Giovana Santos Caleiro

**Investigação da presença do retrovírus da Reticuloendoteliose aviária
(REV) e do anticorpo IgG do vírus Oeste do Nilo (WNV) em aves.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo para obtenção
de título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais
em Saúde Internacional
Orientadora: Dra Camila Malta Romano.

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Caleiro, Giovana Santos

Investigação da presença do retrovírus Reticuloendoteliose aviária (REV) e do anticorpo IgG do vírus Oeste do Nilo (WNV) em aves / Giovana Santos Caleiro. – São Paulo, 2018.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Camila Malta Romano

Descritores: 1. RETICULOENDOTELIOSE AVIÁRIA. 2. RETROVIRIDAE. 3. FLAVIVIRUS. 4. AVES. 5. BRASIL.

USP/IMTSP/BIB-06/2018.

*Dedico essa dissertação aos meus pais Cléia Santos Caleiro e Cláudio Rui
Mateus Caleiro e aos meus irmãos Júlia Santos Caleiro e Daniel Santos
Caleiro, por acreditarem em mim e a me apoiarem nesse sonho.*

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora e amiga Dra. Camila Malta Romano, muito obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos pela confiança e acima de tudo por estar presente nessa jornada. Muito obrigada.

A Dra. Carla Torres Braconni, por ter me ajudado a iniciar minha vida acadêmica e por ter me apresentado a Camila, você foi umas das responsáveis por eu ter chegado aqui.

Ao Dr. Dustin por ter dado a idéia inicial desse projeto, pela parceria e por ter me recebido tão bem nos Estado Unidos.

A Dra. Patricia Locosque Ramos, Dr. João Batista da Cruz, Dra. Ana Carolina Chagas e a Dra. Karin Kirchgatter e toda a equipe da Fundação Parque Zoológico pela colaboração e suporte nas amostras.

A Juliana Summa, ao veterinário Marcos e toda a equipe do DEPAVE – 3, pela colaboração e por me auxiliar nas coletas.

Aos Drs Jansen de Araújo e Dra Sandra pelas sugestões da qualificação.

Aos Drs. Tatiana Ometto, Jansen de Araujo, Luciano e o Proffessor Edison Luiz Durigon, pelas valiosas amostras.

A Mrs.Lilian Dias Orico pelas amostras e pelos contatos.

Ao Dr. Eduardo José Levi pela parceria em outros projetos e pelos ensinamentos.

Aos meus pais Cléia e Cláudio por acreditarem em mim, me apoiarem nessa jornada e acima de tudo, por todo o amor e carinho e por serem a minha inspiração.

Aos meu irmãos Júlia e Daniel, por todo amor e carinho.

Aos meu tios Josineide e Osvaldo, obrigada por me acolherem e a me ajudar em um dos momentos mais difíceis. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao team's Camila, Carol, Luíz, Paulo, Tina, Francielly, Felipe obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e por toda a ajuda ao longo desse trabalho.

Aos novos membros do team's Camila, Cibele e Lucas.

As minhas queridas amigas Barbára Brito e Carol Soares, obrigada por todo o apoio, carinho e amizade.

Ao meu amigo Fernando, obrigada pela sua admiração pelo meu trabalho, carinho e força.

Ao Anderson, obrigada por ajudar nos experimentos e pela amizade.

A FAPESP e a CAPES, pelo suporte financeiro e pela minha bolsa.

Ao funcionários da virologia, Dr.Cláudio, Dra.Clarisse, Marli, Cintia, Silvia, Lucy, Wilton, Tânia, Dra. Cristina Fink, Noely, Carol Mamana e Laura, obrigada pela amizade e por terem me recebido tão bem ao longo desses anos.

A Dona Sonia, Maria e Luciano por todo o suporte técnico.

E por fim ao Bruno Henrique Rodrigues, muito obrigada por ter feito parte da minha vida, por ter me apoiado e acreditado que um dia eu pudesse chegar aonde eu cheguei. Obrigada pela amizade, compreensão, carinho e força; no final seguimos caminhos diferentes, mas você fez parte disso também.

“O sucesso é a capacidade de ir a um fracasso ao outro sem perder o entusiasmo”

Winston Churchill

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 RETICULOENDOTELIOSE AVIÁRIA (REV)	7
2.2.1 Agente etiológico	7
2.2.2 Histórico	10
2.2.3 Diagnóstico	11
2.2.4 Transmissão	12
2.2.5 Impactos econômicos	13
2.2 VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL - (WNV)	13
2.2.1 Agente etiológico	13
2.2.2 Histórico	15
2.2.3 Transmissão e epidemiologia	18
2.2.4 Sintomatologia	20
2.2.5 Diagnóstico	21
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	28
5.2 AMOSTRAS E COLETA	28
5.3 EXTRAÇÃO DE DNA, QUANTIFICAÇÃO E PCR DE CONTROLE ENDÓGENO (CITOCROMO B)	30
5.4 PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA REV	31
5.5 PADRONIZAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL PARA REV	32
5.6 PCR Convencional fowlpox vírus (FPV)	33
5.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E SEQUENCIAMENTO SANGER....	35
5.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA	36
5.8 SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti- vírus WEST NILE	37
5.8.1 Detecção de anticorpos IgG por ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno</i>	37
5.8.2 Validação do teste de ELISA	37
5.8.3 EXTRAÇÃO DE RNA, cDNA e PCR CONVENCIONAL do VIRUS WEST NILE	38
6. RESULTADOS	41

6.1 CONTROLE ENDÓGENO POR PCR CONVENCIONAL	41
6.2 PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE REV	43
6.3 PCR EM TEMPO REAL PARA REV DAS AMOSTRAS DA CIDADE DE SÃO PAULO.	47
6.4 PCR de TEMPO REAL PARA REV DAS AMOSTRAS DO ESTADO DO PARÁ..	49
6.4.1 Sequenciamento dos fragmentos de gag, env, LTR/gag.	52
6.5 Determinação da integração do REV em Fowlpox vírus (FPV)	55
6.6 SOROLOGIA WEST NILE	57
6.6.1.ELISA.....	57
6.6.2 PCR convencional WEST NILE.....	58
7. DISCUSSÃO.....	60
7.1 REV	60
7.2 WNV	63
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
10. ANEXOS	86

EEE	Encefalomielite Equina Oriental
WNV	West Nile
ALV	Leucose Aviária
REV	Reticuloendoteliose Aviária
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
ZIKV	Zika vírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Env	Gene/Proteína do Envelope
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> ou Longas Repetições Terminais
Gag	Genes de capsídeo
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
CT	<i>Cycle Threshold</i> ou ciclo limiar
Pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrogeniônico
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
Pol	Polimerase
CSV	Vírus sincicial de galinha
SNV	Vírus da necrose do baço
DIAV	Vírus da anemia infecciosa do pato

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
NDV	Vírus de Newcastle
MDV	Mareck
HVT	Herpesvírus de peru
UTRs	<i>Untranslated Regions</i>
C	Capsídeo
prM	Pré-Membrana
OMS	Organização Mundial da Saúde
HI	Inibição de hemaglutinação
PRNT	Soroneutralização
JEV	Encefalite Japonesa
SLEV	Saint Louis
DEPAVE	Departamento de Parques e Áreas Verdes
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
cDNA	DNA complementar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
USA	<i>United States of America</i>
FPV	Fowlpox vírus
Pr-E	Proteína do Envelope
DO	Densidade Ótica
S/N	Samples/Negative
SNPs	Substituições de nucleotídeos na região do envelope
DENV	Vírus da dengue

ROCV	Vírus Rocio
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevencion</i>
CBRO	Comitê Brasileiro De Registros Ornitológicos
CGFAU	Coordenação Geral de Fauna
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> ou força relativa centrífuga
Gp90	Gene/envelope
APC-566	Cepa de REV
NS1	<i>Non-structural protein 1</i> ou proteína não estrutural 1
NS2a	<i>Non-structural protein 2a</i> ou proteína não estrutural 2a
NS2b	<i>Non-structural protein 2b</i> ou proteína não estrutural 2b
NS3	<i>Non-structural protein 3</i> ou proteína não estrutural 3
NS4a	<i>Non-structural protein 4a</i> ou proteína não estrutural 4a
NS4b	<i>Non-structural protein 4b</i> ou proteína não estrutural 4b
NS5	<i>Non-structural protein 5</i> ou proteína não estrutural 5

Nm	Nanómetro
%	Porcentagem
US\$	Dólar
ml	Mililitro
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
M	Mol
+	Soma
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
µg	Micromolar
g	gravidade
<	Inferior
>	Superior

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios de PCR convencional de citocromo B.	31
Tabela 2. Primers utilizados nos ensaios de amplificação do REV por qPCR e PCR convencional.	32
Tabela 3. Primers utilizados para amplificação do REV por PCR convencional.	33
Tabela 4. Primers utilizados nos ensaios de inserção do REV no fowlpox vírus por PCR convencional.....	34
Tabela 5. Primers utilizados para amplificação de Flavivirus por PCR convencional. .	39
Tabela 6. Determinação do cut-off da PCR em tempo real para REV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em decaplicatas. Cópias medidas em cp/mL.....	46
Tabela 7. Identidade genética no nível de nucleotídeos entre vírus brasileiros e cepas de referência.	53
Tabela 8. Resultado do ELISA de IgG WNV.	57

Figura 1. Mapa de principais rotas migratórias de aves nas Américas.....	3
Figura 2. Árvore filogenética da família Retroviridae. Atenção ao clado dos REV na porção superior da filogenia (terceiro retângulo cinza de cima para baixo), dentro do gênero Gammaretrovirus ¹⁶	8
Figura 3. Estrutura genômica do REV ¹¹	9
Figura 4. Distribuição mundial do REV até o ano de 2017.....	11
Figura 5. Árvore filogenética da família dos Flavivírus, evidenciando os diferentes gêneros incluindo o gênero Flavivírus, onde WNV se encontra no clado dos vírus transmitidos por mosquitos (em vermelho) ⁵²	14
Figura 6. Estrutura genômica do WNV. Acima, as regiões de proteínas estruturais e não estruturais e as NCRs 5' e 3'. Abaixo, as proteínas virais geradas por meio de processamento proteolítico ⁵⁷	15
Figura 7. Distribuição mundial do WNV e suas linhagens ⁷⁴	17
Figura 8. Ciclo biológico do vírus West Nile ⁵⁹	19
Figura 9. Locais das coletas de amostras. No estado do Pará, as amostras foram coletadas em 8 cidades diferentes na região norte do estado. Na cidade de São Paulo, as coletas foram realizadas em 4 locais distintos.	29
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose revelado com corante para DNA SyBrSafe. O gel mostra o resultado da PCR para citocromo B, com bandas na altura de 386 nucleotídeos. O peso molecular utilizado é de 100pb, presentes nos primeiros poços.	42
Figura 11. As amostras amplificadas a partir de DNA de ave (designadas Am1-6) e referências estão compreendidas nos ramos em vermelho. As amostras de DNA humano (Am7 e Am8), bem como suas referências, estão na parte inferior da árvore, em preto.	43
Figura 12. Amplificação da curva-padrão por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Cada ponto representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo), feitas em triplicata variando de 10E5 até 10E1.....	44
Figura 13. Amplificação de curva-padrão por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Cada ponto representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo), feitas em decuplicata variando de 10E8 até 10E2.....	45

Figura 14. Regressão linear da curva-padrão do plasmídeo de REV. Concentrações das diluições do plasmídeo (da esquerda para a direita): 100 cópias/mL, 1.000 cópias/mL, 10.000 cópias/mL, 100.000 cópias/mL, 1.000.000 cópias/mL, 10.000.000 cópias/mL e 100.000.000 có 45	45
Figura 15. Resultado falso positivo de duas amostras. A curva na cor azul mostra o controle positivo, e as verde e vermelha mostram as amostras suspeitas. 47	47
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose da PCR convencional para REV corado com SYbr Safe. Peso molecular de 100pb nos primeiros poços do gel. Notar que maioria das amostras não aparecem na mesma altura do controle positivo. 48	48
Figura 17. Alinhamento local obtido com a ferramenta Blastn. Notar que a sequência (query) submetida a análise de similaridade obteve score e e-vaues altos o suficiente (93 e 1e-15 respectivamente) com sequencias de DNA da espécie <i>Columba livia</i> (pombo-comum). 49	49
Figura 18. Resultado positivo para o REV de umas das amostras do estado do Pará. A curva na cor azul representa o controle positivo, e a curva da cor rosa, a amostra. 50	50
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose corado com SYbr Safe do PCR convencional para REV. Peso molecular de 100pb nos primeiros poços do gel. 50	50
Figura 20. Alinhamento global obtido com a ferramenta Blastn. Notar que a sequência (query) submetida a análise de similaridade obteve score alto o suficiente (955) com o REV..... 51	51
Figura 21. Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança mostrando as relações entre amostras do Brasil (nome em vermelho) e de outras regiões. As árvores foram feitas com fragmentos do envelope (A) e LTR/gag (B). Valores de bootstrap acima de 60%. 55	55
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose corado com SYbr Safe do PCR convencional para controle positivo de FPV. Peso molecular de 1000pb nos primeiros poços do gel. Amplificação de um fragmento de aproximadamente 500pb com duas concentrações de amostras. 56	56

Anexo 1. Tabelas de amostras de sangue e swab de cloaca.....	86
Anexo 2. Tabelas de amostras de soro.....	94
Anexo 3. Artigo	96
Anexo 4. Prêmio como melhor poster no congresso “World Congress on Virology & Infectious Diseases” em Novembro de 2017 em Miami - E.U.A.....	105

Caleiro, G.S., Investigação da presença do retrovírus da Reticuloendoteliose aviária (REV) e do anticorpo IgG do vírus Oeste do Nilo (WNV) em aves. (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

As aves podem carregar um grande número de patógenos. As aves migratórias, por viajarem longas distâncias, são as principais responsáveis pela disseminação de agentes infecciosos. Entre os agentes, destacam-se os vírus, como por exemplo o retrovírus da Reticuloendoteliose aviária (REV), amplamente distribuído; e o vírus da febre do Oeste do Nilo (WNV), uma virose reemergente, com caráter zoonótico. Os principais sintomas da Reticuloendoteliose aviária incluem anemia, doença de *Runting* e síndrome não neoplásica aguda. Já o agente etiológico da Febre do Nilo Ocidental, é o Flavivirus West Nile (WNV).. As aves são seus hospedeiros definitivos e os humanos são hospedeiros acidentais, podendo manifestar quadro febril, e em menor porcentagem, meningite e encefalite. Mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes spp* são os principais transmissores do vírus. Ao contrário do REV que não dispõe de evidências de sua circulação no Brasil, há evidências do WNV em aves e equinos e mais recentemente, em humanos. O objetivo desse trabalho foi investigar a presença do REV e do WNV em aves silvestres e de cativeiro da cidade de São Paulo e do Norte do estado do Pará. Sangue, soro e swab de cloaca foram coletados, totalizando mais de 1000 amostras. Através de técnicas moleculares foi possível detectar a presença do REV em 74 amostras (16%), todas do estado do Pará. O sequenciamento parcial dessas amostras e sua filogenia sugeriu que a migração de aves EUA-Brasil possa ter sido a rota utilizada. Através de ELISA anti-IgG de WNV, 4 amostras de São Paulo foram positivas. Apresentamos a primeira evidência do REV no país e sugerimos a presença do WNV no estado de São Paulo.

Descritores: Reticuloendoteliose aviária, REV, West Nile vírus, WNV, aves migratórias, Brasil.

Caleiro, G.S., Investigation of the presence of avian reticuloendotheliosis retrovirus (REV) and West Nile virus (WNV) IgG antibody in birds. (dissertation). São Paulo: Institute of Tropical Medicine of the University of São Paulo; 2018.

Birds can carry a large number of pathogens. The migratory birds are most responsible for the spread of infectious agents due to long distance travels. Among these pathogens, the most notable are viruses, such as the avian Reticuloendotheliosis retrovirus (REV), widely distributed; and the West Nile virus (WNV), a reemerging zoonotic disease. The main symptoms of avian reticuloendotheliosis include anemia, Runting's disease and acute non-neoplastic syndrome. The etiological agent of West Nile fever is Flavivirus West Nile (WNV). Birds are their definitive hosts and humans are accidental hosts, which generally present febrile symptoms, but at less proportion,, meningitis and encephalitis. Mosquitoes of the genus *Culex* and *Aedes* spp are the main vectors of the virus. Differently from the REV that has no evidence of its circulation in Brazil, there is evidence of WNV in birds and horses and more recently in humans. The objective of this work was to investigate the presence of REV and WNV in wild birds and captive birds from the city of São Paulo and Northern from Pará State. Blood, serum and cloacal swab were collected, resulting in more than 1000 samples. Through molecular techniques it was possible to detect the presence of REV in 74 samples (16%), all from the State of Pará. The partial sequencing of these samples and their phylogeny suggested that the migration of US-Brazil may have been the route for the virus entry. Through anti-WNV IgG ELISA, 4 samples from São Paulo were positive. We present the first evidence of REV in the country and suggest the presence of WNV in the state of São Paulo.

Key words: Reticuloendotheliosis virus, REV, West Nile virus, WNV, migration birds, Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Cada espécie de ave, selvagem ou doméstica, além da relevância ecológica, tem importância na saúde pública, pois pode abrigar um grande número de microrganismos^{1,2}. Em particular, destacam-se as aves migratórias, pois estas acabam se tornando vetores de longo alcance e são responsáveis pela ampla distribuição geográfica de vírus importantes como a encefalomielite equina oriental (EEE), o alfavírus Sindbis, além de flavivírus como West Nile (WNV) e outros (influenza A e vírus da doença de Newcastle). Além dos vírus, as aves são ainda vetores de bactérias de importância para a saúde animal e humana como *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* s.l, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium avium*, e protozoários^{2,3}.

No que diz respeito a transmissão desses patógenos, as aves podem atuar de três maneiras: 1) como vetores biológicos: servindo como hospedeiro para microrganismos e permitindo a multiplicação destes no animal; 2) como vetores mecânicos: somente albergando os microrganismos, porém sem que haja amplificação nas aves e 3) servindo como hospedeiros para ectoparasitas, que por sua vez são infectados por microrganismos³.

O Brasil é considerado o segundo país no mundo em termos de diversidade de espécies de aves, com aproximadamente 1.900 espécies documentadas^{4,5}. Além disso, o país está na rota de muitas espécies migratórias, possuindo sítios de reprodução de espécies advindas de outras regiões, como da região circumpolar relacionada à América no Norte e Groenlândia (aves setentrionais), ou do sul da América do Sul e Antártida (meridionais)⁶.

Figura 1. Mapa de principais rotas migratórias de aves nas Américas.

Todos os modelos vetoriais aviários possuem importante papel em dois principais tipos de transmissão: enzooses, doenças exclusivas de animais; e zoonoses doenças transmitidas de animais para seres humanos. Como exemplo de enzooses, podemos citar as neoplasias causadas por vírus como a doença de Marek, Leucose aviária e Reticuloendoteliose aviária⁷. De fato, a maioria das neoplasias em aves, comerciais ou de vida livre, estão associadas a vírus oncogênicos, principalmente herpesvírus e retrovírus.

