena

114	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
115	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
116	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
117	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
118	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
119	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
120	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
121	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
122	1	1102	27/06/2008	Bodoquena
123	1	1101	21/07/2008	Aquidauana
124	1	1100	22/07/2008	Aquidauana
125	1	1100	22/07/2008	Aquidauana
126	1	1100	22/07/2008	Aquidauana
127	1	1100	22/07/2008	Aquidauana
128	1	1100	22/07/2008	Aquidauana
129	1	1100	22/07/2008	Nioaque
130	1	1100	22/07/2008	Nioaque
131	1	1100	22/07/2008	Nioaque
132	1	1103	29/07/2008	Aquidauana
133	1	1103	29/07/2008	Aquidauana
134	1	1103	29/07/2008	Aquidauana
135	1	1103	29/07/2008	Aquidauana
136	1	1103	29/07/2008	Aquidauana
137	1	1105	30/07/2008	Aquidauana
138	1	1105	30/07/2008	Aquidauana
139	1	1105	30/07/2008	Aquidauana
140	1	1104	01/08/2008	Anastácio
141	1	833	05/08/2008	Aquidauana
142	1	833	05/08/2008	Aquidauana
143	1	833	05/08/2008	Aquidauana
144	1	833	05/08/2008	Aquidauana
145	1	834	08/08/2008	Aquidauana
146	1	834	08/08/2008	Bodoquena
147	1	834	08/08/2008	Bodoquena
148	1	834	08/08/2008	Bodoquena
149	1	835	14/08/2008	Aquidauana
150	1	2135	20/08/2008	Aquidauana
151	1	2135	20/08/2008	Aquidauana
152	1	829	25/08/2008	Aquidauana
153	1	829	25/08/2008	Aquidauana
154	1	836	29/08/2008	Nioaque
155	1	2134	02/09/2009	Aquidauana
156	1	855	04/09/2008	Aquidauana
157	1	855	04/09/2008	Aquidauana

158	1	855	04/09/2008	Aquidauana
159	1	2131	06/09/2008	Aquidauana
160	1	854	10/09/2008	Aquidauana
161	1	837	24/09/2008	Aquidauana
162	1	838	25/09/2008	Aquidauana
163	1	838	25/09/2008	Aquidauana
164	1	830	26/09/2008	Aquidauana
165	1	830	26/09/2008	Aquidauana
166	1	832	29/09/2008	Aquidauana
167	1	840	02/10/2008	Aquidauana
168	1	831	07/10/2008	Aquidauana
169	1	831	07/10/2008	Aquidauana
170	1	831	07/10/2008	Aquidauana
171	1	831	07/10/2008	Anastácio
172	1	831	07/10/2008	Anastácio
173	1	831	07/10/2008	Anastácio
174	1	831	07/10/2008	Anastácio
175	1	2133	08/10/2008	Anastácio
176	1	2133	08/10/2008	Anastácio
177	1	2133	08/10/2008	Anastácio
178	1	2133	08/10/2008	Anastácio
179	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
180	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
181	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
182	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
183	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
184	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
185	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
186	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
187	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
188	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
189	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
190	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
191	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
192	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
193	1	1106	15/10/2008	Aquidauana
194	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
195	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
196	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
197	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
198	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
199	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
200	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
201	1	1107	15/10/2008	Aquidauana

202	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
203	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
204	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
205	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
206	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
207	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
208	1	1107	15/10/2008	Aquidauana
209	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
210	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
211	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
212	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
213	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
214	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
215	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
216	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
217	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
218	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
219	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
220	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
221	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
222	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
223	1	1108	15/10/2008	Aquidauana
224	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
225	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
226	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
227	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
228	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
229	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
230	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
231	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
232	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
233	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
234	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
235	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
236	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
237	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
238	1	1109	15/10/2008	Aquidauana
239	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
240	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
241	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
242	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
243	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
244	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
245	1	1110	15/10/2008	Aquidauana