Até onde se sabe, tumores induzidos por retrovírus são causados por membros do grupo da Leucose Aviária (ALV) ou pelo vírus da Reticuloendoteliose Aviária (REV)⁷. Algumas enzooses representam sérios problemas de saúde pública, outras, apresentam particular importância econômica. Destaca-se, nesse sentido, a Reticuloendoteliose Aviária, causada por um retrovírus (REV) e de extrema relevância econômica e científica. Os seus efeitos são mais notavelmente sentidos em aviários pelo seu grande potencial epidêmico e por levar a grandes perdas econômicas nos plantéis acometidos.

A presença desta enfermidade representa uma preocupação econômica bastante séria, principalmente como contaminante de produtos biológicos produzidos em células de embrião de galinha ou tecidos, como vacinas por exemplo. Ou ainda, como uma barreira para as exportações de plantel para determinados países.

Por outro lado, as doenças denominadas zoonoses podem levar a grandes epidemias e pandemias como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), Febre do Nilo Ocidental (WNV), Gripe aviária além de outras infecções, virais ou não^{2,8}.

A Febre do Nilo Ocidental em particular, causada por um *Flavivírus* (WNV) é uma doença amplamente difundida pela América do Norte e Central e que pode se tornar um grave problema também no Brasil. De fato, há cada vez mais evidências de que o WNV já está presente em nosso meio. Mas, por razões ainda não bem compreendidas, não se espalhou como os demais *Flavivírus* como Dengue, Zika vírus (ZIKV) e o vírus da Febre amarela, que

mesmo no ciclo silvestre tem causado problemas no Brasil novamente nestes
últimos meses.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RETICULOENDOTELIOSE AVIÁRIA (REV)

A Reticuloendoteliose é uma doença oncogênica e imunossupressora, e está associada a tumores de células hematopoiéticas^{9,10}. É uma doença amplamente distribuída, que acomete aves domésticas tais como perus, galinhas, patos, gansos, pavões, galinhas de pradaria e outras espécies de aves no mundo todo¹⁰⁻¹³.

A Reticuloendoteliose faz parte de uma síndrome cujos principais sintomas são: anemia, doença de refugo, síndrome não neoplásica aguda que infecta principalmente aves jovens, resultando em imunossupressão e alta taxa de mortalidade. Além desses sintomas, as aves infectadas desenvolvem imunodepressão humoral e celular¹⁴. Em aves adultas, ocorre atrofia acentuada de tecidos linfóides e neoplasia em células do sistema reticuloendotelial e/ou linfoma de células B e T^{10,15,16}. Em galinhas observa-se perda de peso, espessamento dos nervos periféricos e severa atrofia da bursa de Fabricius e do timo^{17,18}. Também causa neoplasias em gansos, faisões, perdizes e patos da espécie Barbary⁷. Em perus, foi reportada a ocorrência de linfomas de células T induzidos pelo REV, envolvendo o timo e outros órgãos¹⁴. Não existe nenhum tratamento para o REV, mas é possível que algumas aves acometidas consigam se recuperar da doença¹⁰.

2.2.1 Agente etiológico

O agente etiológico da Reticuloendoteliose é um vírus de mesmo nome (vírus da Reticuloendoteliose aviária - REV) de genoma de RNA pertencente à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e gênero *Gammaretrovirus* (Figura 2)^{19,20}. O gênero *Gammaretrovirus* é conhecido por estar presente em mais de uma classe de vertebrados²¹.

Figura 2. Árvore filogenética da família *Retroviridae*. Atenção ao clado dos REV na porção superior da filogenia (terceiro retângulo cinza de cima para baixo), dentro do gênero *Gammaretrovirus*¹⁶.

O REV possui genoma de cerca de 8300 nucleotídeos, com aproximadamente 10 nm de diâmetro e é classificado como retrovírus simples, ou seja, codifica somente genes de capsídeo (gag), polimerase (pol) e envelope (env), flanqueado por regiões repetitivas longas (LTRs), que atuam como promotores de transcrição (Figura 3)^{10,11,22}. Assim como outros membros da família Retroviridae, o REV se integra no genoma do hospedeiro, se tornando permanentemente um provírus^{9,10}.

Figura 3. Estrutura genômica do REV¹¹

Apesar de acometer aves, o REV é na verdade mais estreitamente relacionado com o vírus Mamalian tipo C do que com outros retrovírus aviários como o da leucose aviária, sendo imunologicamente, morfológicamente e estruturalmente distinto do grupo desses vírus²³⁻²⁵. Ainda, por ter a capacidade de infectar algumas linhagens de células de mamíferos, suspeitou-se que o REV poderia ser originado de vírus de mamíferos e não de aves^{26,27}. De fato, Niewiadomska¹⁶ demonstraram através de análises filogenéticas que o vírus da Reticuloendoteliose é de fato um vírus originário de mamíferos, tendo sido acidentalmente introduzido em aves durante experimentos com *Plasmodium* (*Plasmodium lophurae*) em 1930.

Há uma certa variedade de cepas de REV circulantes: REV-T defeutivo que causa neoplasias celulares agudas²⁸, REV-A não defeutivo, responsável pela doença de Runting e neoplasia crônica, vírus sincicial de galinha (CSV),

vírus da necrose do baço (SNV) e anemia infecciosa do pato (DIAV)^{10,29}, vide Figura 2.

2.2.2 Histórico

O REV foi isolado e identificado pela primeira vez em 1958, a partir de amostras de pele lesionada de perus nos Estados Unidos³⁰. Posteriormente, na Austrália, o vírus foi encontrado em patos no estado de Queensland^{19,31}.

Em galinhas, o vírus foi isolado em diversos países, como por exemplo no Egito²⁴ e em Taiwan¹¹. Na China, em 2009, Wang et. al.¹¹, isolaram o vírus de amostras de sangue de galinhas. Subsequentemente, outros grupos demonstraram a presença do vírus em galinhas na China, onde há uma grande preocupação econômica e comercial devido a exportação de frangos^{13,32}. Posteriormente, inquéritos epidemiológicos demonstraram que infecções por REV em galinhas na China são comuns³³.

Nos Estados Unidos em 2006, o agente foi isolado de galinhas de pradaria (aves silvestres em risco de extinção), mostrando que o vírus também está presente em aves silvestres³⁴. Ainda nos Estados Unidos, em 2010, o vírus foi encontrado em três estados, Califórnia, Alabama e Texas. Os isolados nos três estados de REV em várias espécies estavam intimamente relacionados com a cepa CSV³⁵.

Em 2013 o vírus foi isolado de aves silvestres das ordens Anseriformes e Passeriformes no nordeste da China²⁸, em perdizes chinesas³⁶ e em 2014 o vírus também foi isolado de amostras de patos selvagens (*Anas Platyrhynchos*) infectados com a estirpe REV DBYR1102, também no nordeste da China³³.

Na América do Sul praticamente não há registros da sua circulação, com exceção de um único estudo em 2013, onde Buscaglia relatou a presença do REV em uma contaminação concomitante com Marek em galinheiros de uma província de Buenos Aires, na Argentina³⁷.

Por fim, o mapa abaixo (Figura 4) demonstra todos os países onde o REV foi identificado.

Figura 4. Distribuição mundial do REV até o ano de 2017.

2.2.3 Diagnóstico

A patologia dos tumores induzidos por REV, particularmente aqueles de natureza linfoproliferativa, pode ser confundida com a de tumores vistos na doença de Marek e leucose linfóide, o que impossibilita a diferenciação histopatológica entre estas doenças^{10,22}.

Uma das formas diagnósticas capazes de diferenciar vírus oncogênicos aviários é baseado no isolamento do agente³⁸. Entretanto, a técnica de isolamento é laboriosa e demorada, mesmo utilizando sistemas permissíveis, a adaptação do vírus de campo ao sistema *in vitro* pode ser complicada para certos agentes^{12,38}.

Além do isolamento, existem outros métodos para o diagnóstico do REV: imuno-histoquímica, que pode ser usado para o diagnóstico diferencial de vírus oncogênicos aviários. Para isso são necessários anticorpos específicos contra os vírus que se busca; imunofluorescência indireta, porém sem sucesso para a detecção de infecções ativas^{14,34,39}; e métodos mais rápidos como os sorológicos, visando a detecção de anticorpo anti-REV e métodos moleculares.

O teste de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) permite a detecção de anticorpos circulantes contra o REV¹⁰. A vantagem desse sistema é que não há necessidade de a infecção estar ativa, e independe de carga viral/proviral.

Dentre os diagnósticos moleculares, a PCR (reação em cadeia da polimerase) é a mais utilizada. A PCR, que pode ser do tipo convencional ou em tempo real (qPCR), é um método *in vitro* conveniente para a amplificação específica do DNA alvo⁴⁰. Aliás, com a qPCR não só é possível diferenciar o REV de outros vírus que causam tumor, mas também detectar as diferentes cepas de REV em qualquer tipo de amostra^{10,40}. A qPCR apresenta vantagens em relação a convencional, como maior sensibilidade e especificidade (quando utilizada sonda específica) e a possibilidade de quantificação em tempo real^{40,41}.

2.2.4 Transmissão

A transmissão do REV ocorre tanto de forma vertical como horizontal, e embora a horizontal seja a mais comum, se com viremia persistente, os animais podem transmitir o vírus aos progêntos, mas geralmente o fazem em baixa frequência^{10,42}. A transmissão horizontal geralmente ocorre por meio de água e alimentos contaminados, camas aviárias e ainda pelo contato entre aves, uma vez que o vírus é eliminado por excrementos e secreções orais e nasais^{12,19}.

Outro modo de transmissão sugerido é via picadas de insetos hematófagos, que serviriam como vetores mecânicos^{12,43}. Mesmo o REV já tendo sido isolado de mosquitos da espécie *Culex annulirostris* que tiveram contato com galinhas infectadas⁴³, a transmissibilidade por essa via ainda é alvo de discussão.

Além dos meios já citados, pode ocorrer a contaminação acidental em vacinas de vírus vivos produzidos em tecido de galinhas para uso veterinário ou até mesmo humano¹¹. De fato, já foram reportadas contaminações em vacinas de buba aviária e de doença de Marek^{7,11,18}.

O REV pode também interagir com outros vírus³², integrando-se nos seus genomas (tanto *in vivo* como *in vitro*), como demonstrado com o herpesvírus aviário responsável pela doença de Marek e o Fowlpox virus, responsável pela Varíola Aviária (também chamada de Bouba aviária)^{24,44}. Essa capacidade de se integrar no genoma de outros vírus representa um possível mecanismo de dispersão, através do qual estes agentes conseguem entrar em contato com espécies não inicialmente suscetíveis ao REV, e dessa forma, garantir seu espalhamento mais eficaz^{44,45}.

2.2.5 Impactos econômicos

As principais preocupações econômicas advindas da presença do vírus da Reticuloendoteliose são as contaminações de vacinas e a barreira de exportação de reprodutores³⁵, já que a exportação de aves soropositivas é proibida em certos países¹⁰.

Por se tratar de uma doença imunossupressora, essa enfermidade representa um grande problema sanitário, uma vez que em frangos de corte ocorre uma inibição grave e persistente de resposta humoral à vacina contra Influenza aviária, diminuindo sua eficácia protetora⁴⁶. Além disso, o vírus é capaz de suprimir resposta humoral contra os vírus de Newcastle (NDV)⁴⁷, de Marek (MDV)¹⁸ e herpesvírus de peru (HVT)⁴⁸.

2.2 VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL - (WNV)

2.2.1 Agente etiológico

O agente etiológico da Febre do Nilo Ocidental (vírus do Oeste do Nilo – WNV) pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, que contém 70 membros, incluindo Dengue, Febre Amarela, Zika, Encefalite Japonesa entre outros (Figura 5) onde a maioria é transmitida por mosquitos e carrapatos⁴⁹⁻⁵¹.

Figura 6. Estrutura genômica do WNV. Acima, as regiões de proteínas estruturais e não estruturais e as NCRs 5' e 3'. Abaixo, as proteínas virais geradas por meio de processamento proteolítico⁵⁷.

2.2.2 Histórico

A Febre do Nilo Ocidental é uma doença reemergente, com caráter zoonótico, encontrada principalmente em regiões temperadas da Europa e da América do Norte⁵⁸. É uma doença que acomete aves, répteis e mamíferos, incluindo animais de fazendas, de estimação e de vida selvagem⁵⁸.

O vírus foi isolado e identificado pela primeira vez do sangue de uma mulher, com quadro febril, em uma província de Uganda em 1937, conhecida como West Nile (Oeste do Nilo), por isso a denominação do vírus⁵⁹. Porém, pressupõe-se que o WNV é mais antigo do que se tem informação. Existe uma teoria que Alexandre o Grande se infectou pelo vírus na antiga Babilônia, atualmente o Iraque, vindo a óbito por encefalite depois de duas semanas de febre. Alguns suspeitavam que o motivo da morte ocorrera por envenenamento por plantas tóxicas, ou por contaminação parasitária, mas reforçando a teoria do agente patogênico ser o WNV, corvos se bicavam e caíam mortos na frente de Alexandre, comportamento similar a pássaros durante o surto de 1999 em Nova York⁶⁰.

Posteriormente, na década de 50, surtos importantes foram identificados como sendo causados pelo WNV em Israel, e nos anos de 1952-1954 no Nilo Ocidental, no Egito e Sudão do Sul, o vírus foi amplamente disseminado

Inquéritos sorológicos sugeriram que cerca de 61% dos 1168 sangues humanos coletados no Egito e 40% dos 350 coletados no Sudão eram positivos para o WNV⁶¹. Em 1974, o vírus também foi isolado na África do Sul^{58,62}. Após isso, o WNV foi isolado em vários países sendo reconhecido como um dos *Flavivírus* mais difundidos, com ampla distribuição geográfica, incluindo África e Eurásia⁶³. Na América do Norte, o WNV foi detectado pela primeira vez em 1999, em Nova York em um grande surto, com 67 pessoas infectadas e 21 mortes⁵⁹. Evidências sugeriram que a epizootia do WNV começou no final de julho de 1999, quando as mortes de vários corvos (*Corvus brachyrhynchos*) e outras aves foram observadas no distrito de Queens, Nova York - EUA, e mais tarde em outros bairros e municípios vizinhos⁶⁴. Durante essa epidemia, muitas espécies de aves exóticas morreram, incluindo flamingo-chileno (*Phoenicopterus chilensis*), cormorão (*Phalacrocorax bougainvillei*), águia-americana (*Haliaeetus leucocephalus*), pica-pau (*Pica pica*), pato-de-asas-bronze (*Anas specularis*), faisão-do-nepal (*Lophophorus impeyanus*), tragopan-de-barriga-cinza (*Tragopan blythii*) e coruja-das-neves (*Nyctea scandiaca*)⁶⁵.

Em um estudo no *Bronx Zoo/Wildlife Conservation Park* durante o surto de Nova York foram investigadas 368 amostras de aves, sendo 89 espécies de 32 famílias e 17 ordens. A soroprevalência entre as espécies estudadas foi de 34%. As aves da ordem Strigiformes (corujas) apresentaram maior soroprevalência (83%) e os e os Columbiformes (pombos) os índices mais baixos (20%)⁶⁶.

Depois do surto, o vírus se espalhou pelos Estados Unidos e rapidamente pelo continente Norte Americano, levando a um grande número de manifestações neurológicas em humanos⁶⁷. Desde então, o vírus pode ser encontrado em praticamente todo o continente Norte Americano⁶⁷.

Lanciotti et al., conseguiram mostrar que os isolados virais do surto de Nova York possuem 99,8% de similaridade genômica à linhagem isolada de WNV do cérebro de um ganso morto em Israel em 1998⁶⁸, refletindo o rápido espalhamento do vírus por continentes distintos. Em seguida, ainda em Israel, em 2000 nos meses de Agosto a Outubro, o país teve mais de 417 casos de WNV⁶⁹.

Na Europa o vírus foi encontrado principalmente em aves na Áustria⁷⁰, em gansos domésticos na Hungria⁷¹, na Itália, em 2008 e 2009 em amostras positivas de humanos que apresentaram sintomas característicos do WNV⁷² e em aves na Alemanha⁷³, além de outros países (Figura 7)

Figura 7. Distribuição mundial do WNV e suas linhagens⁷⁴.

Na América Latina o vírus foi detectado pela primeira vez na Jamaica, ilhas Cayman em 2001 e em 2005 no México⁶⁷. Na América do Sul a primeira evidência do WNV foi na Colômbia, em amostras de cavalos com sorologia positiva⁷⁵. Depois, na Argentina⁷⁶ o vírus foi identificado em amostras de três cavalos que morreram por encefalite. Posteriormente, o vírus foi encontrado na Argentina novamente, em amostras de cavalos e de aves⁷⁷. Na Venezuela em 2007, amostras de aves e cavalos apresentaram sorologia positiva⁷⁸.

A primeira evidência do WNV no Brasil foi documentada em 2010, em amostras de cavalos com sorologia positiva no estado do Mato Grosso do Sul⁷⁹. Mais tarde, mais amostras positivas foram identificadas no Pantanal, sendo que de 38 amostras de soro de cavalos, 23 foram positivas para o anticorpo do WNV e de 31 amostras de galinhas, 1 foi dada como positiva⁸⁰. No

Rio de Janeiro, de um total de 37 amostras de adultos com quadro de meningite/encefalite, apenas uma amostra foi positiva no teste de Elisa IgG para o WNV, porém a sorologia para dengue também fora positiva, tornando o diagnóstico impossível dado a possibilidade de reação de cruzamento⁸¹.

Em 2013, Ometto et al., identificaram anticorpos de WNV em equídeos, no estado de Mato Grosso (1,8% sendo 3 cavalos e 1 mula de 217 amostras)⁸².

Por fim, em 2014 um trabalhador da zona rural da cidade de Aroeiras do Itaim, no estado de Piauí, apresentou sintomas de encefalite. O teste de IgM (MAC-ELISA) para WNV foi realizado e o resultado foi positivo. Posteriormente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) confirmou o primeiro caso de WNV humano no Brasil⁸³.

2.2.3 Transmissão e epidemiologia

Mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* spp são os principais responsáveis pelo ciclo, que se mantém principalmente em aves^{63,84}. Humanos e cavalos são hospedeiros acidentais do vírus (Figura 8)⁸⁵.

No oeste dos Estados Unidos, o mosquito *C. tarsalis* é o principal vetor do WNV e se alimenta do sangue de uma variedade grande de espécies de aves e mamíferos⁸⁶. O vírus WN foi isolado de muitas outras espécies de mosquitos, mas a capacidade vetorial destes nem sempre foi demonstrada⁸⁷.

Figura 8. Ciclo biológico do vírus West Nile⁵⁹.

Além de ser transmitido por numerosas espécies de mosquitos, o WNV pode também ser considerado um generalista ecológico por ter a capacidade de infectar diversos hospedeiros vertebrados⁷⁴. O vírus já foi isolado de mais de 150 espécies tanto silvestres como domésticas em nível mundial, das ordens Anseriformes, Casuariiformes, Strigiformes e Psittaciformes^{88, 89}.

Além de aves e equinos, outros vertebrados também são suscetíveis a infecção por WNV, além de mamíferos como ovelhas⁹⁰, cachorro (*Canis familiares*), lobo (*Canis lupus*), lhama (*Lama glama*), asno (*Equus asinus*), macaco-rhesus (*Macaca mulatta*), morcego (*Eptesicus fuscus*), urso-pardo (*Ursus americanus*) entre outros⁹¹. Em répteis, foi encontrados em aligátors americanos (*Alligator mississippiensis*) e lagarto-monitor (*Varanus salvator*)⁹². Foi ainda observado que jacarés juvenis tem altos níveis e extensa viremia, podendo chegar até 2 semanas, podendo desempenhar portanto um papel importante na transmissão de WNV⁹³.

Nas aves a viremia pode durar de poucos dias até meses, a depender da espécie^{94,95}, representando uma ameaça à saúde pública e a saúde animal,

principalmente pelo fato de aumentar as chances de transmissão do vírus a um mosquito suscetível e completar o ciclo^{58,95,96}.

O surgimento e espalhamento do WNV nas Américas alertou o mundo para a importância epidemiológica deste vírus, visto que seus hospedeiros, acidentais ou não, bem como seus vetores são amplamente difundidos⁸⁸.

2.2.4 Sintomatologia

Os sintomas causados pelo WNV são diferentes para cada espécie. Nas aves, os sintomas principais incluem depressão, letargia, penas arrepiadas, além de sinais neurológicos que incluem ataxia, tremores, postura anormal da cabeça, convulsões e hemorragias^{59,65,88}.

Algumas aves no entanto são mais susceptíveis a infecção. Por exemplo, espécies da família dos corvídeos (gralhas e corvos) quando infectadas, mais de 50% que manifestam sinais clínicos vão a óbito⁸⁸. Entre as espécies domésticas, os gansos são os mais susceptíveis e frequentemente desenvolvem doença neurológica^{88,97}. Por outro lado, algumas espécies de aves são assintomáticas, sendo apenas portadoras do vírus⁹⁸. Além disso, como as aves fazem parte do ciclo de amplificação do vírus, acabam atuando também como incubadoras, facilitando a propagação do mesmo para humanos e outras espécies⁹⁴.

Em humanos, por exemplo, os sintomas variam desde febre passageira, vômito, cefaleia, mialgia, faringite, fraqueza muscular, diarreia e conjuntivite, até possível evolução para quadros neurológicos como encefalite e meningite^{69,98}. Aproximadamente 80% das infecções são assintomáticas e em idosos ou imunossuprimidos a doença pode desenvolver para quadros mais graves⁹⁹.

Os equídeos são particularmente susceptíveis a infecção. Os sintomas mais comuns são mudanças de comportamento (sonolência, depressão), fraqueza, bruxismo, andar em círculos e sinais neurológicos que incluem fasciculações musculares e paralisia dos membros. Frequentemente desenvolvem quadro febril agudo que muitas vezes culmina com morte por infecção neurológica^{62,88}. A mortalidade é aproximadamente de 1:3 cavalos que

apresentam sintomas¹⁰⁰. Com isso, no Estados Unidos existem programas de vacinação para cavalos¹⁰¹.

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico do vírus em equídeos pode ser feito por sorologia para a detecção IgM na fase aguda ou de ácidos nucleicos virais a partir de amostras do encéfalo de animais que vão a óbito^{60,102}.

O método de diagnóstico do WNV depende do estágio da doença. Para a fase inicial os métodos mais utilizados são qPCR para detecção do RNA viral, ou anticorpos IgM, após 6 a 14 dias da infecção. No geral, testes sorológicos podem ser utilizados para a detecção de IgG ou IgM, discriminando ou não a classe de anticorpos, como ELISA, inibição da hemaglutinação (HI) ou soroneutralização (PRNT)^{100,103}. Porém, podem ocorrer reações cruzadas com outros *Flavivirus* em certos testes de detecção de anticorpos, como por exemplo com o vírus da encefalite japonesa (JEV) e de Saint Louis (SLEV).

3. JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças que acometem as aves, algumas apresentam importante impacto econômico e de saúde pública. Destacam-se em particular a Reticuloendoteliose Aviária, causada por um retrovírus, que é de extrema relevância econômica e científica; e a Febre do Nilo Ocidental, difundida pela África, América do Norte e Central e que pode se tornar um sério problema também no Brasil.

Até o presente momento não há evidências, tampouco estudos na literatura científica, que demonstrem a circulação do REV no país. Na América do Sul, o vírus foi detectado apenas na Argentina, cujo relato consta apenas de um único trabalho publicado. A Argentina é rota de migração de aves entre Américas do Norte e Sul, e aves que chegam ao Brasil podem fazer parada neste país, refletindo o perigo iminente em que o Brasil se encontra. É de conhecimento geral que em países da América do Norte e Ásia o vírus já é uma preocupação econômica e ecológica, causando problemas e transtornos para produtores e para a fauna local. A América do Sul recebe anualmente centenas de espécies de aves migratórias provenientes do hemisfério norte, principalmente o Brasil devido a oferta de alimentos para essas aves.

Ainda, os passeriformes e alguns anseriformes podem se aproximar mais das áreas urbanizadas por estarem associados a ambientes mais terrestres. Além do fato de o Brasil possuir mais de 2000 espécies de aves silvestres, muitas sob-risco de extinção¹⁰⁴, há de se considerar que somos um dos maiores exportadores de carne de frango e o segundo maior produtor mundial¹⁰⁵. Em 2017, entre Janeiro e Maio, o Brasil exportou ao equivalente a 1,75 milhões de toneladas de carne de frango, com receita total de US\$596,9 milhões.

Além dos evidentes problemas econômicos que o Brasil enfrentará se o vírus chegar ao país, o entendimento das possíveis portas de entrada, bem

como as características genéticas desse vírus justificam a proposta de realizar um inquérito em aves do nosso meio para a presença do mesmo. Seu modo de transmissão por contato direto entre aves, fômites e a provável transmissão via inseto vetor (abundante em nosso país) torna imprescindível esse questionamento.

Ainda a respeito de transmissão de vírus via vetor, no território Brasileiro já foram descritos mais de 200 arbovírus, sendo muitos deles *Flavivírus*, e responsáveis por doenças em humanos.

Ao contrário do REV que ainda não dispõe de evidências de sua circulação no Brasil, indícios da presença do WNV são mais concretos, tendo sido detectado em aves e equinos e recentemente, o primeiro caso de sorologia positiva em humanos fora reportado no país.

As populações de aves residentes (sentinelas) e migratórias que fazem parte da população do Parque Zoológico de São Paulo e do Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE) da secretaria do Verde e do Meio Ambiente da prefeitura municipal de São Paulo são ideais para esse tipo de investigação. Diversas ordens da classe das aves são residentes permanentes, e a grande maioria entra em estreito contato com aves que apenas nidificam em regiões próximas, ou fazem paradas durante suas rotas de migração. Já as amostras do norte do Pará são provenientes de aves selvagens, ou seja aves que possuem contato direto com aves migratórias, pois essas regiões são locais de parada dessas aves que vem da América do Norte.

Portanto, com base nos levantamentos de dados relatados aqui, neste trabalho consideramos que é de grande importância investigar a presença dos vírus do WNV e da Reticuloendoteliose aviária em espécies que estão em território nacional.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal investigar a presença do vírus da Reticuloendoteliose aviária (REV) em aves silvestres e de cativeiro da cidade de São Paulo e no Norte do estado do Pará.

Além disso, foi investigada a presença de anticorpos IgG anti- vírus do West Nile (WNV) em aves silvestres e de cativeiro da cidade de São Paulo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar ensaios de PCR em tempo real para o REV em amostras biológicas de aves.
2. Determinar o status sorológico para o vírus WNV nas aves estudadas.

No caso da presença destes vírus nas aves amostradas:

3. Sequenciar o genoma parcial para a caracterização genética da(s) cepa(s) circulante no nosso meio.
 4. Estimar sua(s) prevalência(s).
-

5. MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP).

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto de Medicina Tropical sob o número 000283A e teve a licença concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob os números 45527-2, 54616-1 e 201/2006 CGFAU.

5.2 AMOSTRAS E COLETA

Amostras de sangue e *swab* de cloaca foram obtidas de aves da cidade de São Paulo e amostras de cDNA do estado do Pará. Na cidade de São Paulo, onde as coletas se sucederam em quatro parques, com o total de 593 amostras. As amostras foram obtidas no parque Ibirapuera (107 amostras provenientes de cisne-negro e ganso) com autorização do DEPAVE-3; Fundação Parque Zoológico de São Paulo (309 amostras com DNA já extraído e doadas pelo parque, pertencentes a 18 ordens da classe das aves), parques Anhanguera e Castanheira (177 amostras, estas cedidas pelo DEPAVE-3), em sua maioria da ordem dos Passeriformes de vida livre.

Além de amostras da cidade de São Paulo, 459 amostras de cDNA advindas do norte do estado do Pará foram cedidas pelos pesquisadores Dr. Jasen Araújo e Dra Tatiane Ometto. A maioria das amostras foram oriundas de pato-selvagem e peru-selvagem. Mais informações sobre as espécies e sobre as coletas se encontram no anexo 1 no final desse documento. A Figura 9 mostra os locais de amostragem nas regiões norte e sudeste do país.

Figura 9. Locais das coletas de amostras. No estado do Pará, as amostras foram coletadas em 8 cidades diferentes na região norte do estado. Na cidade de São Paulo, as coletas foram realizadas em 4 locais distintos.

As amostras foram classificadas em:

- Grupo de aves sentinelas;
- Grupo de aves silvestres de cativeiro;
- Grupo de aves silvestres de vida livre.

Durante as coletas no Parque do Ibirapuera, as aves eram mantidas presas em cercado na beira do lago do parque e capturadas utilizando rede de alçapão. Posteriormente as aves foram pesadas para controle interno e a retirada do sangue realizada pelas patas dos animais. Foram separadas duas alíquotas, uma de sangue total em tubo com anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) e uma de 2ml sangue total em tubo seco para a realização dos testes sorológicos. Após a separação, as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C.

Além das amostras extraídas, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo doou cerca de 70 amostras de soro de aves. A lista de espécies e quantidade de amostras para cada espécie se encontra no anexo B.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA, QUANTIFICAÇÃO E PCR DE CONTROLE ENDÓGENO (CITOCROMO B)

As primeiras tentativas de extração de DNA total foram feitas com a utilização do Kit QIAamp® DNA mini kit (Qiagen®). Porém, com o uso deste kit não obtivemos sucesso, uma vez que as hemácias de aves, nucleadas, aumentam demasiado a quantidade de DNA liberada durante a lise, tornando-se impossível dar continuidade as demais etapas do kit.

O método de extração adotado portanto, foi o fenol-clorofórmio. O protocolo utilizado para a extração por fenol-clorofórmio utilizada consistiu em: Em 250 µL de sangue total de ave, adiciona-se 250 µL de solução de Proteinase K. Incuba-se a mistura a 56 °C por 10 minutos para a lise. Em seguida, adiciona-se 500 µL de fenol + clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1), e centrifuga-se a 21.130 RCF por 10 minutos. Então, nota-se a separação em 2 fases aquosas, sendo a superior onde se encontra o DNA. Este é então transferido para outro tubo e adiciona-se novamente 500 µL de fenol/clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1). Centrifuga-se novamente a 21.130 RCF por 10 minutos, transfere-se novamente o sobrenadante para um novo tubo e, para limpeza final do DNA, adiciona-se 500 µL de clorofórmio, 50 µL de Acetato de Sódio (3M), 1mL de Etanol 100 % gelado e 2 µL de glicogênio. Incuba-se a mistura a -20°C *overnight* ou por 2 horas a -80°C. Uma centrifugação a 21.130 RCF por 30 minutos é feita e despreza-se o sobrenadante. Após isso, 500 µL de Etanol 70% gelado é adicionado para lavar o *pellet* e nova centrifugação a 21.130 RCF por 30 minutos é realizada. Por último despreza-se o sobrenadante e dilui-se o *pellet* em 50 µL de água deionizada. O DNA extraído foi quantificado no aparelho NanoDrop (Thermo®) e todas as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

Foi padronizado um PCR convencional para controle endógeno a partir do citocromo B mitocondrial de aves. A reação foi preparada com 2,5 µL de

Buffer (10x), 1 nM de $MgCl_2$, 2mM de dNTP, 15,2 μL de H_2O , 1 unidade de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de cada *primer* e 3 μL de amostra. Os parâmetros de ciclagem foram: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 10 minutos para extensão final. Os *primers* utilizados para essa reação foram obtidos do trabalho de Kocher et.al.¹⁰⁶ e amplificam um fragmento de 386 pares de base (

Tabela 1)

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios de PCR convencional de citocromo B.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
Cyt B-L14841	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	106
Cyt B H15149	5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3	

5.4 PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA REV

Para padronizar a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para o REV construímos uma curva padrão com plasmídeo sintetizado comercialmente pela empresa GenScript (USA), contendo uma região conservada de 200 nucleotídeos do envelope viral em quantidades conhecidas. Isso permitiu que fosse determinado o limite de detecção em número de cópias das amostras testadas.

Para a realização das curvas, foi realizada a conversão de massa (μg) em cópias utilizando a seguinte fórmula: .

Fórmula: Peso em Daltons (g/mol) = (tamanho do plasmídeo + inserto)

Onde: plasmídeo + inserto = (2690+ 200 nucleotídeos)(2890pb) (330Da x 2nucleotídeos/pb) = 1.907.400 g/mol

Logo: (g/mol)/número de Avogadro $6,02214199 \times 10^{23}$) = g / molécula = n de cópias $1.907.400 \text{ g/mol} / 6,02214199 \times 10^{23}$) = $1,14866E+30 \times 10^{-18} \text{ g / molécula}$. Assim, a concentração de plasmídeo (g/ μl)/número de cópias

$= (4\mu\text{g/ml}) / (1,14866\text{E}+30 \times 10^{-18}\text{gramas/moléculas})$, o que resulta em um total de 1.29×10^{12} cópias/ml.

Após obter a conversão de μg em cópias/ml, foi feita uma diluição seriada do plasmídeo em concentrações que variaram de $10\text{E}11$ a 10 cópias de plasmídeos por μL .

O protocolo utilizado para o qPCR, por amostra, foi: 12,5 μL de MasterMix do SYBR® Green (LifeTechnologies®), 2,5 mM de cada primer, 7,5 μL de água MilliQ estéril e 3 μL de amostra. Os parâmetros de ciclagem da reação foram: 50°C por 2 minutos para inativação da Uracila n-glicosilase, 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos e 60°C por 1 minuto. Por fim, mais um ciclo foi inserido para determinar a temperatura de melting de cada uma das amostras. A Tabela 2 descreve os primers utilizados para a reação.

Tabela 2. Primers utilizados nos ensaios de amplificação do REV por qPCR e PCR convencional.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
ENV F	5'-AGGCTCATAAACCATAAAAGGAAATGT-3'	107
ENV R	5'-CCTTTACAA CCATTGGCTCAGTATG-3'	

5.5 PADRONIZAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL PARA REV

Com o objetivo de verificar a especificidade dos resultados da qPCR de REV, bem como para fins de sequenciamento, padronizamos também uma PCR convencional, utilizando os mesmos primers da qPCR que se encontram acima na tabela 2.

Para isso foi utilizado 2,5 μL de Buffer (10x), 1 nM de MgCl_2 , 2mM de dNTP, 15,2 μL de H_2O , 1 unidade de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de cada *primer* e 3 μL de amostra. Os parâmetros da reação foram: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 30

ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50°C por 40 segundos, 72 °C por 45 segundos e 72 °C por 5 minutos para extensão final.

Além desta pequena região do envelope, foram sintetizados primers para outras regiões do vírus (Tabela 3) como gag, uma região maior do env e para a junção LTR/gag, com a finalidade de caracterização genética do vírus. O protocolo utilizado foi o mesmo para o PCR convencional acima, alterando-se apenas a temperatura de anelamento dos *primers* e tempo de extensão. Os *primers* que não possuem referência na tabela abaixo foram desenhados pelo nosso grupo através do programa Primer 3¹⁰⁸.

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação do REV por PCR convencional.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
REV_ltr1_39f	AATGTGGGAGGGAGCTCC	109
REV_ltr0_707r	AATGTTGTAGCGAAGTACT	110
REV_ltr2_666f	GCAGGGATCCGGACTGAATCCGTAG	
REV_ltr1_1051r	AAGTATTATTCGCAAGCCGCGCGG	
REV_gag1_1306f	TGGTAGCCGCGGTCAGGAATATAGT	
REV_ltr2_1474R	ACTTTTTGGCTAGCTAACAGAACTTT	109
REV_gag2_2176f	AAAGTCCTACAGCTTACCTGG	
REV_gag1_2474R	TCCTCTCTCCGCTCTACTCTCC	109
REV_gag2_3249R	AGTGGACGGGTCTCAGG	109
REV_gp90_7242r	GCCAGTATGCACAGCCCTATCCA	

5.6 PCR Convencional fowlpox vírus (FPV)

Como citado na introdução, o REV é capaz de integrar-se no genoma de outros vírus, e muito comumente, essa integração ocorre em FPV. Com o objetivo de verificar se o REV encontrado nesse estudo estava inserido em

genoma de FPV, realizamos uma PCR convencional utilizando os *primers* da tabela abaixo (tabela 4). Como controle positivo da reação, foi extraído DNA de vacina viva contra Boubá aviária e Encefalomiolite aviária da POXIMUNE AE®, fabricada pela empresa CEVA Saúde Animal do lote 332.170B, utilizando o Kit de extração da Kit QIAamp® DNA mini kit (250) (Qiagen®), seguindo o protocolo do fabricante.

Para o PCR convencional foi utilizado: 2,5 µL de Buffer (10x), 1 nM de MgCl₂, 2mM de dNTP, 15,2 µL de H₂O, 1 unidade de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de cada *primer* e 3 µL de amostra. Os parâmetros da reação foram: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50°C por 40 segundos, 72 °C por 45 segundos e 72 °C por 5 minutos para extensão final. Os pares de *primers* utilizados para a reação do controle vacinal, amplificando somente um fragmento do fowlpoxvirus foram o TR1 e TR2.

Para verificar se os REV encontrados estavam integrados em FPV, foram feitas duas reações. Uma delas visando amplificar a região de inserção da LTR5' do vírus (TR1 com LTR707R) e a outra usando os pares TR2 e REV_LTR2_666F, visando detectar a integração pela porção final do vírus . Os protocolos das PCR convencionais foram idênticos aos citados acima.

Tabela 4. Primers utilizados nos ensaios de inserção do REV no fowlpox vírus por PCR convencional

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
REV_LTR2_666F	GCAGGGATCCGGACTGAATCCGTAG	
TR2_fowlpox	CACACGAATATACCAATAAGG	110
TR1_fowlpox	AACAATGATACGTCTCTTCC	110
REV_LTR0_707R	AATGTTGTAGCGAAGTACT	110

5.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E SEQUENCIAMENTO SANGER

Os produtos finais da PCR do controle endógeno (citocromo B), da PCR convencional de gp90 e posteriormente, de gag, LTR/gag e envelope foram sequenciados em sequenciador tipo Sanger. Os fragmentos de citocromo foram purificados de acordo com o protocolo do fabricante utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE Healthcare Life Sciences®). A purificação era feita diretamente a partir do *amplicon* ou a partir de banda recortada de gel de agarose, a depender se o produto era único ou haviam bandas inespecíficas. Entretanto, foi observado por visualização em gel de agarose que, em particular para as bandas da PCR de controle endógeno, que não eram muito fortes, ao utilizar esse método perdia-se muito material. Então, ao invés de realizar a etapa de purificação e sequencia-las, os produtos de 386pb do PCR do controle endógeno eram recortados para eliminar bandas inespecíficas e dímeros de *primer*, eram purificados e então reamplificados.