246	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
247	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
248	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
249	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
250	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
251	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
252	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
253	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
254	1	1110	15/10/2008	Aquidauana
255	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
256	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
257	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
258	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
259	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
260	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
261	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
262	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
263	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
264	1	2132	07/11/2008	Aquidauana
265	1	839	14/11/2008	Aquidauana
266	1	9925	17/11/2008	Aquidauana
267	1	9925	17/11/2008	Aquidauana
268	1	9924	21/11/2008	Aquidauana
269	1	9923	21/11/2008	Nioaque
270	1	9923	21/11/2008	Nioaque
271	1	9923	21/11/2008	Nioaque
272	1	9923	21/11/2008	Nioaque
273	1	9923	21/11/2008	Nioaque
274	1	9923	21/11/2008	Nioaque
275	1	9923	21/11/2008	Nioaque
276	1	9923	21/11/2008	Nioaque
277	1	9923	21/11/2008	Nioaque
278	1	9923	21/11/2008	Nioaque
279	1	9923	21/11/2008	Nioaque
280	1	9923	21/11/2008	Nioaque
281	1	9923	21/11/2008	Nioaque
282	1	9923	21/11/2008	Nioaque
283	1	9923	21/11/2008	Nioaque
284	1	9923	21/11/2008	Nioaque
285	1	9923	21/11/2008	Nioaque
286	1	9923	21/11/2008	Nioaque
287	1	9922	25/11/2008	Bodoquena
288	1	9921	27/11/2008	Aquidauana
289	1	9921	27/11/2008	Aquidauana

290	1	9921	27/11/2008	Aquidauana
291	1	9917	02/12/2008	Aquidauana
292	1	9918	02/12/2008	Aquidauana
293	1	9919	03/12/2008	Bodoquena
294	1	9919	03/12/2008	Bodoquena
295	1	9920	03/12/2008	Bodoquena
296	1	9871	09/12/2008	Anastácio
297	1	9871	09/12/2008	Anastácio

ANEXO E – Relação dos cavalos do estado do Rio de Janeiro utilizados no estudo.

Número de identificação	Nome equino	Data da coleta
1	Jocasta	14/07/2009
2	Distinto	14/07/2009
3	Juvenal	14/07/2009
4	Maleva	14/07/2009
5	Zarire	14/07/2009
6	Iene	14/07/2009
7	Zalua	14/07/2009
8	Fato	14/07/2009
9	Balim	14/07/2009
10	Biquinho	14/07/2009
11	Icaro	14/07/2009
12	Luka	14/07/2009
13	Canário	14/07/2009
14	Coliseu	14/07/2009
15	Garantido	14/07/2009
16	Uberaba	14/07/2009
17	Biquinha	14/07/2009
18	Muralha	14/07/2009
19	D. Flor	14/07/2009
20	Altaneiro	14/07/2009
21	Festa	14/07/2009
22	Moranga	14/07/2009
23	Angatuba	14/07/2009
24	Colosso	14/07/2009
25	Cruzeira	14/07/2009
26	Menom	14/07/2009
27	Gassão	14/07/2009
28	Vosplan	14/07/2009
29	Aboio	14/07/2009
30	Duna	14/07/2009
31	Zurem	14/07/2009
32	Lamento	14/07/2009
33	Guri	14/07/2009
34	Bacamarte	14/07/2009
35	Cervantes	14/07/2009
36	Curioso	14/07/2009

37	Jade II	14/07/2009
38	Berimbau	14/07/2009
39	Bálsamo	14/07/2009
40	Camanche	14/07/2009
41	Lisa	14/07/2009
42	Zirach	14/07/2009
43	GL	14/07/2009
44	Lucky Strike	14/07/2009
45	Ciranda	14/07/2009
46	Malvada	14/07/2009
47	Destino	14/07/2009
48	Cadência	14/07/2009
49	Flamenca	14/07/2009
50	Copacabana	14/07/2009
51	Herdeira	14/07/2009
52	Cazuza	14/07/2009
53	Catira	14/07/2009
54	JB Strauss	14/07/2009
55	Honesta	14/07/2009
56	Vitória	15/07/2009
57	Invocado	15/07/2009
58	Mitay	15/07/2009
59	Ajax	15/07/2009
60	Cartola	15/07/2009
61	Itatiaia	15/07/2009
62	Esaino	15/07/2009
63	Trucão	15/07/2009
64	Jannus	15/07/2009
65	Baronesa	15/07/2009
66	Zaia	15/07/2009
67	Rapunzel	15/07/2009
68	Magnus	15/07/2009
69	Tereza	15/07/2009
70	Ceres	15/07/2009
71	Bagadu	15/07/2009
72	Mula	15/07/2009
73	Bila	15/07/2009
74	Altíssima	15/07/2009
75	Aniz	15/07/2009
76	Arroio	15/07/2009
77	Ximboco	15/07/2009
78	Abusado	15/07/2009
79	Caminheiro	15/07/2009
80	Instinto	15/07/2009