A alteração, que incluiu a re-amplificação desse produto, agora puro, por PCR convencional, permitiu que uma banda única e com conteúdo suficiente para o sequenciamento fosse obtido. Para os demais fragmentos, a banda, que era única e de intensidade forte no gel de agarose, o sequenciamento foi feito direto do produto de PCR, apenas sendo feita diluição do mesmo na proporção 1:4 em água ultra-pura.

Os produtos foram então adicionados a uma mistura contendo 4µl de tampão *Ready Reaction Premix 2.5X*, 2 µl de *BigDye Sequencing Applied Biosystems* 3,2 pmol de apenas um dos primers (no caso do sequenciamento ser direto do produto da PCR, sem previa purificação, a concentração dos primers era dez vezes maior, de 30pmol), e água MilliQ para um volume final de 20 µl. As condições de ciclagem da reação de sequenciamento foram: 96°C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos, 60°C por 4 minutos e 60°C por 7 minutos para extensão final. Após o sequenciamento, os nucleotídeos terminadores não incorporados foram removidos.

O protocolo de limpeza da reação e precipitação consistiu em adição de 80µl de isopropanol 75%, seguido de vigorosa agitação em aparelho tipo vórtex. Após 15 minutos de repouso sob proteção da luz, a placa foi centrifugada a 3.200 RCF por 45 minutos. Ao final, o isopropanol foi removido da placa por inversão e, para completa eliminação do isopropanol, a placa foi submetida a um *spin* invertido por 5 segundos com papel absorvente. Após essa etapa, 150µl de Etanol 70% foram adicionados e novamente a placa foi centrifugada, desta vez por 15 minutos. O etanol foi removido através do mesmo processo realizado para remoção do isopropanol descrito anteriormente. A placa foi então incubada a 37°C por 10 minutos para completa remoção do etanol. Os produtos purificados foram ressuspensos em formamida 10% e submetidos à eletroforese no aparelho sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser.

5.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os eletroferogramas obtidos do sequenciamento foram inspecionados quanto a qualidade e tamanho dos picos e extraídos em formato fasta com o auxílio do programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, US). As sequências, agora em formato fasta, foram alinhadas utilizando o programa ClustalX¹¹¹, juntamente com sequências de referência de cada um dos fragmentos (citocromo B, gp 90, gag, LTR/gag e envelope) de aves e no caso de citocromo B, incluímos também amostras de humanos obtidas no banco de dados público GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Os arquivos alinhados, salvos em formato nexus, foram utilizados como entrada para o programa de reconstrução filogenética PhyML, parte do pacote SeaView¹¹². Modelos de substituição para cada *dataset* foram calculados através do jModelTest¹¹³. As árvores obtidas foram visualizadas com o auxílio do programa FigTree v1.2 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/download>).

Para maior entendimento sobre a relação entre o REV brasileiro e as diversas cepas referencias já descritas, uma matriz de similaridade de nucleotídeos foi construída pelo método de distância usando o programa

PAUPv4.0 para Unix¹¹⁴. A matriz de distância genética foi gerada e exportada para visualização em documento de edição de texto.

5.8 SOROLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti- vírus WEST NILE

5.8.1 Detecção de anticorpos IgG por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Para o diagnóstico sorológico de infecção prévia pelo vírus West Nile, foi utilizado um ensaio de ELISA, dirigido a detecção de anticorpos IgG em amostras de soro de aves. Para isso, foi utilizado o Kit ID Screen® West Nile Competition Multi-species da empresa ID.VET Innovative Diagnostics, Montpellier, France. Esse Kit foi elaborado para detectar anticorpos anti-proteína do envelope (pr-E) do WNV em amostras de soro de cavalos e aves.

O protocolo dos testes foram seguidos de acordo com as orientações do fabricante, com algumas modificações (por exemplo, duplicar os controles negativos), onde utilizou-se 50 µl de amostra, adicionados a placa já sensibilizada com o antígeno do envelope do WNV. Foram utilizados 4 controles negativos e 2 controles positivos para a validação da placa e o cálculo do *cut off*. As amostras supostamente positivas foram repetidas em uma segunda placa, em duplicata, do mesmo lote do kit para confirmação.

5.8.2 Validação do teste de ELISA

A validação do método foi determinada segundo protocolo do fabricante, onde:

O valor de Densidade Ótica (DO) dos controles negativos foi superior a 0,700 na leitura ótica em filtro de 450 nm.

Obtenção de um percentual de relação entre os controles positivos e negativos, igual ou inferior a 30 ($DO_{CP}/DO_{CN} < 30\%$).

O *cut off* foi determinado seguindo a média dos controles negativos conforme fabricante. As amostras foram classificadas como positiva, negativa ou inconclusivas mediante cálculo de percentual de relação entre as amostras e a média dos controles negativos ($Samples(S)/Negative(N)\%$);

$$\frac{S}{N} \% = \frac{DO \text{ Amostra}}{DO \text{ Contr. negativo}} \times 100$$

A interpretação dos resultados compreendeu a relação dos valores de S/N, sendo considerado positivo amostras com relação de $\frac{S}{N} \% \leq 40\%$, negativas $\frac{S}{N} \% > 50\%$ e inconclusivas amostras com $\frac{S}{N} \% > 40 - < 50\%$.

5.8.3 EXTRAÇÃO DE RNA, cDNA e PCR CONVENCIONAL do VIRUS WEST NILE

Com o objetivo de buscar o RNA viral e assim confirmar positividade do WNV, foi extraído o RNA de uma das amostras de sangue de ganso do Parque Ibirapuera (apenas essa amostra dispunha de material suficiente para extração). A extração foi realizada pelo método de Trizol e consistiu em: adicionar a 300 µL de sangue total, 1 mL de trizol; homogeneizar por no mínimo 3 vezes ou até o trizol se misturar com a amostra. Adicionar em seguida 200 µL de clorofórmio e agitar no aparelho tipo vórtex e centrifugar a 16.363 RCF por 15 minutos a 4 °C. Depois da centrifugação, a mistura irá se separar em fase fenólica abaixo (avermelhada/DNA), interfase (DNA) e fase superior aquosa (RNA); separar com cuidado a fase aquosa para outro tubo e adicionar 500 µL de isopropanol para precipitação, homogeneizar por inversão e deixar descansando por 10 minutos. Logo depois, centrifugar novamente a 16.363 RCF por 10 minutos a 4°C. Desprezar em seguida o sobrenadante para retirar o excesso de isopropanol. Para lavar o *pellet* de RNA, acrescentar 1 mL de etanol 75% e agitar em vortex, repetir essa etapa duas vezes. Para ressuspender o pellet, utilizar 40 µL de água ultrapura.

O cDNA foi então sintetizado a partir do produto da extração utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems®, seguindo as normas do fabricante.

Para a PCR convencional foi utilizado um protocolo já existente e utilizado amplamente em nosso grupo, onde os primers (Tabela 5) utilizados na reação amplificam parte da região do gene NS5 do RNA de alguns Flavivirus de humanos, incluindo dengue, febre amarela, West Nile e outros¹¹⁵.

Tabela 5. Primers utilizados para amplificação de Flavivirus por PCR convencional.

<i>Primer</i>	Seqüência	Referência
Flavi – F	GCMATHHTGGTWCATGTGG	115
Flavi – R	GTRTCCCAKCCDGCNGTRTC	

Para a PCR convencional foi utilizado: 2,5 µL de Buffer (10x), 1,5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTP, 17,2 µL de H₂O, 1 unidade de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de cada *primer* e 1 µL de amostra. Os parâmetros da reação foram: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos, 72 °C por 40 segundos e 72 °C por 10 minutos para extensão final. Como controle da reação, foi utilizado uma amostras positiva para dengue.

6. RESULTADOS

6.1 CONTROLE ENDÓGENO POR PCR CONVENCIONAL

O passo inicial foi a verificação da integridade das amostras de DNA extraídas. Para isso, uma PCR dirigida a região do citocromo B de aves foi feita. Após a PCR, os produtos amplificados foram revelados por eletroforese em gel de agarose 2%. Das 603 amostras testadas da cidade de São Paulo, 467 foram positivas para o controle endógeno citocromo B (Figura 10 a) e das amostras do Pará, de 459, 412 foram positivas para o controle de citocromo B (Figura 10 b).

Porém, ao longo do trabalho, houve o questionamento se de fato os primers utilizados eram específicos para DNA mitocondrial de aves, dado a semelhança desse gene entre as diferentes espécies. Assim, foi realizada uma reação de citocromo B utilizando DNA humano como molde. Infelizmente, houve amplificação com peso molecular idêntico (386 pb) ao obtido com a amplificação de DNA de aves.

Dessa forma, decidimos sequenciar cinco amostras amplificadas a partir de DNA de ave, escolhidas de forma randômica. Ainda, sequenciamos as bandas obtidas de DNA humano, para fins de comparação. Com as sequencias em mãos, realizamos uma pequena reconstrução filogenética, utilizando como referência sequencias de citocromo B de aves e de humano. O resultado pode ser observado na Figura 11, onde nota-se claramente que as amostras amplificadas a partir de DNA de aves não foram contaminadas com DNA humano, portanto, específicas. Ainda, as amostras de DNA de citocromo B humano formaram um cluster separado na análise filogenética, agrupando-se com sequências de referência humanas (Figura 11)

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose revelado com corante para DNA SyBrSafe. O gel mostra o resultado da PCR para citocromo B, com bandas na altura de 386 nucleotídeos. O peso molecular utilizado é de 100pb, presentes nos primeiros poços.

Figura 11. As amostras amplificadas a partir de DNA de ave (designadas Am1-6) e referências estão compreendidas nos ramos em vermelho. As amostras de DNA humano (Am7 e Am8), bem como suas referências, estão na parte inferior da árvore, em preto.

6.2 PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE REV

Para a padronização do qPCR foram feitos três testes quantitativos. O primeiro teste foi feito utilizando os 5 menores pontos da curva, onde o plasmídeo diluído na base 10 foi testado em triplicata (Figura 12)

Figura 12. Amplificação da curva-padrão por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Cada ponto representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo), feitas em triplicata variando de 10E5 até 10E1.

O segundo teste foi o intra teste, onde o plasmídeo diluído na base 10 foi testado em decaplicata (Figura 13) A quantificação do número de cópias do plasmídeo em água foi realizada através do cálculo da média dos valores do ciclo *threshold* (Ct) obtidos para cada amostra e a respectiva “plotagem” destes na regressão linear obtida a partir da curva-padrão do vírus (Figura 14) Obteve-se regressão linear com um índice de correlação de 0,991 (Figura 14)

Figura 13. Amplificação de curva-padrão por técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Cada ponto representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo), feitas em decaplicata variando de 10E8 até 10E2.

Figura 14. Regressão linear da curva-padrão do plasmídeo de REV. Concentrações das diluições do plasmídeo (da esquerda para a direita): 100 cópias/mL, 1.000 cópias/mL, 10.000 cópias/mL, 100.000 cópias/mL, 1.000.000 cópias/mL, 10.000.000 cópias/mL e 100.000.000 cópias.

Com o objetivo de atestar a qualidade e fidelidade da qPCR, o teste de reprodutibilidade ou interteste foi realizado. Neste, as amostras quantificadas são testadas por outro operador, em outro local físico e com outros reagentes (exceto *primers*) e os resultados precisam ser exatamente os mesmos. Foram realizados testes de reprodutibilidade com três pontos da curva (10E7; 10E5 e 10E3), e os resultados se mantiveram os mesmos.

Utilizando a metodologia de SyBR® Green conforme demonstrado nas figuras 14 e 15, a sensibilidade analítica ou limite de detecção da técnica de qPCR para o REV foi de aproximadamente 1000 cópias/mL. De modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados, as amostras positivas fora da curva determinada, com cargas virais inferiores a 1000 cópias/mL seriam consideradas positivas não-quantificáveis, ou seja, abaixo da capacidade de detecção e quantificação do teste (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação do cut-off da PCR em tempo real para REV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em decuplicatas. Cópias medidas em cp/mL.

	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	
	Curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	
Nº cp/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média
10.000	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	10
1000	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	9
100	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg	pos	pos	4
Negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0

A qPCR para o REV mostrou elevada reprodutibilidade nas diluições com mais de 10000 cópias/mL de amostra assim como nas amostras que continham 1000 cópias/mL, definindo assim os limites superior e inferior de detecção do teste.

6.3 PCR EM TEMPO REAL PARA REV DAS AMOSTRAS DA CIDADE DE SÃO PAULO.

A grande maioria das qPCR das amostras de São Paulo não apresentou nenhum tipo de amplificação. Entretanto, para algumas poucas amostras, os resultados foram inconclusivos, pois algumas amplificaram com características (como curva de dissociação) diferentes daquelas dos controles. As curvas das amostras inconclusivas possuíam picos anteriores e/ou posteriores ao da curva do controle positivo, que foi de 81,2°C. Em média, a temperatura das amostras que obtiveram alguma amplificação apresentaram pico de *melting* de cerca de 81,4°C. Portanto, poderiam ser positivas uma vez que variações no conteúdo GC do fragmento amplificado justificam variações pequenas de temperatura de curva de dissociação (quanto maior o conteúdo GC, maior a temperatura para dissociação). Como mostra a Figura 15, mais de um pico, e geralmente bem menor que o controle, aparecia. Esse padrão sugeria fortemente que a amplificação era inespecífica, e não se tratava de um verdadeiro positivo.

Figura 15. Resultado falso positivo de duas amostras. A curva na cor azul mostra o controle positivo, e as verde e vermelha mostram as amostras suspeitas.

Entretanto, assumindo que o REV é um vírus pouco estudado e pouca informação se tem sobre variantes, seria possível que mutações estivessem presentes na região interna ao fragmento amplificado. Isso alteraria o conteúdo

CG do fragmento, e refletiria no deslocamento do pico de dissociação para a esquerda ou direita. Dessa forma, fez-se necessário verificar se de fato as amplificações não representavam o vírus procurado. As amostras positivas na qPCR foram então submetidas a PCR convencional, e os fragmentos foram observados quanto ao tamanho. A Figura 16 mostra que, a exceção da amostra 451, todas as demais apresentaram bandas de tamanhos distintos ao esperado, indicando amplificação inespecífica.

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose da PCR convencional para REV corado com SYbr Safe. Peso molecular de 100pb nos primeiros poços do gel. Notar que maioria das amostras não aparecem na mesma altura do controle positivo.

De qualquer forma, todas as amostras amplificadas foram sequenciadas por Sanger, e as sequencias obtidas foram submetidas a análise de similaridade contra o banco de sequencias público do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando para isso, a ferramenta Blastn.

As análises de similaridade com o Blast revelaram que as sequencias obtidas eram provenientes de aves (Figura 17) e não de REV. Provavelmente, a especificidade dos oligos escolhidos não é alta o suficiente, e amplificações espúrias ocorrem eventualmente. Entretanto, a observação da curva de

Figura 18. Resultado positivo para o REV de umas das amostras do estado do Pará. A curva na cor azul representa o controle positivo, e a curva da cor rosa, a amostra.

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose corado com SYbr Safe do PCR convencional para REV. Peso molecular de 100pb nos primeiros poços do gel.

Todas as amostras positivas na PCR convencional foram da espécie pato-selvagem (*Cairina mochata*). Em relação aos pontos de coleta, 9 foram de Marabitaná, 3 de Maracajá e 1 de Marajó.

As amostras amplificadas foram sequenciadas por Sanger, e as sequências obtidas foram submetidas a análise de similaridade contra o banco de sequências público do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando para isso, a ferramenta Blastn, disponível no mesmo sitio. Como demonstrado na Figura 20, as amostras que foram sequenciadas de fato são positivas para o REV, comprovando o resultado positivo da PCR convencional.

Reticuloendotheliosis virus isolate GDBL1402, complete genome
Sequence ID: [KU204703.1](#) Length: 8284 Number of Matches: 1

Range 1: 6538 to 7057 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Mat

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
955 bits(517)	0.0	519/520(99%)	0/520(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGAATCTGTGCGTGAAAGACTAGAGGAAATCATCAGGCACAGCTACCCCTCCGTACAGT			60
Sbjct 6538	AAGAATCTGTGCGTGAAAGACTAGAGGAAATCATCAGGCACAGCTACCCCTCCGTACAGT			6597
Query 61	ATCACCCCTTTAGCCCTGCCCGGACCAAGAGGAGTAGATCTGGATCCCCAGACGTCTGACA			120
Sbjct 6598	ATCACCCCTTTAGCCCTGCCCGGACCAAGAGGAGTAGATCTGGATCCCCAGACGTCTGACA			6657
Query 121	TACTGGAAGCTACTCACCAGGTCCTTAACGCCACTAATCCCCAGCTAGCAGAGAACTGCT			180
Sbjct 6658	TACTGGAAGCTACTCACCAGGTCCTTAACGCCACTAATCCCCAGCTAGCAGAGAACTGCT			6717
Query 181	GGCTTTGTATGACTCTTGGAACTCCAATCCCCGCGAGCCATCCCGGCGAATGGCAATGTCA			240
Sbjct 6718	GGCTTTGTATGACTCTTGGAACTCCAATCCCCGCGAGCCATCCCGGCGAATGGCAATGTCA			6777
Query 241	CTCTCGATGGAAATTGCAGTCTTAGCCTCCCTTTTCGGGTGCAACCCACCGGGTCAATAG			300
Sbjct 6778	CTCTCGATGGAAATTGCAGTCTTAGCCTCCCTTTTCGGGTGCAACCCACCGGGTCAATAG			6837
Query 301	ATGTCAACTGCTATGCAGGGGAAGCAGACAATAGGACTGGTATACCCATAGGGTATGTTT			360
Sbjct 6838	ATGTCAACTGCTATGCAGGGGAAGCAGACAATAGGACTGGTATACCCATAGGGTATGTTT			6897
Query 361	ATTTCACTAACTGCACTAGCATCCAGGAGGTCTCTAACGAGACAAGTCATATAAGAAATT			420
Sbjct 6898	ATTTCACTAACTGCACTAGCATCCAGGAGGTCTCTAACGAGACAAGTCATATAAGAAATC			6957
Query 421	TTACGAGGCTATGTCTCCACCGGTCATGTATTGTGTGTGGGAACAACATGGCCTACA			480
Sbjct 6958	TTACGAGGCTATGTCTCCACCGGTCATGTATTGTGTGTGGGAACAACATGGCCTACA			7017
Query 481	CGGCGCTCCCTAATAAATGGATAGGGCTGTGCATACTGGC		520	
Sbjct 7018	CGGCGCTCCCTAATAAATGGATAGGGCTGTGCATACTGGC		7057	

Figura 20. Alinhamento global obtido com a ferramenta Blastn. Notar que a sequência (query) submetida a análise de similaridade obteve score alto o suficiente (955) com o REV.