81	Barganha	15/07/2009
82	Metida	15/07/2009
83	Sultão	15/07/2009
84	Clarim	15/07/2009
85	Garça	15/07/2009
86	Fantástica	15/07/2009
87	Jamelão	15/07/2009
88	Castor	15/07/2009
90	Zanuir	15/07/2009
91	Mimo	15/07/2009
92	Lua	15/07/2009
93	Mouro	15/07/2009
94	Esaideiro	15/07/2009
95	Farroupilha	16/07/2009
96	Caiboaté	16/07/2009
97	Mestre	16/07/2009
98	Inara	16/07/2009
99	Tarô	16/07/2009
100	Bugre	16/07/2009
101	Luanda	16/07/2009
102	Patrão	16/07/2009
103	Marea	16/07/2009
104	Lurdinha	16/07/2009
105	Yara	16/07/2009
106	Guabiju	16/07/2009
107	Ituza	16/07/2009
108	Ibirubá	16/07/2009
109	Milonga	16/07/2009
110	Naman	16/07/2009
111	Garboso	16/07/2009
112	Oboé	16/07/2009
113	Arataca	16/07/2009
114	Jarau	16/07/2009
115	Capitu	16/07/2009
116	Uva	16/07/2009
117	Celta	16/07/2009
118	Yerma	16/07/2009
119	Informação	16/07/2009
120	Babalu	16/07/2009
121	Salua	16/07/2009
122	Yagi	16/07/2009
123	Yes	16/07/2009
124	Estandarte	16/07/2009
125	Ilks	16/07/2009

126	Zorvi	16/07/2009
127	Mandala	16/07/2009
128	Famoso	16/07/2009
129	Chocolate	16/07/2009
130	Bailongo	16/07/2009
131	Mandrack	16/07/2009
132	Gladiador	16/07/2009
133	Bazuca	16/07/2009
134	Carnaval	16/07/2009
135	Inócua	16/07/2009
136	Cometa	16/07/2009
137	Jaçanã	16/07/2009
138	Milk	16/07/2009
139	Jaú	16/07/2009
140	Guacho	16/07/2009
141	Zico	16/07/2009
142	Menu	16/07/2009
143	Fundamento	16/07/2009
144	Bocaina	16/07/2009
145	Bambolê	16/07/2009
146	Batalha	16/07/2009
147	Escarlate	16/07/2009
148	Quaresma	16/07/2009
149	Espião	16/07/2009
150	José Cuervo	16/07/2009
151	Chacal	16/07/2009
152	Caramelo	16/07/2009
153	Fibra	16/07/2009
154	Pampeano	16/07/2009
155	Barbara	16/07/2009
156	Alceu	16/07/2009
157	Charrua	16/07/2009
158	Experiência	17/07/2009
159	Ulna	17/07/2009
160	Intrépido	17/07/2009
161	Volthier	17/07/2009
162	Tordilho	17/07/2009
163	Gorjeta	17/07/2009
164	Mosquita	17/07/2009
165	Breimbau	17/07/2009
166	Laçador	17/07/2009
167	Cembra	17/07/2009
168	Zibelle	17/07/2009
169	Tropicaliente	17/07/2009