Entretanto, grande parte das amostras positivas no qPCR não amplificaram na PCR convencional. Verificamos que as amostras que amplificaram na PCR convencional tiveram uma média de Ct de 20 e mediana de 17 e as amostras que não tiveram amplificação na PCR convencional amplificaram com Ct de 29 como média e mediana. Portanto, acreditamos que

a não amplificação no método convencional se deva a baixa quantidade de vírus nas amostras.

6.4.1 Sequenciamento dos fragmentos de gag, env, LTR/gag.

Como citado no Materiais e Métodos, além da região pequena de detecção para o REV, outras regiões do vírus foram amplificadas e sequenciadas para caracterização genética. As amplificações foram feitas de 9 amostras de pato-selvagem para uma análise mais detalhada. Um dos objetivos era verificar se o vírus se encontrava inteiro (com LTR e todos os genes) ou apenas fragmentos dele, o que poderia sugerir uma contaminação via integração em outro vírus. O segundo objetivo era, com essas sequências em mãos, determinar sua relação filogenética com os demais REVs de outras regiões geográficas, através da reconstrução de árvore filogenética.

Das 9 amostras foram amplificadas as regiões gag, LTR/gag e env. Dois pares de *primers* para a LTR foram utilizados. O primeiro fragmento de LTR continha 668 pares de bases, amplificado com os *primers* LTR1 F 39 e LTR0 R 707; e a segunda parte da LTR continha uma região de 385 pb, obtida através dos *primers* LTR2 F 666 e LTR1 R 1051. Para a região do gag, o fragmento continha 1168 pb, gerado através dos *primers* gag1 F 1306 e gag1 R 2474. E por fim, a região do envelope foi obtida com o par de *primers* gp90 F e gp90 R 7242, gerando um fragmento de aproximadamente 1000 pb.

Todos os amplificados foram sequenciados e novamente todas as sequências obtidas, foram submetidas a análises de similaridade no Genbank para conferência. Após isso, reconstruções filogenéticas com cada um dos genes e LTR foram feitas, utilizando referências de REV de outras regiões. Infelizmente poucas amostras apresentaram amplificação com ambos os primers de LTR, e a qualidade do sequenciamento apenas foi boa para fins de reconstruções filogenéticas com o segundo fragmento. Por essa razão, as análises de LTR foram feitas somente com o fragmento de 385pb (LTR/gag). Ainda, apenas uma amostra (2036) teve a sequência do gag com boa qualidade.

Os resultados das filogenias, feitas apenas a partir dos fragmentos de env e de LTR/gag estão representados respectivamente nas Figura 21 A e B e sugerem relação próxima do REV do Brasil com o REV dos Estados Unidos.

Ainda, para maior clareza da relação existente entre o REV brasileiro e as diversas cepas referencias de REV já descritas, uma matriz de similaridade de nucleotídeos pelo método de distância foi construída usando o programa PAUP (Tabela 7). Como pode ser observado nas filogenias, e mais evidentemente na tabela de similaridade de nucleotídeos, os vírus do Brasil são altamente similares a cepa de referencia APC-566, de galinhas de pradaria, aves nativas de regiões do Texas, EUA.

Tabela 7. Identidade genética no nível de nucleotídeos entre vírus brasileiros e cepas de referência.

<u>Reference</u>	GenBank ID	REV_2036_PA_Br		
		LTR/gag	Gag	<u>Env</u>
APC-566	DQ387450	99.8%	100%	99.8%
SNV	DQ003591	96%	97.5%	96.4%
MD-2	JX912710	99.4%	100%	100%
FPV	AF246698	99.6%	100%	100%
CSV	DQ237905	NA	NA	99.5%
HA9901 (China)	AY842951	96%	98%	97.6%

*N/A Não disponível no GenBank ou não sequenciado.

Figura 21. Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança mostrando as relações entre amostras do Brasil (nome em vermelho) e de outras regiões. As árvores foram feitas com fragmentos do envelope (A) e LTR/gag (B). Valores de bootstrap acima de 60%.

6.5 Determinação da integração do REV em Fowlpox vírus (FPV)

Após a PCR do DNA extraído das vacinas comerciais da Poximune AE®, os produtos amplificados foram revelados por eletroforese em gel de agarose 2%. Na Figura 22, o resultado positivo para o controle de FPV.

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose corado com SYbr Safe do PCR convencional para controle positivo de FPV. Peso molecular de 100pb nos primeiros poços do gel. Amplificação de um fragmento de aproximadamente 500pb com duas concentrações de amostras.

O controle positivo de FPV foi sequenciado por sanger e o resultado de similaridade obtido através do Blastn foi de 100% com sequências descritas de FPV. As amostras positivas para o REV foram submetidas a reação de PCR convencional para FPV. Todas as amostras foram negativas, ou seja, aparentemente o REV encontrado nestas amostras não está inserido em FPV.

6.6 SOROLOGIA WEST NILE

6.6.1.ELISA

Foi empregado para análise sorológica das amostras de São Paulo o teste de ELISA. Ao total foram analisadas 164 amostras de soro de aves, as espécies estão descritas no anexo B. O percentual de inibição (ou seja, positividade) foi de 2,4% (4 amostras), sendo que 3 eram do Zoológico e 1 do Parque Ibirapuera. As espécies de aves que apresentam anticorpos IgG foram ganso, avestruz e flamingo-chileno. Não tínhamos soro disponível das amostras do Pará.

O resultado foi interpretado de acordo com a bula do fabricante do kit e para cada amostra, foi feito o cálculo citado no materiais e métodos. Foram consideradas positivas as amostra que ficaram abaixo de 40% da média do controle positivo, dividido pelo valor do controle negativo vezes 100.

Por ser um ELISA de competição (o conjugado da reação compete com a amostra por conter anticorpo de WNV em sua composição), quanto maior o valor do D.O., mais negativo é o resultado. Na Tabela 8 estão os valores de D.O. das amostras positivas.

Tabela 8. Resultado do ELISA de IgG WNV.

Amostra	D.O.*	D.O/CN%*	Resultado
68**	0,67	31,3	Positivo
577***	0,235	10,30	Positivo
593***	0,839	36,75	Positivo
5102***	0,417	18,27	Positivo

*D.O- Valor da densidade ótica

** Parque ibirapuera

***Zoológico

Todas as amostras com resultado positivo foram submetidas a uma segunda reação de ELISA, confirmando o resultado.

6.6.2 PCR convencional WEST NILE

Mesmo sabendo que as chances de que a ave estivesse virêmica no momento da coleta eram extremamente pequenas, realizamos uma PCR convencional para Flavivírus com o objetivo de confirmar o resultado da sorologia. Entretanto, por falta de material, amplificamos apenas uma amostra (#68 do DEPAVE), onde o resultado para Flavivírus foi negativo.

7. DISCUSSÃO

7.1 REV

Desde que foi isolado pela primeira vez em 1958 nos Estados Unidos³⁰, o REV tem sido identificado em outros países, principalmente no continente Asiático, onde já se sabe que o vírus é comum. Aliás, particularmente na China, a presença do REV representa um sério problema econômico pela alta mortalidade e pela alta suscetibilidade de contaminação, principalmente em aves de corte³³.

O primeiro caso do REV na América do Sul relatou a presença do vírus em uma contaminação concomitante com Marek em galinheiros³⁷. Até então, não havia nenhum relato do vírus no continente Sul Americano. Já no Brasil, até o presente estudo, não haviam evidências do vírus no país, ou nenhum estudo publicado que sugerisse a circulação do REV.

Nesse estudo, apresentamos portanto pela primeira vez a detecção do REV em amostras do Brasil. Todos os pássaros positivos para o vírus encontrados neste trabalho foram amostrados no Pará e pertencem a três espécies de aves: Pato-selvagem (*Cairina moschata*), galinha (*Gallus gallus*) e peru-selvagem (*Meleagris gallopavo*). Ainda, esses animais não têm histórico de vacinação, pois são de vida livre, ou seja, embora não possamos saber a origem da infecção, podemos ao menos deduzir que o REV não as infectou através de vacinas contaminadas. Fato este que também confirmamos através das PCR negativas para FPV. Além da distribuição no Brasil, os patos-selvagens são encontrados também no México, América Central e outros países da América do Sul, mas existem algumas populações nos Estados Unidos (Flórida e Texas). Entretanto, os patos selvagens amostrados do presente estudo são originários do Brasil, uma vez que esta espécie não é migratória, ou se o fazem, migram curtas distâncias. Galinhas e perus, mais frequentemente associados à infecção

por REV, também são aves não migratórias. Portanto, é improvável que as aves positivas encontradas aqui tenham sido infectadas em outros lugares.

Corroborando a hipótese de que as infecções ocorreram localmente e portanto, que o vírus já circula livremente ao menos na região do Pará, observa-se o número de amostras positivas (16,1%) e as localidades das mesmas. Estas amostras foram coletadas em três diferentes regiões no Estado do Pará, distantes umas das outras em no mínimo 576km. Por fim, ressalta-se que as amostras sequenciadas neste estudo possuem alta similaridade entre si (100%), mostrando que a linhagem que infectou uma ave, infectou todas.

Uma explicação para a entrada do vírus no país advém do grande número de aves migratórias provenientes de regiões do continente norte-americano, que chegam até o Brasil pelo clima e pela abundância de alimentos. Além disso, várias espécies de aves migratórias cujo destino final são a Argentina e Estados Unidos, passam pelo Brasil durante o voo. A região norte do Brasil é uma das portas de entrada dessas aves e o estado do Pará, devido a sua localização geográfica, clima tropical e ecossistema, é um dos pontos de parada de aves migratórias provenientes do hemisfério norte durante a estação de migração^{6,116}.

Com os resultados do sequenciamento e filogenéticos, pode-se notar a semelhança entre os vírus brasileiro REV e norte americano, sugerindo que os Estados Unidos podem de fato ser a fonte dos vírus que circulam aqui. Infelizmente, nenhum dado de sequência está disponível do vírus encontrado na Argentina para comparação³⁷.

O REV também pode existir como forma proviral integrada em vírus de DNA, como em vacina contendo vírus Marek atenuados (cepa MD-2) e também em cepas de campo e vacina de vírus Fowlpox (FWPV-REV)^{44,45,117}. Os vírus integrados na vacina padrão podem ser infecciosos⁵⁷ ou não infecciosos¹¹⁸. Como há relativamente pouca variação genética entre as cepas de REV¹¹⁹, é muito difícil determinar a origem e a classificação de um isolado. De fato, o REV brasileiro difere de 0,0 a 0,5% tanto do FPV como do MD-2 integrado e APC-566 e CSV não integrados. Apesar de o PCR para fowlpox ter dado negativo no presente estudo, deve-se considerar que não temos um controle

positivo de REV integrado para comparação. Apenas utilizamos a cepa padrão vacinal de FPV para controle parcial da reação. Por isso, como alternativa, buscamos substituições pontuais reportadas previamente, que foram descritas como específicas para FPV-REV¹²⁰. De acordo com a descrição dos autores, o FPV-REV possui certas substituições de nucleotídeos na região do envelope (SNPs) que os diferenciam das cepas não integradas.

A busca desses SNPs nas sequências amostradas no presente estudo revelou que o REV encontrado no Brasil seria do tipo não integrado. No entanto, outros FPV-REV estão disponíveis no GenBank e uma busca mais detalhada nessas amostras revelou que as mesmas não possuem os SNPs específicos descritos por Tadese e colaboradores, indicando que existe alguma variabilidade genética entre as cepas integradas. Por conseguinte, continua a ser determinado se o REV brasileiro está presente como partículas infecciosas ou se está integrado no genoma de vírus de DNA de aves.

Além de infectar aves domésticas, o vírus da Reticuloendoteliose pode também infectar muitas espécies de aves selvagens, e trabalhos mostram a presença do vírus em espécies de aves selvagens principalmente da ordem passeriformes^{33,121}. Assim uma epidemia por REV no Brasil seria bem desastrosa, tanto na área econômica, já que o Brasil é o segundo maior exportador de frango no mundo, e tanto na preservação da fauna, onde novamente o Brasil é um dos países que mais retém espécies de aves no mundo.

O REV encontrado no presente trabalho foi identificado em patos-selvagens, galinhas e perus. Por razões desconhecidas, conseguimos sequenciar apenas o REV encontrado em amostras de patos. É possível que o vírus estivesse presente em baixa carga em outras espécies e que por isso, a amplificação em PCR convencional com necessidade de visualização em agarose não tenha sido possível. Tentamos ainda utilizar os *primers* das demais regiões (LTR, gag, envelope) além dos *primers* desenhados para sua detecção, e também não conseguimos amplificação visível. De fato, observamos que o Ct da amplificação na qPCR foi maior para as amostras que

não amplificaram no convencional (29) contra (20, mediana de 17) das que amplificaram em ambos.

Visto que apenas as amostras de pato-selvagem foram passíveis de sequenciamento, são necessários mais estudos para determinar se mais de uma linhagem de REV está presente no Brasil. Além disso, embora o vírus não tenha sido encontrado em São Paulo, deve-se notar que foram amostrados no centro urbano do estado. Pássaros adicionais amostrados em áreas menos urbanas de São Paulo e outras regiões precisam ser investigados para determinar se o REV é restrito à região norte ou se já encontra-se difundido pelo país.

Neste estudo descrevemos o REV no Brasil pela primeira vez e apresentamos as primeiras sequências de vírus da América do Sul. Como esperado, o REV encontrado no Brasil é muito semelhante a outras cepas circulantes comuns e provavelmente foi trazido por aves migratórias que param no norte do país para descansar. Os resultados apresentados aqui apontam para a necessidade de determinar ainda mais a prevalência de REV em aves selvagens e de cativeiro brasileiras e também realizar estudos de avaliação de risco dedicados a espécies silvestres e comerciais de aves.

A presença do REV é uma barreira para a produção de exportação para certos países e representa uma preocupação econômica muito séria, particularmente como contaminante para produtos orgânicos produzidos em tecidos ou células embrionárias de frango.

7.2 WNV

O Brasil é o maior país da América do Sul, com grandes áreas florestais e uma grande diversidade de flora e fauna¹²², isso devido as condições ecológicas, climas e diferentes biomas. Temos a segunda maior avifauna do globo terrestre, e além disso, o Brasil também recebe anualmente centenas de espécies de aves migratórias, vindas principalmente do hemisfério Norte¹²¹.

Junto com a diversidade de aves, que são um dos principais carreadores de microorganismos, o Brasil também possui um grande número de espécies

de artrópodes, incluindo os mosquitos *Aedes sp.*, *Culex sp.* e *Haemagogus sp.* A presença de condições climáticas adequadas para a criação desses vetores propicia a existência do grande número de arbovírus (vírus que são transmitidos por artrópodes hematófagos), presentes no país. Dentre os arbovírus, encontra-se a família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, que tem distribuição global^{49,50}. No Brasil, dentre os *Flavivirus* descritos, os mais comuns são o vírus da Dengue (DENV) com 4 sorotipos, vírus Zika, encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus da febre amarela. Destacam-se ainda os vírus Oropouche, Mayaro e Rocio (ROCV)¹²². A febre do Nilo, também causada por um flavivirus (vírus do Oeste do Nilo, ou West Nile vírus - WNV) é uma preocupação para o nosso país, pois após sua introdução nos Estados Unidos, o vírus se espalhou rapidamente pelo continente americano⁵⁹. Desde o primeiro surto em Nova York em 1999 até 2016 foram no total de 46.026 casos reportados em humanos por WNV nos EUA, pelo CDC⁹⁹, onde hoje o vírus é considerado endêmico. Logo após a disseminação nos Estados Unidos e Canadá, o vírus se espalhou para o restante da América (Central e Sul), mas não tão intensamente como na América do Norte. Um fato curioso é que na América do Sul e no Caribe existem apenas raros casos documentados de doença neurológica grave ou fatal associada por WNV em humanos e equídeos^{100,123}.

No Brasil, mesmo ainda não havendo nenhuma epidemia por WNV, a presença do vírus aqui já foi descrita através de resultados positivos em testes sorológicos de cavalos e aves⁸⁹⁻⁹². Em 2014 a OMS comprovou o primeiro caso humano de WNV no Brasil, no Piauí⁸³.

Os resultados do presente trabalho sugerem a presença do vírus também na cidade de São Paulo, já que obtivemos resultados de sorologia positiva em dois locais distintos, 3 amostras positivas no Parque Zoológico de São Paulo e uma amostra no Parque Ibirapuera. Porém a sorologia pode ser insuficiente para a determinação da infecção de maneira precisa, visto que o WNV pertence ao complexo antigênico dos vírus das encefalites japonesa (JEV) e Saint Louis (SLEV), e apresenta reatividade sorológica cruzada com estes e vários outros *Flavivirus*^{59,123}. Exemplificando essa situação, uma

amostra clínica humana de um paciente com meningite/encefalite foi positiva para IgM de West Nile, porém em teste de ELISA feito em paralelo para dengue, também foi observado resultado positivo. Os autores então realizaram um teste de neutralização por redução de placa, que resultou negativo para o WNV, mostrando uma possível reação cruzada no ELISA⁸¹. Ainda, um trabalho publicado pelo nosso grupo que avaliou diferentes kits de sorologia (ELISA) para dengue em amostras positivas por PCR para o vírus ZIKA mostrou 100% de positividade de IgG anti-dengue nessas amostras, quando analisadas após 14 dias de sintomas. Isso reforça a possibilidade de cruzamento entre antígenos de Flavivirus, quando testes comerciais são utilizados para a busca de IgG anti- tais antígenos¹²⁴.

A bula do kit que foi utilizado neste trabalho deixa bem claro que por mais que o Kit seja desenhado para detectar a proteína do envelope (pr-E) do WNV, pode haver reação cruzada com os vírus das encefalites japonesa e encefalites transmitidas por carrapatos. Com base nisso, tentamos detectar o RNA viral nas amostras com sorologia positiva, porém sem sucesso. Entretanto, isso não significa que não tenha ocorrido infecção. A viremia do WNV é curta, aproximadamente 7 dias a depender da espécie de ave⁸⁸, e uma vez que o teste sorológico detecta IgG, as chances de encontrarmos o RNA viral em amostras IgG positivas são próximas a zero.

Ainda é alvo de discussão a razão pela qual o WNV não se espalhou pelo Brasil, assumindo que de fato ele já está aqui há algum tempo e considerando que o país possui condições ideais para a disseminação do vírus, como a presença de vetores, no caso mosquitos da espécie *Culex* e *Aedes*, principais vetores do vírus^{63,84}, além de temperatura ideal para a manutenção do vírus e uma grande quantidade de hospedeiros (aves, equídeos e humanos). Além do mais, o Brasil recebe anualmente espécies de aves migratórias que fazem paradas no país⁶, provenientes principalmente dos Estados Unidos, onde o vírus da febre do nilo já é endêmico. Os resultados do trabalho de Ometto et. al.⁸² reforçam a ideia da entrada do vírus e sua circulação através de aves migratória como carreadoras. O grupo analisou um grande número de amostras de aves migratórias provenientes de diferentes

áreas de parada (*stop-over areas*) e de equídeos. O grupo encontrou 4 amostras positivas, confirmadas por PRNT90 de equídeos e 2 de aves silvestres.

Ainda discutindo as razões pelas quais o WNV não se tornou um problema no Brasil, é possível que a capacidade amplificadora do vírus das aves presentes no Brasil, ou seja, as aves nativas, pode ser baixa, portanto, estas podem não ser hospedeiros tão competentes¹⁰⁰. Outra explicação é que talvez exista competição no vetor (ou vetores) com outros Flavivirus que já são endêmicos aqui.

Por fim, assumindo que o WNV esteja de fato circulando no país, é também possível que a cepa que circula aqui seja de menor virulência, e portanto não cause doenças neurológicas com tanta intensidade como as cepas Americana e de Israel. Dessa forma, dado o menor número de casos graves em humanos, sua circulação é negligenciada. Isso é sustentado pelos inúmeros trabalhos que mostram evidências de sua presença em cavalos e aves, desde 2011⁷⁹, mas poucos casos em humanos⁸³.

Sendo assim, o WNV ainda não é um problema no Brasil, mas com o recente caso humano no Piauí, é de suma importância uma vigilância reforçada em aves migratórias e em casos clínicos de meningite/encefalite tanto em cavalos como em humanos.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Uma PCR quantitativa para detecção do vírus da Reticuloendoteliose aviária foi desenvolvido;

Conseguimos demonstrar de maneira inédita a presença do REV em território brasileiro;

As cepas encontradas neste trabalho são semelhantes geneticamente as descritas no Texas e filogeneticamente próximas da cepa APC-566;

A entrada do REV no Brasil provavelmente ocorreu através de aves migratórias, e os dados obtidos sugerem que o vírus esteja circulando em território brasileiro já há algum tempo;

Além da primeira evidência do REV, esse trabalho também demonstra uma possível circulação do WNV na cidade de São Paulo, através de amostras de aves IgG anti-WNV positivas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Wolff PL. Husbandry practices employed by private aviculturists, bird markets and zoo collections, which may be conducive to fostering infectious diseases. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1996; 15 (1):55-71.
 - 2.Reed KD, Meece JK, Henkel, JS, Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza a and enteropathogens. Clinical Medicine & Research 2002; 1(1):5-12.
 - 3.Hubálek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. Journal Of Wildlife Diseases 2004; 40 (4): 639–659.
 - 4.Comitê Brasileiro De Registros Ornitológicos (Cbro). Disponível Em: [Http://Www.Cbro.Org.Br/Cbro/Listabr.Htm](http://www.cbro.org.br/cbro/listabr.htm). Acesso Em 06 De Novembro De 2017.
 - 5.Sick H. Ornitologia brasileira. Rio De Janeiro: Nova Fronteira 1997.
 - 6.Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Icmbio. Biodiversidade - Fauna Brasileira. Disponível Em: [Http://Www.Icmbio.Gov.Br/Portal/Images/Stories/Comunicacao/Publicacoes/Miolo-Relatorio-Rotas-Migratorias_10-02-2015_Corrigido.Pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/miolo-Relatorio-Rotas-Migratorias_10-02-2015_Corrigido.Pdf)>. Acesso Em: 19 Junho De 2017.
 - 7.Payne LN, Venugopal K. Neoplastic diseases: marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz 2000; 19 (2) 544-564.
 - 8.Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park E, Burkner DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJE, Daszak P. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. Microbiology And Molecular Biology Reviews 2008; 72(3):457–470.
 - 9.Jones D, Brunovskis P, Witter RE, Kung H. Retroviral insertional activation in a herpesvirus: transcriptional activation of us genes by an integrated long terminal repeat in a marek's disease virus clone. J Of Virol 1996; 70 (4):2460–2467.
-

- 10.Witter RL, Fadly AM. Reticuloendotheliosis. Diseases Of Poultry 2003;11:517-535.
 - 11.Wang CC, Lee E, Lin CYE, Wang CH. The complete sequence of a reticuloendotheliosis virus isolated from chickens. Taiwan Vet J. 2009; 35 (2): 87-92.
 - 12.Davidson IE, Braverman Y. Insect contribution to horizontal transmission of reticuloendotheliosis vírus. Journal Of Medical Entomology 2005; 42 (2):128-133.
 - 13.Li K, Gao H, Gao L, Qi X, Qin L, Gao Y, Xu YE, Wang X. Development of taqman real-time pcr assay for detection and quantitation of reticuloendotheliosis virus. J Of Virol Methods 2012; 179:402-408.
 - 14.Crespo R, Woolcock PR, Fadly AM, Hall C, Shivaprasad HL. Characterization of t-cell lymphomas associated with an outbreak of reticuloendotheliosis in turkeys. Avian Pathol 2002; 31 (4):355-361.
 - 15.Witter RL, Sharma JM, Fadly AM. Nonbursal lymphomas induced by nondefective reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol 1986; 15: 467-486.
 - 16.Niewiadomska AM, Gifford RJ. The extraordinary evolutionary history of the reticuloendotheliosis viruses. Plos One 2013; 11 (8):1-16.
 - 17.Mussman HC, Twiehaus MJ. Pathogenesis of reticuloendothelial virus disease in chicks-an acute runting syndrome. Avian Dis 1971; 15:483-502.
 - 18.Witter RL, Lee LF, Bacon LD, Smith EJ. Depression of vacinal immunity to marek's disease by infection with reticuloendotheliosis virus. Infection An Immunity 1979; 26(1):90-98.
 - 19.Bagust TJ, Grimes TM, Ratnamohan N. Experimental infection of chickens with an australian strain of reticuloendotheliosis virus 3. Persistent infection and transmission by the adult hen. Avian Pathol 1981; 10:375-385.
-

20. Barbacid M, Hunter E, Aaronson S. Avian reticuloendotheliosis viruses: evolutionary linkage with mammalian type c retroviruses. *J Of Virol* 1979; 30:508- 514.
 21. Gifford R, Tristem M, the evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 2003; 26 (3):291- 315.
 22. Santos V. Diagnóstico do vírus da reticuloendoteliose aviária por imunistoquímica e hibridização in situ, 2007.
 23. Charman HP, Gilden RV, Oroszlan S. Reticuloendotheliosis virus: detection of immunological relationship to mammalian type c retroviruses. *J Of Virol* 1979; 29 (3):1221- 1225.
 24. El-Sebelgy MM, Ahmed BM, Ata NS, Hussein HA. Molecular detection and characterization of reticuloendotheliosis virus in broiler breeder chickens with visceral tumors in egypt. *Internacional Journal Of Veterinary Science And Medicine* 2014; Xxx, Xxx–Xxx.
 25. Kang CY, Wong TC, Holmes KV. Comparative ultrastructural study of four reticuloendotheliosis viruses. *J Virol* 1975; 16:1027-1038.
 26. Koo H, Brown AC, Ron Y, Dougherty J. Spleen necrosis virus, an avian retrovirus, can infect primate cells. *J Of Virol* 1991; 65 (9):4769-4776.
 27. Kewalramani VN, Panganiban AT, Emerman M. Spleen necrosis virus, an avian immunosuppressive retrovirus, shares a receptor with the type d simian retroviruses. *J Of Virol* 1992; 66 (5):3026-3031.
 28. Wang G, Wang Y, Yua L, Jianga Y, Liua J, Cheng Z. New pathogenetic characters of reticuloendotheliosis virus isolated from chinese partridge in specific-pathogen-free chickens. *Microbial Pathogenesis* 2012; 53 (2):57–63.
 29. Ludford CH, Purchase HG, Cox HW, duck infectious anemia virus associated with plasmodium lophurae. *Experimental Parasitology* 1972 ;31:29-38.
-

30. Robison FR, Twiehaus MJ. Isolation of the avian reticuloendothelial virus (strain t). *Avian Dis.* 1973;18 (2):278- 288.
31. Grimes TM, Bagust TM, Dimmock CK. Experimental infection of chickens with an Australian strain of reticuloendotheliosis virus. I. Clinical, Pathological And Haematological Effects. *Avian Pathology* 1979; 8:57-68.
32. Cui Z, Sun S, Zhang Z, Meng S. Simultaneous endemic infections with subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus in commercial and local breeds of chickens. *Avian Pathol* 2009; 38 (6):443-448.
33. Jiang L, Deng X, Gao Y, Li K, Chai H, Fan Z, Ren X, Wang Q, Zhang L, Yun B, Yin C, Chen Y, Qin L, Gao H, Wang Y, Hua Y, Wang X. First isolation of reticuloendotheliosis virus from mallards in China. *Arch Virol.* 2014; 159:2051–2057.
34. Zavala G, Cheng S, Barbosa T, Haefele H. Enzootic reticuloendotheliosis in the endangered Attwater's and greater prairie chickens. *Avian Diseases.* 2006; 50:520-525.
35. Mays JK, Silva RF, Lee LF, Fadly AM. Characterization of reticuloendotheliosis virus isolates obtained from broiler breeders, turkeys, and prairie chickens located in various geographical regions in the United States. *Avian Path.* 2010; 39(5):383-389.
36. McDougall JS, Shilleto RW, Biggs PM. Further studies on vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in turkeys. *Avian Pathol.* 1981; 10:163-169.
37. Buscaglia C. Mixed infections of Marek's disease and reticuloendotheliosis viruses in layer flocks in Argentina. *Avian Diseases* 2013; 57:569–571.
38. Gopal S, Manohara P, Kathaperumal K, Chidambaram B, Dyvia K C. Differential detection of avian oncogenic viruses in poultry layer farms and turkeys by use of multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(8):2668.
39. Peterson MJ, Aguirre R, Ferro PJ, Jones DA, Lawyer T A, Peterson M N, Silvy N J. Infectious disease survey of Rio Grande wild turkeys in the Edwards Plateau of Texas. *Journal Of Wildlife Diseases* 2002; 38(4): 826–833.
-

40. Aly MM, Smith EJ, Fadly AM. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 1993; 22:543-554.
 41. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. real-time Pcr in virology. *Nucleic Acids Research* 2002; 30 (6):1292- 1305.
 42. Carlson HC, Seawright GL, Pettit JR. Reticuloendotheliosis in japanese quail. *Avian Pathol.* 1974; 3(3):169-175.
 43. Motha MXJ, Egerton JR, Sweeney AW. Some evidence of mechanical transmission of reticuloendotheliosis virus by mosquitos. *Avian Dis* 1984; 28:858-867.
 44. Isfort R, Jones D, Kost R, Witter R, Kung H. Retrovirus insertion into herpesvirus in vitro and in vivo. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1992; 89:991-995.
 45. Herting C, Coupar BEH, Gould AR, Boyle DB. Field and vaccine strains of fowlpox virus carry integrated sequences from the avian retrovirus, reticuloendotheliosis virus. *Virology* 1997; 235:367-376.
 46. Sun S, Cui Z, Wang J, Wang Z. Protective efficacy of vaccination against highly pathogenic avian influenza is dramatically suppressed by early infection of chickens with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol* 2009; 38 (1): 31- 34.
 47. Ianconescu M, Aharonovini A. Persistent viraemia in chickens subsequent to in ovo inoculation of reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol*, 1978; 7:237 – 248.
 48. Bulow VV. Immunological effects of reticuloendotheliosis virus as potential contaminant of marek's disease vaccines. *Avian Pathol* 1977; 6:383-393.
 49. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* 1989; 70: 37-43.
 50. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008; 371: 500–09.
-

51. Melandri V, Guimarães AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez- Sesma A, Alencar J, Bosch I. Serological detection of west nile virus in horses and chicken from pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 107(8): 1073-1075.
52. Disponível em:
<https://www.utmb.edu/discoveringdenguedrugstogether/Diseases/Flaviviridae%20Family.asp>). Acesso em: 20 Janeiro De 2018.
53. Kramer LD, Styer LME, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of west nile virus. Annu. Rev. Entomol. 2008; 53:61–81.
54. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West nile virus. Clin Lab Med 2010; 30: 47–65.
55. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler D. West nile virus. Infectious Diseases 2002; 2: 519-529.
56. Chávez JH, Reis VP, Silva RJ, Laure HJ, Rosa JC, Fonseca BAL, Figueiredo LTM. Production and diagnostic application of recombinant domain iii of west nile envelope protein in Brazil. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical 2013; 46(1): 97-99.
57. Disponível em : https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus. Acesso em: 20 de Janeiro de 2018.
58. Van Der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ. West nile virus in the vertebrate world. Arch Virol. 2005; 150: 637- 657.
59. Flores EF, Weiblen R. O vírus do nilo ocidental. Ciência Rural, Santa Maria 2009; 39(2):604-612.
60. Marr JS, Calisher CH. Alexander the great and west nile virus encephalitis. Emerging Infectious Diseases 2003; 9(12):1599-1603.
-

61. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of the ecology of west nile virus in egypt. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 1956; 5(4): 579-620.
62. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of west nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11 (8):1167-1173.
63. Hubálek Z, Halouzka J. West nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in europe. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5(5): 643-650.
64. Komar N, Panella NA, Burns JE, Duszka SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. Serologic evidence for west nile virus infection in birds in the new york city vicinity during an outbreak in 1999. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7 (4):621-625.
65. Steele KE, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar N, Geisbert TW, Manduca RM, Calle PP, Raphael BL, Clippinger TL, Larsen T, Smith J, Lanciotti RS, Panella NA, Mcnamara TS. pathology of fatal west nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York city, New York. *Vet Pathol.* 2000; 37:208–224.
66. Ludwin GV, Calle PP, Mangiafico JA, Raphael BL, Danner DK, Hile JA, Clippinger T L, Smith JF, Cook RA e Mcnamara T. An outbreak of west nile virus in a New York city captive wildlife population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67(1): 67–75.
67. Komar N, Clark GG. West nile virus activity in latin america and the caribbean. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2006; 19(2): 112-117.
68. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, Mackenzie Js, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, Mcnamara T, Gubler DJ. Origin of the west nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286(5448):2333-7.
69. Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, Itzhaki A, Mishal J, Siegman-Igra Y, Kitzes R, Pick N, Laudau Z, Wolf D, Bin H, Mendelson E,
-

Pitlik SD, Weinberger M. Clinical characteristics of the west nile fever outbreak, israel, 2000. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7 (9): 675-678.

70.Wodak E, Richter S, Bago Z, Revilla-Fernández S, Weissenböck KH, Nowotny NE Winter P. Detection and molecular analysis of west nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Veterinary Microbiology* 2011; 149 (5):358-366.

71.Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi É, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck HE, Nowotny N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic west nile virus, central europe. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12 (4): 618-623.

72.Rossini G, Carletti F, Bordi L, Cavrini F, Gaibani P, Landini M P, Pierro A, Capobianchi MR, Di Caro A, Sambri V. Phylogenetic analysis of west nile virus isolates, Italy, 2008–2009. *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17 (5) :903-906.

73.Linke S, Niedrig M, Kaiser A, Ellerbrok H, Müller K, Müller T, Conraths F J, Mühle R, Schmidt D, Köppen U, Bairlein F, Berthold P, Pauli G. Serologic evidence of west nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(2) : 358–364.

74.Ciota AT, Kramer LD. Vector-virus interactions and transmission dynamics of west nile virus, 2013, *Viruses*, 5: 3021-3047.

75.Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez JE, Komar N. West nile virus antibodies in colombian horses. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(9): 1497-1498.

76.Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Levis S, Enría, D. West nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerging infectious diseases* 2006; 12 (10):1559-1561.

77.Bosch I, Herrera F, Navarro JC, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, Jones M, Fernández E, Pérez N, Pérez-Emán J, Guimarães AE, Barrera R, Valero N, Ruiz J, Velásquez G,

Martinez J, Comach G, Komar N, Spielman A, Kramer. West nile virus, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13 (4) : 651–653.

78.Diaz LA, Komar N, Visintin A, Juri MJD, Stein M, Allende R L, Spinsanti L, Konigheim B, Aguilar J, Laurito M, Almirón W, Contigiani M. West nile virus in birds, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14 (4): 689-691.

79.Pauvolid-Corrêa A, Morales M A, Levis S, Figueiredo LTM, Couto-Lima D, Campos Z, Nogueira MF, Silva EE, Nogueira RMR, Schatzmayr HG. Neutralising antibodies for west nile virus in horses from brazilian pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2011; 106 (4): 467- 474.

80.Melandri V, Guimarães AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez- Sesma A, Alencar J, Bosch I. Serological detection of west nile virus in horses and chicken from pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(8): 1073-1075.

81.Souares CN, Castro MJC, Peralta JM, Freitas MRG, Sohler MP. Is west nile virus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? *Arq Neuropsiquiatr.* 2010; 68(5):761-763.

82.Ometto T, Durigon EL, de Araujo J, Aprelon R, de Aguiar DM, Cavalcante GT, Melo RM, Levi JE, de Azevedo Júnior SM, Petry MV, Neto IS, Serafini P, Villalobos E, Cunha EM, Lara Mdo C, Nava AF, Nardi MS, Hurtado R, Rodrigues R, Sherer AL, Sherer Jde F, Geraldi MP, de Seixas MM, Peterka C, Bandeira Dde S, Pradel J, Vachier N, Labruna MB, de Camargo LM, Lanciotti R, Lefrançois T. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 107(11) : 723–730.

83.Vieira, MACS, Romano, APM., Borba, AS, Silva EVP, Chiang JO, Eulálio KD, Azevedo, RSS, Rodrigues SG, Almeida-Neto WS, Vasconcelos PFC. West nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2015; 93(2): 377-379.