170	Yssa	17/07/2009
171	Yashe	17/07/2009
172	Farra	17/07/2009
173	Zarzal	17/07/2009
174	Hebraica	17/07/2009
175	Bolicho	17/07/2009
176	Zesh	17/07/2009
177	Graveto	17/07/2009
178	Jamaica	17/07/2009
179	Cientista	17/07/2009
180	Kília	17/07/2009
181	Marchador	17/07/2009
182	Carícia	17/07/2009
183	Fiorde	17/07/2009
184	Yoshino	17/07/2009
185	Barishnikov	17/07/2009
186	Cavaco	17/07/2009
187	Felizardo	17/07/2009
188	Zalus	17/07/2009
189	Jaeja	17/07/2009
190	Ferroada	17/07/2009
191	Mercedita	17/07/2009
192	Itajubá	17/07/2009
193	Zadh	17/07/2009
194	Jameli	17/07/2009
195	Corcel	17/07/2009
196	Implacável	17/07/2009
197	Distinto II	17/07/2009
198	Jade	17/07/2009
199	Cigana	17/07/2009
200	Vitória P.	17/07/2009
201	D. Flor P.	17/07/2009

Nº Ficha	Proprietário	Município	UF	Localidade	Nº animais propriedade	Utilidade do animal	Espécie	Sexo	Idade	Animal vacinado contra encefalite	Data de Vacina	Doente	Data da coleta
PBEE 01	Geraldo Mendes Alcedo	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Arara	5	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Não	18/05/2009
PBEE 02	Simao Venceslau	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Pereira	4	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	18/05/2009
PBEE 03	Antonio Forte Maio	Coremas	PB	Fazenda Barra de Ouro	4	Esporte	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Sim	30/06/1905	Não	19/05/2009
PBEE 04	Damiao Ferreira da silva	Coremas	PB	Parque Mangueiro	3	Esporte	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Não		Não	21/05/2009
PBEE 05	Jose Ilton Rocha Pinto	Poço de José de Moura	PB	Sítio Tomões	3	Trabalho	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	11/05/2009	Não	23/05/2009
PBEE 06	Damiao Ribeiro dos Santos	Poço de José de Moura	PB	Sítio Casas Velhas (distrito)	3	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não sabe		Não	23/05/2009
PBEE 07	Francisco Antonio Evangelista	Poço de José de Moura	PB	Sítio Carnaubinha	5	Não informado	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	16/05/2009	Sim	22/05/2009
PBEE 08	Rivanildo Fatia dos Santos	Condado	PB	Sítio Pitambeira	não informado	Passeio	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Sim	02/07/2009

PBEE 09	Rivanildo Fatia dos Santos	Condado	PB	Sítio Pitambeira		Passeio	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Não	15/07/2009
PBEE 10	Jose Hermindeo de Sousa Neto	Paulista	PB	Fazenda Varzea do Augustinho	Não informado	Não informado	Equina	Fêmea	Não informado	Sim	30/06/2009	Não informado	
PBEE 11	Rivardier de Oliveira Saraiva	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Macambira	12	Trabalho	Equina	Não Informado	Não informado	Não		Sim	02/07/2009
PBEE 12	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Não informado	Equina	Não Informado	Não informado	Não		Sim	02/07/2009
PBEE 13	Orismida Tomas Araujo Neto	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Carnauba	4	Não informado	Equina	Não Informado	Não informado	Sim	01/07/2009	Sim	02/07/2009
PBEE 14	Adelso A. B. de Araujo	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Carnauba	20	Não informado	Equina	Fêmea	Não informado	Não		Sim	02/07/2009
PBEE 15	José Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Outro	Equina	Macho	5 a 10 anos	Sim	26/06/2009	Sim	06/07/2009
PBEE 16	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Outro	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	06/07/2009
PBEE 17	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Trabalho	Equina	Fêmea	Não informado	Sim	03/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 18	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Outro	Equina	Fêmea	6 meses a 1 ano	Não		Não	06/07/2009
PBEE 19	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Outro	Equina	Fêmea	< 6 meses	Não		Não	06/07/2009
PBEE 20	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Outro	Equina	Macho	< 6 meses	Não		Não	06/07/2009
PBEE 21	Jose Antonio de Oliveira	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sítio Mororó	13	Trabalho	Equina	Fêmea	Não informada	Não		Não	06/07/2009