- 84.Sardelis MR, Turell MJ, Dohm DJ, O'Guinn ML. Vector competence of selected north american culex and coquillettidia mosquitoes for west nile virus. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7 (6): 1018-1022.
- 85.Kurolt IC, Krajinovic V, Topic A, Kuzman I, Barsi B, Markotic A. First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Research* 2014; 189: 63-66.
- 86.Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P. West nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11 (3): 425-429.
- 87.Hayes CG. West nile virus: Uganda, 1937, to New York city, 1999. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951:25-37.
- 88.Komar N. West nile virus: epidemiology and ecology in north america. *Advances in Virus Research* 2003; 61: 185-234.
- 89.Palmieri C, Franca M, Uzal F, Anderson M, Barr B, Woods L, Moore J, Woolcock P, Shivaprasad HL. Pathology and immunohistochemical findings of west nile virus infection in psittaciformes. *Veterinary Pathology* 2011; 48(5): 975-984.
- 90.Kecskeméti S, Bajmócy E, Bacsadi Á, Kiss I, Bakonyi T. Encephalitis due to West Nile virus in a sheep. *Veterinary Record* 2007; 161:568-569.
- 91.United States Geological Survey (USGS). Species Affected by West Nile Virus. 2008. Disponível em:
<http://www.nwhc.usgs.gov/disease_information/west_nile_virus>. Acesso em:
Novembro de 2017.
- 92.Steinman A, Banet-Noach C, Tal S, Levi O, Simanov L, Perk S, Malkinson M, Shpigel N. West nile virus infection in crocodiles. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(7): 887–889.
-

- 93.Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, Gordy P, Beckett S, Komar N, Gubler D, Bunning M. Alligators as west nile virus amplifiers. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10(12) : 2150–2155.
- 94.Young AJ, Jefferie W. Towards the conservation of endangered avian species: a recombinant west nile virus vaccine results in increased humoral and cellular immune responses in japanese quail (*coturnix japonica*). *Plos One* 2013; 8 (6): 1-8.
- 95.Ludu LE (Oslobanu), MiHu-Pintilie A, Anita D, Anita A, Lecollinet S, Savuta G. West nile virus reemergence in romania: a serologic survey in host species. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2014; 14 (5): 330-337.
- 96.Komar N. West Nile viral encephalitis. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 2000; 19 (1): 166-176.
- 97.Austin RJ, Whiting TL, Anderson RA, Drebot MA,. An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Canadian Veterinary Journal* 2004; 45:117-123.
- 98.Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. West nile virus: biology, transmission, and human infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2012; 25(4): 635–648.
- 99.Centers For Disease Control And Prevention (CDC). West Nile virus: statistics, surveillance, and control. Division of vector-borne infectious diseases. 2017. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em 21 Janeiro de 2018
- 100.Ometto TL. Monitoramento do vírus do oeste do nilo no BRASIL, 2013.
- 101.Widman DG, Frolov I, Mason PW. Third-generation flavivirus vaccines based on single-cycle, encapsidation-defective viruses. *Advances in Virus Research* 2008; 72: 77– 126.
-

- 102.Hayes EB, Sejvar JJ, Sherif RZ, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of west nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(8):1174- 1179.
- 103.Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *The Veterinary Journal* 2013; 195: 33–40.
- 104.Comitê Brasileiro De Registros Ornitológicos (CBRO). Disponível em: <http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>. Acesso em 06 de Maio de 2017.
- 105.Associação Brasileira Dos Exportadores De Frango (ABEF). Disponível em: <http://www.abef.com.br>. Acesso em 06 de Maio de 2014.
- 106.Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1989; 86:6196-6200.
- 107.Li K, Gao H, Gao L, Qi X, Qin L, Gao Y, Xu Y, Wang X. Protection of chickens against reticuloendotheliosis virus infection by dna vaccination. *Veterinary Microbiology* 2013; 166:59–67.
108. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012; 40(15):e115.
109. Barbosa T, Zavala G, Cheng S, Villegas P. Full genome sequence and some biological properties of reticuloendotheliosis virus strain apc-566 isolated from endangered attwater’s prairie chickens. *Virus Research* 2007; 124 : 68–77.
- 110.Singh P, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *Journal Of Virology* 2003; 77 (10): 5855- 5862.
-

111. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; 25:4876-4882.
112. Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224.
113. Posada, D. ModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008; 25(7):1253-6.
114. Swofford, DL. "PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4.0b10.," Sinauer Associates, Sunderland, 2002.
115. Johson N, Wakeley PR, Mansfield KL, Mccracken F, Haxton B, Phipps PL, Fooks AR. Assessment of a novel real-time pan-flavivirus rt-polymerase chain reaction. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases* 2010; 10 (7): 665-671.
116. Figueredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; 40 (2):224–229.
117. Yuasa N, Yoshida I, Taniguchi T. Isolation of a reticuloendotheliosis virus from chickens inoculated with marek's disease vaccine. *National Institute Animal Health Q (Tokyo)* 1976; 16:141-151.
118. Moore KM, Davis JR, Sato T, Yasuda A. Reticuloendotheliosis virus (REV) long terminal repeats incorporated in the genomes of commercial fowlpoxvirus vaccines and pigeon poxviruses without indication of the presence of infectious REV. *Avian Diseases* 200; 44 (4):827–841.
119. Bohls RL, Linares JA, Gross SL, Ferro PJ, Silvy NJ, Collisson EW. Phylogenetic analyses indicate little variation among reticuloendotheliosis viruses infecting avian species, including the endangered Attwater's prairie chicken. *Virus Research* 2006; 119:187–194.
-

120. Tadese T, Fitzgerald S, Reed WM. Detection and differentiation of re-emerging fowlpox virus (FWPV) strains carrying integrated reticuloendotheliosis virus (FWPV-REV) by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 2007; 127:39–49.
121. Jiang L, Qi X, Gao Y, Hua Y, Li K, Deng X, Wang Q, Zhang L, Chai H, Chen Y, Yin C, Gao H, Qin L, Wang Y, Qu Y, Chen Q, Fan Z, Wan X. Molecular characterization and phylogenetic analysis of the reticuloendotheliosis virus isolated from wild birds in northeast china. *Veter Microbiology* 2013; 166:68-75.
122. Figueiredo MLG, Figueiredo LT. Review on infections of the central nervous system by st. Louis encephalitis, rocio and west nile flaviviruses in brazil, 2004-2014. *Advances in Microbiology*,. 2014; 4: 955-961.
123. Gubler, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 45, n. 8, p. 1039–1046, 2007.
124. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RMG, Levi JE, Pannuti CS, Romano CM. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol* 2017; (8):1477-1479.
-

10. ANEXOS

Anexo 1. Tabelas de amostras de sangue e swab de cloaca.

Amostras São Paulo - Local Parque Zoológico		
Data das coletas: 2012 - 2014		
Nome popular	Nome científico	N
Abutre-de-cabeça-branca	<i>Trigonoceps occiptalis</i>	1
Águia-cinzenta	<i>Harpyhaliaetus coronatus</i>	1
Águia-pescadora-africana	<i>Haliaeetus vocifer</i>	1
Anacã	<i>Derophtus accipitrinus</i>	4
Araçari-banana	<i>Pteroglossus aracari</i>	1
Araçari-castanho	<i>Pteroglossus castanotis</i>	1
Araçari-de-bico-branco	<i>Pteroglossus aracari</i>	1
Araçari-poca	<i>Selenidera maculirostris</i>	3
Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	12
Arara-azul-grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	2
Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	2
Arara-vermelha-pequena	<i>Ara macao</i>	2
Ararinha-azul	<i>Cyanopsitta spixii</i>	1
Aratinga-de-testa-azul	<i>Aratinga acuticaudata</i>	1
Avestruz	<i>Struthio camelus</i>	7
Bico-de-pimenta	<i>Saltator atricollis</i>	1
Cacatua-das-moluscas	<i>Cacatua moluccensis</i>	1
Calau-grande	<i>Bucorvus abyssinicus</i>	2
Calau-rinoceronte	<i>Buceros rhinoceros</i>	2
Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	2
Cisne-de-pescoço-preto	<i>Cygnus melanocoryphus</i>	12
Cisne-negro	<i>Cygnus atratus</i>	19
Colhereiro-americano	<i>Ajaia ajaja</i>	2
Coruja-diabo	<i>Asio stygius</i>	2
Corujinha-do-mato	<i>Otus choliba</i>	2
Coscoroba	<i>Coscoroba coscoroba</i>	12
Curica-verde	<i>Graydidascalus brachyurus</i>	1

Ema	<i>Rhea americana</i>	3
Emu	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	3
Flamingo-americano	<i>Phoenicopterus ruber ruber</i>	1
Flamingo-chileno	<i>Phoenicopterus chilensis</i>	21
Flamingo-pequeno	<i>Phoeniconaias minor</i>	6
Galo-da-serra	<i>Rupicola rupicola</i>	1
Ganso-africano	<i>Anser cygnoides</i>	1
Ganso-comum	<i>Alopochen aegyptiacus</i>	7
Ganso-do-egito	<i>Cereopsis novahollandiae</i>	3
Gavião-caboclo	<i>Heterospizias meridionalis</i>	1
Gavião-carrapateiro	<i>Milvago chimachima</i>	1
Gavião-de-penacho	<i>Spizaetus ornatus</i>	9
Gavião-pegua-macaco	<i>Spizaetus tyrannus</i>	4
Gavião-pombo-grande	<i>Leucopternis polionata</i>	1
Gavião-pombo-pequeno	<i>Amadonaster lacernulatus</i>	3
Gavião-preto	<i>Buteogallus urubitinga</i>	1
Grou-coroado	<i>Balearica pavonina</i>	2
Guará	<i>Eudocimus ruber</i>	2
Guaruba	<i>Guaruba guarouba</i>	2
Harpia	<i>Harpia harpyja</i>	3
Irêre	<i>Dendrocygna viduata</i>	43
Jacuguaçu	<i>Penelope obscura</i>	1
Jacupemba	<i>Penelope superciliaris</i>	1
Jacutinga	<i>Pipile jacutinga</i>	1
Mainá-de-crista	<i>Acridotheres cristatellus</i>	1
Maitaca-de-cabeça-azul	<i>Pionus menstruus</i>	3
Maracanã-guaçu	<i>Ara severa</i>	1
Marianiinha-de-cabeça-amarela	<i>Pionites leucogaster</i>	1
Mocho-orelhudo	<i>Asio clamator</i>	2
Murucututu	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	2
Mutum-do-norte	<i>Mitu tomentosa</i>	1
Papa-cacau	<i>Amazona festiva</i>	3
Papagaio-de-cara-roxa	<i>Amazona brasiliensis</i>	5
Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	4
Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	2

Papagaio-escalate	<i>Eos bornea</i>	2
Papagaio-moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	4
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	7
Pato-de-madeira-australiano	<i>Chenoneta jubata</i>	1
Pato-ferrão	<i>Plectropterus gambensis</i>	3
Pato-ferrugineo	Pato-ferrugineo	4
Paturi-preta	<i>Netta erythrophthalma</i>	1
Pavão-indiano	<i>Pavo cristatus</i>	4
Pavão-verde	<i>Pavo muticus</i>	1
Pelicano-branco	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	1
Periquitão-maracana	<i>Aratinga leucophthalmus</i>	2
Periquito-de-cabeça-preta	<i>Nandayus nenday</i>	2
Pombo-comum	<i>Columbia livia</i>	2
Suindara	<i>Tyto alba</i>	3
Tadorna-paraíso	<i>Tadorna variegata</i>	2
Tadorna-radjah	<i>Tadorna radjah</i>	3
Tiriba-de-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	2
Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	2
Tucano-de-peito-branco	<i>Ramphastos tucannus</i>	2
Tucano-toco	<i>Ramphastos toco</i>	4
Turaco-violeta	<i>Musophaga violacea</i>	3
Uru	<i>Odontophorus capueira</i>	3
Urubu-rei	<i>Sarcoramphus papa</i>	1
Urumutum	<i>Nothocrax urumutum</i>	4
-	<i>Chunga burmeisteri</i>	1
-	<i>Tauraco leucotis</i>	1
TOTAL		309

Amostras São Paulo – Local Parque Ibirapuera**Data das coletas: Fevereiro – Abril de 2015**

Nome popular	Nome científico	N
Cisne - negro	<i>Cygnus atratus</i>	36
Ganso-africano	<i>Anser cygnoides</i>	9
Ganso-sinaleiro-chines	-	36
Ganso-toulouse	-	16
TOTAL		97

Amostras São Paulo – Local Fazenda Castanheira

Nome popular	Nome científico	N
Arapaçu-rajado	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	1
Bem-te-vi	<i>Pitangus sulphuratus</i>	3
Bico-chato-de-orelha-preta	<i>Tolmomyias sulphurens</i>	1
Cabeçudo	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	2
Caneleiro	<i>Pachyramphus castaneus</i>	1
Capitão-de-saíra	<i>Attila rufus</i>	1
Juriti-gemeleira	<i>Leptotila rufaxilla</i>	3
Juruti-pupu	<i>Leptotila verreauxi</i>	1
Juruviara	<i>Vireo olivaceus</i>	1
Pica-pau-branco	<i>Vireo olivaceus</i>	1
Pica-pau-de-cabeça-amarela	<i>Celeus flavescens</i>	14
Pitiguari	<i>Cyclarhis gujanensis</i>	2
Sabiá-barranco	<i>Turdus leucomelas</i>	4
Sabiá-coleira	<i>Turdus albicollis</i>	3
Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	7
Saí-azul	<i>Dacnis cayana</i>	3
Sanhaçu-cinzentos	<i>Tangara sayaca</i>	11
Sanhaçu-do-encontro-amarelo	<i>Tangara ornata</i>	2
Tico-tico	<i>Zonotrichia capensis</i>	3
Tiê-de-topete	<i>Lanio melanops</i>	12
Tiê-preto	<i>Tachyphonus coronatus</i>	10
Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastus dicolorus</i>	2
TOTAL		86

Amostras São Paulo – Local Parque Anhaguera

Nome popular	Nome científico	N
Cabeçudo	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	1
Cambacica	<i>Coereba flaveola</i>	7
Curruíra	<i>Troglodytes musculus</i>	1

Juruviara	<i>Vireo Olivaceus</i>	3
Pica-pau-de-cabeça-amarela	<i>Celeus flavescens</i>	3
Pichororé	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	1
Pitiguari	<i>Cyclarhis gujanensis</i>	4
Sabiá-barranco	<i>Turdus leucomelas</i>	3
Sabiá-coleira	<i>Turdus albicollis</i>	2
Sabiá-laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	7
Saíra-amarela	<i>Tangara cayana</i>	2
Sanhaçu-cinzento	<i>Tangara sayaca</i>	18
Sanhaçu-do-encontro-amarelo	<i>Tangara ornata</i>	3
Tico-tico	<i>Zonotrichia capensis</i>	9
Tiê-de-topete	<i>Lanio melanops</i>	1
Tiê-preto	<i>Tachyphonus coronatus</i>	25
TOTAL		90

Amostras São Paulo – Local Parque Ibirapuera

Nome popular	Nome científico	N
Cardeal	<i>Paroaria coronata</i>	1
Cisne-negro	<i>Cygnus atratus</i>	3
Ganso-toulouse	<i>Anser anser</i>	5
Garça branca pequena	<i>Egretta thula</i>	1
Marreco mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	3
Marreco- pequim	<i>Anas sp.</i>	7
TOTAL		20

Amostras Pará – Local Vigia
Data da coleta: 2005-2006

Nome popular	Nome científico	N
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	2
Pato- Selvagem	<i>Cairina mochata</i>	130
Peru-selvagem	<i>Meliagres gallopavo</i>	11
TOTAL		143

Amostras Pará – Local Marahú
Data da coleta: 2005

Nome popular	Nome científico	N
Pato-selvagem	<i>Cairina mochata</i>	3
TOTAL		3

Amostras Pará – Local Mosqueiro
Data da coleta: 2005

Nome popular	Nome científico	N
Azulão-da-amazonia	<i>Passerina cyanoides</i>	1
Choca-lisa	<i>Thamnophilus aethiops</i>	2
Choca-preta-e-cinza	<i>Thamnophilus nigrocinereus</i>	1
Pica-pau-fura-laranja	<i>Venilionis affinis</i>	1
Uirapuruzinho	<i>Tyraneutes stolzmanni</i>	2
TOTAL		7

Amostras Pará – Local Marajó
Data da coleta: 2006

Nome popular	Nome científico	N
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	6
Pato-selvagem	<i>Cairina mochata</i>	77
TOTAL		83

Amostras Pará – Local Vila Maracajá
Data da coleta: 2006

Nome popular	Nome científico	N
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	6
Pato-selvagem	<i>Cairina mochata</i>	39
TOTAL		45

Amostras Pará – Local São João Ramos
Data da coleta: 2006

Nome popular	Nome científico	N
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	2
Pato-selvagem	<i>Cairina mochata</i>	33
TOTAL		35

Amostras Pará – Local Bragança
Data da coleta: 2006

Nome popular	Nome científico	N
Maçariquinho	<i>Calidris pusilla</i>	3
Pato-selvagem	<i>Calidris canutus</i>	1
Trinta-réis-boreal	<i>Sterna hirundo</i>	3
-	<i>Actites macularia</i>	3
TOTAL		10

Amostras Pará – Local Marabitaná
Data da coleta: 2005-2006

Nome popular	Nome científico	N
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	5
Pato-selvagem	<i>Cairina mochata</i>	100
Peru-selvagem	<i>Meliagres gallopavo</i>	28
TOTAL		133

Anexo 2. Tabelas de amostras de soro.

Amostras São Paulo – Local Parque Ibirapuera
Data das coletas: Fevereiro – Abril de 2015

Nome popular	Nome científico	N
Cisne - negro	<i>Cygnus atratus</i>	36
Ganso-africano	<i>Anser cygnoides</i>	9
Ganso-sinaleiro-chines	-	35
Ganso-toulouse	-	14
TOTAL		94

Amostras São Paulo - Local Parque Zoológico
Data das coletas: 2012 - 2014

Nome popular	Nome científico	N
Abutre-de-cabeça-branca	<i>Trigonoceps occipitalis</i>	1
Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	9
Arara-vermelha-pequena	<i>Ara macao</i>	1
Ararinha-azul	<i>Cyanopsitta spixii</i>	1
Avestruz	<i>Struthio camelus</i>	7
Cisne-de-pescoço-preto	<i>Cygnus melanocoryphus</i>	1
Colhereiro-americano	<i>Ajaia ajaja</i>	1
Ema	<i>Rhea americana</i>	1
Emu	<i>Dromaius novahollandiae</i>	1

Flamingo-chileno	<i>Phoenicopterus chilensis</i>	9
Ganso-africano	<i>Anser cygnoides</i>	1
Ganso-comum	<i>Cereopsis novahollandiae</i>	1
Gavião-pombo-pequeno	<i>Amadonaster lacernulatus</i>	1
Gavião-preto	<i>Buteogallus urubitinga</i>	1
Grou-coroado	<i>Balearica pavonina</i>	1
Harpia	<i>Harpia harpyja</i>	1
Irêre	<i>Dendrocygna viduata</i>	1
Maitaca-de-cabeça-azul	<i>Pionus menstruus</i>	1
Maracanã-guaçu	<i>Ara severa</i>	1
Murucututu	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	2
Papa-cacau	<i>Amazona festiva</i>	1
Papagaio-de-cara-roxa	<i>Amazona brasiliensis</i>	2
Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	1
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	2
Pato-ferrão	<i>Plectropterus gambensis</i>	1
Pavão-indiano	<i>Pavo cristatus</i>	1
Pomba-comum	<i>Columbia livia</i>	13
Seriema	<i>Chunga burmeisteri</i>	1
Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	1
Tucano-toco	<i>Ramphastos toco</i>	1
Urubu-rei	<i>Sarcoramphus papa</i>	1
TOTAL		70

Anexo 3. Artigo**First report of avian Reticuloendotheliosis virus (REV) in Brazil**

G. S. Caleiro¹, C. F. Nunes¹; P. R. Urbano¹; P. L. Ramos², K. Kirchgatter³, C. R. F. Chagas^{2,3}, J. B. da Cruz², J. de Araujo⁵, E. L. Durigon⁵, L. M. Thomazelli⁵, J. L. Summa⁴, D. C. Edwards⁶, C. M. Romano^{1*}.

¹ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - HCFMUSP (LIM52), Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 05403-000, São Paulo, Brasil. ² Fundação Zoológico de São Paulo, Av. Miguel Estefano, 4241, Vila Santo Estefano, 04301-002, São Paulo, Brasil. ³ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SUCEN, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, Cerqueira Cesar, 05403-000, São Paulo, Brasil. ⁴ Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3), Parque Ibirapuera, Av. Quarto Centenário 04030-000, São Paulo, Brasil. ⁵ Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Butantã, 05508-900 São Paulo, Brasil. ⁶ Tarleton state University, 1333 W Washington St, Stephenville, 76401, Texas, United States.

Corresponding author: Camila Malta Romano

cmromano@usp.br

phone : (5511) 30618668

Abstract

Reticuloendotheliosis (RE) is an immunosuppressive and oncogenic disease that affects numerous avian species worldwide. The causative agent is a retrovirus (Reticuloendotheliosis retrovirus - REV), which has been found in several countries, including United States, China, Taiwan, and more recently Argentina. Giving the numerous migratory routes between United States and Brazil and also between Argentina and Brazil, we searched for REV presence in birds from southeastern and northern states of Brazil, São Paulo city and Pará respectively. REV was not found in São Paulo birds, but we detected REV genome in three avian species sampled in Pará: muskovy ducks (*Cairina moschata*), wild turkeys (*Meleagris gallopavo*), and chickens (*Gallus gallus domesticus*). Phylogenetic analysis of LTR and envelope gene indicated that the virus circulating in Brazil is closely related to the United States viruses. This is the first report of REV in Brazil and the first phylogenetic analysis of REV from South America.

Introduction

Reticuloendotheliosis (RE) is an immunosuppressive and oncogenic infectious disease that affects numerous species of birds, mainly waterbirds (Anseriformes) and gamebirds (Galliformes) (Davidson & Braverman, 2005; Witter & Fadly, 2003; Niewiadomska & Gifford, 2013). RE represents a major sanitary problem for several reasons. A serious and persistent inhibition of humoral responses to the avian influenza vaccine may occur in broilers, decreasing its protective efficacy (Sun *et al.*, 2009). The humoral responses against Newcastle virus (NDV) (Ianconescu *et al.*, 1978), Marek virus (MDV) (Witter *et al.*, 1979), and turkey herpesvirus (HVT) are also suppressed in ill birds (Bullock, 1977).

The etiologic agent of avian reticuloendotheliosis is a Gammaretrovirus, family Retroviridae, with approximately 8300 nucleotides (Barbacid *et al.*, 1979). The transmission of REV occurs both vertically and horizontally, and although horizontal is the most common route, animals with persistent viremia can transmit the REV to their progeny, but usually do so at low frequency (Witter & Fadly, 2003). The virus was first identified in the United States in 1958 (Sigh *et al.*, 2003). Some years later, REV was isolated in other countries including China, Taiwan, and Australia. The primary economic consequence of infection is the high mortality rate of infected chickens (Bagust *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Although REV is widespread, studies of the genetic and antigenic characteristics of isolates from different avian species or distinct geographical regions are rare.

Recently, evidence of REV was found in fowlpox-vaccinated flocks in Argentina, indicating that South American birds were already exposed to REV (Buscaglia, 2013). Also, a large number of birds migrate from North to South America. The Brazilian coast serves as an important stopover site for migratory birds, increasing the likelihood of REV introduction into Brazilian flocks. Before the present report, there was no record of REV circulation in Brazil.

In addition to the fact that Brazil has more than 2000 species of wild birds, many of which are under threat of extinction (CBRO), the country is one of the largest exporters of chicken meat and the second largest producer in the world. Due to the commercial importance of Brazil and the presence of such rich fauna, it is important to know if REV is currently present in Brazil. We investigated the presence of REV in birds from two different regions (north and southeast) of Brazil and explored the relationship between REV found in Brazil and other geographic isolates.

Materials and Methods

Sites and samples

A total of 1068 samples (blood and/or cloacal swabs) were collected from several avian species from two states of Brazil: São Paulo and Pará (southeastern and northern region respectively). São Paulo samples (N= 603) were provided from four locations within the city: Ibirapuera Park, São Paulo Zoological Foundation, Anhanguera Park, and Castanheiras farm (Figure 1). All samples from São Paulo were collected between 2012 and 2015 and included wild and captive birds, mostly Anseriformes and Passeriformes. Pará (N= 465) was represented by 8 cities (Fig. 1). Species sampled in the northern region of the country included wild ducks, chickens, and wild turkeys. All birds were adults and sampled between the years of 2005 and 2006.

Figure 1: Brazil map. Pará state is highlighted on the top showing the cities where samples were collected. In the southeast region of the country, São Paulo sampling sites are shown.

REV detection

We searched for proviral DNA using genomic DNA extracted from blood and cloacal swabs. DNA was extracted from São Paulo samples using phenol chloroform method, according to Mesquita *et al.* (2001). cDNA of samples from Pará were obtained according to Thomazelli *et al.* (2012) and kindly provided by Dr Jansen Araújo. To determine the quality of the genomic material, a conventional PCR for avian mitochondrial DNA was performed using Cytochrome b primers - L14841. 5' AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3', and BH15149. 5' AAAGTGCAGCCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3 that generate a fragment of 386 base pairs (Kocher *et al.*, 1989). The presence of REV proviral DNA/cDNA was inspected by real time PCR directed to the gp90 gene (env gene) using primers described elsewhere (Li *et al.*, 2013). Mixes were prepared using 2.5 mM of each primer, 7.5 µL of sterile MilliQ water, 12.5 µL of MasterMix SYBR® Green (LifeTechnologies®), and 3 µL of purified DNA or cDNA. The reaction cycling parameters were: 50°C at 2 minutes, 95°C at 5 minutes for initial denaturation, followed by 40 cycles of 95°C at 15 seconds, 55°C at 45 seconds and 60° C at 1 minute. As a positive control, a plasmid containing the region amplified by the primers was constructed and commercially synthesized (GenScript USA).

To better characterize the isolates, we amplified and sequenced partial LTR-U5/gag,

gag and envelope genes from 9 positive samples using primers described by Barbosa *et al.* (2007): Ltr2 666F. 5' GCAGGGATCCGGACTGAATCCGTAG 3', Ltr2 1474R. 5' ACTTTTGGCTAGCTAACAGAACTTT 3', and gag1 2474R 5' TCCTCTCTCCGCTCTACTCTCC 3' were described by Singh *et al.* (2003). Other primers designed by our group were also used: gag1 1306F. 5' TGGTAGCCGCGGTCAGGAATATAGT 3' and env gp90 7242R. 5' GCCAGTATGCACAGCCCTATCCA 3'. To amplify partial LTR containing the primer binding site and gag we used primers described by Barbosa *et al.* (2007): for partial gag gene gag1-1306 Forward with gag 1-2474 Reverse were used and for envelope forward env gp90 described by Li *et al.* (2013) and env gp90 7242-reverse were used.

REV sequencing and phylogenetic analysis

Fragments amplified were sequenced directly by Sanger method using the same primers used for amplification. Reads were inspected for quality and the consensus sequences were built using CLC genomic workbench v.5 (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>).

Consensus sequences of partial LTR/gag (808 base pairs), gag (1168 base pairs), and envelope (approximately 600 base pairs) were aligned and compared to reference strains and other sequences retrieved from GenBank representing worldwide REV (n=16). Phylogenetic trees were reconstructed under maximum likelihood method in PhyML using K80 as the best nucleotide substitution model for all fragments as determined by jModeltest (Darriba *et al.*, 2012). Only sequences built with high quality reads (phred >30) were used for phylogenetic reconstructions. Genetic distance at the nucleotide level (p distance) between the main REV strains and one representative Brazilian REV was estimated for LTR/gag, gag, and envelope partial fragments.

Results

According to the cytochrome b screening test, 467 of the 603 São Paulo samples and 412 samples among the 465 from Pará were high enough quality to investigate REV infection status. Overall, 74 samples from Pará (18%), including 65 muskovy ducks (*Cairina moschata*), 6 wild turkeys (*Meleagris gallopavo*), and 2 chickens (*Gallus gallus domesticus*), tested positive for REV. No positive results were seen for São Paulo birds.

To determine the relationship between Brazilian and worldwide strains of REV, partial sequences from LTR, gag, and envelope genes were generated from 9 positive samples and

phylogenetically compared to known REV sequences (Figure 2). Sequences with sufficient quality for further analysis were obtained for LTR/gag from seven samples, envelope sequences from five, and gag only was considered with sufficient quality from one sample. For this reason, phylogenetic trees were constructed using only LTR/gag and envelope fragments (Figure 2).

Possibly due to the low viral load present in chickens and turkeys from Pará, only REV from muskovy ducks was successfully sequenced. In both trees, Brazilian REV clustered together with sequences sampled in the USA, such as APC-566 and other American isolates. Estimates of genetic distance based on partial LTR/gag, gag, and envelope from sample 2036 also agree that Brazilian REV is more closely related to the USA samples representative of subtype 3, such as MD-2 and APC-566, rather than to SNV strain or China isolates (Fig. 2A and 2B and Table 1). Sequences generated in this study are available in GenBank accession numbers MG953804 – MG953809 and supplementary material S1.

Table 1. Genetic Identity at nucleotide level between Brazilian REV and reference strains.

REV_2036_PA_Br				
Reference	GenBank ID	LTR/gag	Gag	Env
APC-566	DQ387450	99.8%	100%	99.8%
SNV	DQ003591	96%	97.5%	96.4%
MD-2	JX912710	99.4%	100%	100%
FPV	AF246698	99.6%	100%	100%
CSV	DQ237905	NA ^a	NA	99.5%
HA9901 (China)	AY842951	96%	98%	97.6%

Distance matrix (p distance)

^aNA – sequence not available

Figure 2: Maximum likelihood Phylogenetic reconstruction showing the relationships between REV from Brazil and other isolates. Brazilian sequences (in red) are from Muskovy ducks. The trees were made with partial sequences from REV env (A) and LTR/gag (B) available at GenBank.

Discussion

We describe here the presence of reticuloendotheliosis virus in Brazil for the first time. All REV positive birds found in this work were sampled in Pará and belong to three species: Muskovy ducks (*Cairina moschata*), chicken (*Gallus gallus domesticus*), and wild turkey (*Meleagris gallopavo*). These animals are free living so have no history of being vaccinated. Muskovy ducks are native to Mexico, Central, and South America. There are some populations of Muskovy ducks in the United States (mainly in Florida and southern Texas), but they are essentially non-migratory or irregular migrants without any established migration patterns, only migrating short distances to avoid dry weather with fluctuating water conditions. Chickens and turkeys, most frequently associated with REV infection, are also non-migratory birds. Therefore, it is unlikely that the positive birds found in Brazil were infected elsewhere.

The state of Pará is located in northern coastal Brazil, with a tropical rainforest climate. Due to its geographic location and ecosystem, Pará is a stopover site for shorebirds coming from the northern hemisphere during the migration season. Also, several species of migratory birds that have Argentina and United State as their final destination pass through Brazil during their flight. The similarity between Brazilian REV and the USA viruses suggest that the United States may be the source of the viruses circulating in Brazil. Unfortunately, no sequence data is available for REV found in Argentina for comparison (Buscaglia, 2013).

Representative strains of REV include the defective REV-T and the non-defective REV-A, both isolated from turkeys. Spleen necrosis virus (SNV) and duck infectious anemia virus are also representative REV strains from ducks, and the CSV strain was originally isolated from a chicken (Chick syncytial virus). Other REV lineages isolated from Greater prairie chickens (GPC) and Attwater's prairie chickens (APC) are also reference strains. REV can also exist in an integrated proviral form in large DNA viruses, as it is in the attenuated Marek virus vaccine (MD-2 strain) and field and vaccine strains of Fowlpox viruses (FWPV-REV) (Herting *et al.*, 1997; Isfort *et al.*, 1992; Yuasa *et al.*, 1976). Also, the viruses integrated into the vaccines can be either infectious (Herting *et al.*, 1997) or non-infectious (Moore *et al.*, 2000).

Because there is relatively little genetic variation among REV strains (Bohls *et al.*, 2006), it is very difficult to determine the origin and classification of an isolate. In fact, Brazilian REV differs only 0.0 – 0.5% from both FPV and MD-2 integrated REVs and non-integrated APC-566 and CSV. We searched for point mutations described by Tadese *et al.* (2007), which were specific for FPV-REV. According to this method, the Brazilian REV strains are all non-FPV integrated strains. However, other FPV-REV sequences are available at GenBank, and their envelope sequences do not contain the signature described by Tadese *et al.* (2007) (for example, the field FPV-REV ID# KY498002, ID# AF246698, and ID# JX217830), indicating that some genetic variability among integrated strains exists and determining the integration status based on few point mutations is challenging. Therefore, it remains to be determined if Brazilian REV is present as infectious particles or if it is integrated in a large

DNA virus genome.

Reticuloendotheliosis virus can infect a number of species, including a variety of poultry, wild birds, and waterfowl like chickens, ducks, geese, and prairie chickens. REV found in the present work was identified in muskovy ducks, chickens, and turkeys by Real time PCR. For unknown reasons, we could amplify and sequence only viruses from ducks. It is possible that the virus was present in a low viral load in other species, and we could not generate large amplicons or alternatively, primers used to amplify LTR/gag, gag and envelope fragments are not able to amplify the variants present in chickens and turkeys. Further studies are needed to determine if more than one REV lineage is present in Brazil. Also, although the virus was not found in São Paulo, it has to be noted that the birds were sampled in the urban center of the state. Additional birds sampled in less urban areas from São Paulo and other regions need to be investigated to determine if the REV is restricted to the northern region or if it is already spread.

In conclusion, we detected REV in Brazil for the first time and presented the first sequence of viruses from South America. As expected, REV found in Brazil is very similar to other common circulating strains and was likely carried by migratory birds that stop in the northern part of the country to rest. Results presented here point to the need to further determine the prevalence of REV in Brazilian wild and captive birds and also to perform risk assessment studies dedicated to free-living and commercial avian species.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Project #2015/05958-3). Giovana S Caleiro holds a CAPES scholarship.

Ethical considerations

All procedures involving wild and captive birds were approved by the Animal Ethics Committee from the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo under protocol 000283A and licensed by the Ministério do Meio Ambiente-MMA at the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO), Numbers 34605-7 45527-2, 54616-1 and 201/2006 CGFAU.

ORCID

Camila Malta Romano <https://orcid.org/000-0003-4550-1987>

References

- Bagust TJ, Grimes, TM, Ratnamohan N (1981) Experimental infection of chickens with an australian strain of reticuloendotheliosis virus 3 persistent infection and transmission by the adult hen. *Avian Pathology*, 10, 375-385.
- Barbacid M, Hunter, E, Aaronson AS (1979) Avian reticuloendotheliosis viruses: evolutionary linkage with mammalian type C retroviruses. *Journal of Virology*, 30, 508- 514.
- Barbosa T, Zavala G, Cheng S, Villegas P (2007) Full genome sequence and some biological properties of reticuloendotheliosis virus strain APC-566 isolated from endangered attwater's prairie chickens. *Virus Research*, 124, 68–77.
- Bohls RL, Linares JA, Gross SL, Ferro PJ, Silvy NJ, Collisson EW (2006) Phylogenetic analyses indicate little variation among reticuloendotheliosis viruses infecting avian species, including the endangered Attwater's prairie chicken. *Virus Research*, 119, 187–194.
- Bulow VV (1977) Immunological effects of reticuloendotheliosis virus as potential contaminant of marek's disease vaccines. *Avian Pathology*, 6,383-393.
- Buscaglia, C (2013) Mixed infections of marek's disease and reticuloendotheliosis viruses in layer flocks in Argentina. *Avian diseases*, 57, 569–571.
- Comitê brasileiro de registros ornitológicos. IOP Publishing PhysicsWeb <http://www.cbro.org.br/CBRO/listabr.htm>. Accessed 06 May 2016.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- Davidson I, Braverman Y (2005) Insect contribution to horizontal transmission of reticuloendotheliosis vírus. *Journal of Medical Entomology*, 42(2), 128-133.
- Hertig C, Coupar BE, Gould AR, Boyle DB (1997) Field and vaccine strains of fowlpox virus carry integrated sequences from the avian retrovirus, Reticuloendotheliosis virus. *Virology*, 235(2), 367-3767.
- Ianconescu M, Aharonovini A (1978) Persistent viraemia in chickens subsequent to in ovo inoculation of reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathology*, 7, 237-248.
- Isfort R, Jones D, Kost R, Witter R, Kung H (1992) Retrovirus insertion into herpesvirus in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 991-995.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6196-6200.
- Li K, Gao H, Gao L, Qi X, Qin L, Gao Y, Xu Y, Wang X (2012) Development of taqMan real-time pcr assay for detection and quantitation of reticuloendotheliosis virus. *Journal of Virology Methods*, 179, 402-408.
- Li K, Gao H, Gao L, Qi X, Qin L, Gao Y, Xu Y, Wang X (2013) Protection of chickens against reticuloendotheliosis virus infection by DNA vaccination. *Veterinary Microbiology*, 166, 59–67.
- Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD (2001) Evaluation of three methods of dna extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic dna by means of the pcr technique. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 15(4), 314-319.

Moore KM, Davis JR, Sato T, Yasuda A (2000) Reticuloendotheliosis virus (REV) long terminal repeats incorporated in the genomes of commercial fowlpoxvirus vaccines and pigeon poxviruses without indication of the presence of infectious REV. *Avian Diseases*, 44 (4), 827–841.

Niewiadomska AM, Gifford RJ (2013) The extraordinary evolutionary history of the reticuloendotheliosis viruses. *Plos One*, 11, 1-16.

Singh P, Schnitzlein WM, Tripathy DN (2003) Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *Journal Of Virology*, 77 (10), 5855- 5862.

Sun S, Cui Z, Wang J, Wang Z (2009) Protective efficacy of vaccination against highly pathogenic avian influenza is dramatically suppressed by early infection of chickens with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathology*, 38 (1), 31- 34.

Tadese T, Fitzgerald S, Reed WM (2007) Detection and differentiation of re-emerging fowlpox virus (FWPV) strains carrying integrated reticuloendotheliosis virus (FWPV-REV) by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, 127, 39–49.

Thomazelli LM, Araujo JD, Ferreira CS, Hurtado R, Oliveira DB, Ometto T, Golono M, Sanfilippo L, Demetrio C, Figueiredo ML, Durigon EL (2012) Molecular surveillance of the newcastle disease virus in domestic and wild birds on the north eastern coast and amazon biome of Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 14 (1), 01-07.

Yuasa N, Yoshida I, Taniguchi T (1976) Isolation of a reticuloendotheliosis virus from chickens inoculated with marek's disease vaccine. *National Institute Animal Health Q (Tokyo)*, 16, 141-151.

Wang CC, Lee E, Lin CY, Wang CH (2009) The complete sequence of a reticuloendotheliosis virus isolated from chickens, Taiwan. *Veterinary Journal*, 35 (2), 87-92.

Witter RL, Fadly AM (2003) Reticuloendotheliosis. *Diseases of poultry*, 11, 517-535.

Witter RL, Lee LF, Bacon LD, Smith EJ (1979) Depression of vacinal immunity to marek's disease by infection with reticuloendotheliosis virus. *Infection and Immunity*, 26(1), 90-9.

Anexo 4. Prêmio como melhor poster no congresso "World Congress on Virology & Infectious Diseases" em Novembro de 2017 em Miami - E.U.A.

Certificate

of Recognition

Innovinc

*Innovinc International and Organizing Committee Members of
Virology Congress 2017 applaud*

Dr./Mr./Ms./ GIOVANA CALEIRO

for his/her Phenomenal and worthy Best Poster presentation on

At

*"World Congress on Virology & Infectious Diseases"
on November 20 - 22, 2017, Miami, USA*

G. D. Harkiss
Gordon Harkiss,
MV Diagnostics Ltd, UK