PBEE 22	Orismida Tomas Araujo Neto	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sitio Carnauba	4	Trabalho	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 23	Orismida Tomas Araujo Neto	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Sitio Carnauba	4	Outro	Equina	Não Informado	6 meses a 1 ano	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 24	Adelsonoumar Abdias de Araujo	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	18	Outro	Equina	Fêmea	< 6 meses	Sim	01/07/2009	Sim	06/07/2009
PBEE 25	Adelsonoumar Abdias de Araujo	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	18	Outro	Equina	Fêmea	< 6 meses	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 26	Adelsonoumar Abdias de Araujo	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	18	Outro	Equina	Fêmea	< 6 meses	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 27	Adelsonoumar Abdias de Araujo	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	18	Outro	Equina	Fêmea	< 6 meses	sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 28	Adelsonoumar Abdias de Araujo	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	18	Outro	Equina	Fêmea	6 meses a 1 ano	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 29	Sabino Saraiva Neto	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	19	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	06/07/2009
PBEE 30	Sabino Saraiva Neto	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Carnauba	19	Outro	Equina	Fêmea	1 a 2 anos	sim	29/06/2009	Sim	06/07/2009
PBEE 31	Paulo Americo Maia	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Parati	16	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009

PBEE 32	Paulo Americo Maia	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Parati	16	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Sim	01/07/2009	Não	06/07/2009
PBEE 33	Paulo Americo Maia	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Parati	16	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Sim	01/07/2009	Sim	06/07/2009
PBEE 34	Antonio Damiao Pereira	São Bento	PB	Granja Jenipapo dos Lucios	6	Trabalho	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Não			06/07/2009
PBEE 35	Lauro Sergio M de Vasconcelos	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Cachoeira	20	Outro	Equina	Macho	< 6 meses	Não		Sim	07/07/2009
PBEE 36	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 37	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 38	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 39	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 40	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	> 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 41	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 42	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 43	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Macho	< 6 meses	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 44	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009

PBEE 45	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 46	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Macho	< 6 meses	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 47	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Fêmea	6 meses a 1 ano	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 48	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Fêmea	6 meses a 1 ano	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 49	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Macho	1 a 2 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 50	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Macho	2 a 5 anos	Sim	06/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 51	Jose Carlos Fernando	Brejo do Cruz	PB	Fazenda Riacho Fundo	17	Outro	Equina	Macho	6 meses a 1 ano	Não		Sim	07/07/2009
PBEE 52	Parque Firmino Alves	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	não informado	Esporte	Equina	Macho	> 10 anos	Não sabe		Sim	07/07/2009
PBEE 53	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Esporte	Equina	Macho	2 a 5 anos	Sim	03/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 54	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Trabalho	Equina	Macho	> 10 anos	Sim	03/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 55	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	03/07/2009	Não	07/07/2009

PBEE 56	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Não informado	Equina	Macho	< 6 meses	Não		Não	07/07/2009
PBEE 57	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Reprodução	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	03/07/2009	Não	07/07/2009
PBEE 58	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Reprodução	Equina	Fêmea	Não informado	Não		Não	07/07/2009
PBEE 59	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Reprodução	Equina	Fêmea	6 meses a 1 ano	Não		Não	07/07/2009
PBEE 60	Julio Cesar Fernando de Oliveira	Brejo do Cruz	PB	Parque Firmino Alves	9	Reprodução / Esporte	Equina	Macho	< 6 meses	Não		Não	07/07/2009
PBEE 61	Emanuella Nobre Santos	São Bento	PB	Sítio Roça	17	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Sim	07/07/2009
PBEE 62	Francisco Rodrigues Soares		PB	Zona urbana de São Bentinho	2	Esporte	Equina	Não Informado	2 a 5 anos	Não		Não	08/07/2009
PBEE 63	Felipe Lima dos Santos	São Bento	PB	Zona urbana de São Bentinho	não informado	Trabalho	Equina	Macho	1 a 2 anos	Não		Não	08/07/2009
PBEE 64	Ivan Olimpio Morador Isaias da Costa Barbosa	São Bentinho	PB	Sítio Augico	8	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	08/07/2009

PBEE 65	Ivan Olimpio Morador Isaias da Costa Barbosa	São Bentinho	PB	Sítio Augico	8	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	08/07/2009
PBEE 66	Ivan Olimpio Morador Isaias da Costa Barbosa	São Bentinho	PB	Sítio Augico	8	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Não	08/07/2009
PBEE 67	Ivan Olimpio Morador Isaias da Costa Barbosa	São Bentinho	PB	Sítio Augico	8	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	08/07/2009
PBEE 68	Maria Bandeira de Souza	Cajazerinhas	PB	Sítio Caetano	4	Passeio	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Sim	04/07/2009	Não	08/07/2009
PBEE 69	Maria Bandeira de Souza	Cajazerinhas	PB	Sítio Caetano	4	Outro	Equina	Macho	< 6 meses	Não		Não	08/07/2009
PBEE 70	Irismar Araujo	Vista Serrana	PB	Sítio Alto	não informado	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos		01/07/2009	Sim	07/07/2009
PBEE 71	Geraldo Mendes Alcedo	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Arara	5	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Sim	06/06/2009	Não	19/06/2009

PBEE 72	Geraldo Mendes Alcedo	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Arara	5	Trabalho	Equina	Macho	5 a 10 anos	Sim	06/06/2009	Não	19/06/2009
PBEE 73	Geraldo Mendes Alcedo	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Arara	5	Trabalho	Equina	Macho	> 10 anos	Sim	06/06/2009	Não	19/06/2009
PBEE 74	Geraldo Mendes Alcedo	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Arara	5	Trabalho	Equina	Não Informado	5 a 10 anos	Sim	06/06/2009	Não	19/06/2009
PBEE 75	Geraldo Mendes Alcedo	São Joao do Rio do Peixe	PB	Fazenda Arara	5	Trabalho	Equina	Macho	> 10 anos	Sim	06/06/2009	Não	19/06/2009
PBEE 76	Jose Batista de Almeida	Piancó	PB	Fazenda em Piacó	2	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Sim	09/06/2009
PBEE 87	Jose Francisco Filho	Paulista	PB	Assentament o Curralinho	3	Trabalho	Equina	Fêmea	> 10 anos	Não		Não	13/07/2009
PBEE 116	Francisco de Assis Farias	Paulista	PB	Assentament o Curralinho	não informado	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Não	13/07/2009
PBEE 117	Francisco de Assis Farias	Paulista	PB	Assentament o Curralinho	não informado	Trabalho	Equina	Fêmea	1 a 2 anos	Não		Não	13/07/2009
PBEE 118	Francisco de Assis Farias	Paulista	PB	Assentament o Curralinho	não informado	Não informado	Equina	Macho	5 a 10 anos	Não		Não	13/07/2009

PBEE 121	Danilo S de Sousa	Paulista	PB	Assentament o Curralinho	Não informado	Não informado	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Não		Não	13/07/2009
PBEE 122	Jose Marra de Sousa	Paulista	PB	Assentament o Curralinho	Não informado	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não		Não	13/07/2009
PBEE 128	Ronald Linhares Bezerra	Paulista	PB	Fazenda Paxicu	14	Outro	Equina	Macho	1 a 2 anos	Sim	09/07/2009	Não	13/07/2009
PBEE 132	Ronald Linhares Bezerra	Paulista	PB	Fazenda Paxicu	14	Esporte	Equina	Fêmea	5 a 10 anos	Sim	13/07/2009	Não	13/07/2009
PBEE 133	Ronald Linhares Bezerra	Paulista	PB	Fazenda Paxicu	14	Reprodução	Equina	Fêmea	2 a 5 anos	Sim	14/07/2009	Não	13/07/2009
PBEE 134	Ronald Linhares Bezerra	Paulista	PB	Fazenda Paxicu	14	Esporte	Equina	Macho	1 a 2 anos	Sim	15/07/2009	Não	13/07/2009
PBEE 135	Ronald Linhares Bezerra	Paulista	PB	Fazenda Paxicu	14	Esporte	Equina	Macho	> 10 anos	Sim	16/07/2009	Não	13/07/2009
PBEE 162	Jose Saraiva	São Jose do Brejo do Cruz	PB	Fazenda Canadá	2	Trabalho	Equina	Macho	2 a 5 anos	Não sabe		Não	