

MÁRCIO JUNIO LIMA SICONELLI

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO
OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO: AVES E EQUÍDEOS COMO
POPULAÇÃO SENTINELA**

Versão Original

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Clínica
Médica para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes
da Fonseca

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Siconelli, Márcio Junio Lima.

Avaliação da circulação do vírus da febre do Nilo Ocidental no Estado de São Paulo: aves e equídeos como população sentinela.

144 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Fonseca, Benedito Antonio Lopes da.

1. Febre do Nilo Ocidental. 2. Aves. 3. Equídeos. 4. Síndrome neurológica. 5. Zoonoses.

Nome: SICONELLI, Márcio Júnio Lima

Título: **Avaliação da circulação do vírus da febre do Nilo Ocidental no Estado de São Paulo: aves e equídeos como população sentinela**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Sempre aos meus pais, Márcio Antônio Siconelli e Maria Ferreira de Lima Siconelli, por todo o amor, carinho, paciência e incansável dedicação durante toda essa jornada. Vocês são os exemplos que busco seguir. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas graças e conquistas alcançadas ao longo do caminho, uma trajetória nada fácil e que por vezes, por não entender a sua vontade, pensei em desistir. O senhor é sábio e sempre nos ensina diante de cada dificuldade. Obrigado por me manter no caminho e mostrar que o tempo é o melhor remédio;

Aos meus pais Márcio Antônio Siconelli e Maria Ferreria de Lima Siconelli, pelo amor, carinho e apoio incondicional. Por estarem ao meu lado, me manter calmo e mostrar que sempre há uma saída diante das dificuldades. Vocês ajudaram o impossível a se tornar possível. Se cheguei aqui, vocês sempre foram e continuam sendo parte fundamental dessa caminhada;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca, que acreditou na execução de um projeto dessa grandeza, e manteve seu laboratório aberto para que eu continuasse me desenvolvendo, não apenas profissionalmente, mas também pessoalmente. Os desafios foram muitos, cai e levantei por diversas vezes e o senhor sempre esteve ali oferecendo todo o apoio necessário. Obrigado pela amizade, confiança, ensinamentos, exemplos, disponibilidade e, principalmente, paciência. Fundamental quando a ansiedade assume o controle e o desespero se instala. Independente da ideia apresentada, o senhor sempre esteve aberto e ofereceu todo o suporte necessário. Penso que tivemos muitas conquistas ao longe desse projeto;

À Adriana Aparecida Dispósito Ferreira, que desde o mestrado tem acompanhado e incentivado minha trajetória. Sempre disposta a ajudar, com sua amizade, boas conversas e conselhos frente as adversidades que surgiam pelo caminho. Foram anos intensos e que sem o seu apoio, muita coisa não teria se desenrolado;

A Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho pela amizade e cuidado que sempre teve comigo, com conversas, conselhos e reflexões. Independente da distância, sempre se fez presente, orientando diante de tantas incertezas desse

caminho. A senhora sempre foi uma entusiasta do meu trabalho e me ajudou a construir muitas pontes. Obrigado por continuar contribuindo com a minha formação, e estar presente em mais essa etapa;

Ao Vitor Gonçalves Floriano, pela amizade durante todos esses anos de laboratório e parceria em mais esse projeto. Pelas conversas e apoio nos momentos de grandes dificuldades;

À Luiza Antunes de Castro Jorge e ao Daniel Macedo de Melo Jorge, por me ajudarem na formatação e desenvolvimento desse projeto, buscando o melhor caminho a ser seguido, a fim de obter os melhores resultados. Foram muitas conversas, conselhos e troca de experiências;

À Nicole Trevizani Chiappa Campos, minha namorada, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e paciência nesses últimos dois anos. Tem sido anos intensos e de muitas instabilidades emocionais, fico feliz que você esteja junto nessa caminhada me ajudando a seguir;

À Sofia de Moura Lacerda Sarantopoulos e à Jéssica Caroline de Almeida Dias, minhas primeiras coorientadas, que me auxiliaram em várias etapas desse e de outros projetos e que compartilharam comigo muitos momentos. Obrigado pela oportunidade de transmitir algum conhecimento e experiência a vocês. Tornaram-se boas amigadas;

Ao Jhefferson Barbosa Guimarães, pelo auxílio, experiência e conversas durante os dias de trabalho no laboratório;

Às pesquisadoras Dra. Juliana Mariotti Guerra e Dra. Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes, do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo por trabalharem conjuntamente na padronização do diagnóstico e investigação do vírus da febre do Nilo Ocidental, ampliando a capacidade de estudo do projeto;

À Profa. Dra. Karin Werther, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, FCAV/Unesp, pela amizade, ensinamentos e colaboração nesse trabalho. A senhora é um exemplo de conduta dentro da medicina de animais selvagens, sou grato pelo seu apoio e pelo seu incentivo durante nossas conversas;

Ao Dr. Enio Mori, pesquisador do Instituto Pasteur de São Paulo, por colaborar no desenvolvimento desse projeto e se tornar um parceiro dentro da medicina veterinária;

À Dra. Maria do Carmo Custódio Souza Hunold Lara e Dra. Eliana Monteforte Cassaro Villalobos, pesquisadoras do Instituto Biológico de São Paulo, por colaborarem nesse projeto com o encaminhamento de amostras e estarem sempre disponíveis a ajudar;

Ao Dr. Benedito Donizete Menozzi, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, FMVZ/Unesp, pelo encaminhamento de amostras para o desenvolvimento desse projeto;

Ao Bruno Marreto Canonico e Caroline Pessi, do Instituto de Pesquisas Cananeia, que adicionaram à sua rotina mais uma coleta durante os exames necroscópicos e encaminharam essas amostras para esse estudo;

Ao Dr. Marcelo Fernandes Camargos, do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, por possibilitar a colaboração no diagnóstico e epidemiologia das arboviroses de importância veterinária e humana;

À Elisabete Paganini, do Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) XXIV, uma amiga e apoiadora dos trabalhos de vigilância, sempre disposta a colaborar conosco;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo e ao Programa de Clínica Médica, que ao me receber, permitiram continuar a minha formação, oferecendo oportunidades para o meu desenvolvimento. Em especial ao

Emerson Quirino, secretário do programa, que não mediu esforços para ajudar em todas as minhas dificuldades e solicitações, tornando essa etapa o mais serena;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal/SP, minha casa, onde me formei e aos professores e hoje, amigos, mantem as portas abertas para mim, oferecendo apoio e muitas oportunidades;

Ao Joe (o Cão), meu “cãopanheiro”, que acompanha a minha jornada desde a graduação, sendo meu apoio incondicional estando onde e quando ninguém está. Sempre a minha espera, com muito amor, alegria, lambidas e espirros inesperados. Você é meu suporte diário;

Ao pequeno Bartô (o Black dog), recém-chegado e que veio para devolver o movimento à nossa vida, ser companhia para o Joe (mesmo sem ter tido escolha) e para reforçar que não podemos ter o controle sobre a vida, pois ela se encarrega de mostrar os seus caminhos;

À equipe do Bosque e Zoológico Municipal Dr. Fábio de Sá Barreto de Ribeirão Preto, nas pessoas do Anderson, Alexandre Felcar, Alexandre Gouvêa e Rafaella que apoiaram e tornaram possível a finalização desse processo;

Aos muitos que colaboraram durante essa minha trajetória, direta ou indiretamente, ao longo desses quatro anos, no nível profissional e pessoal, por meio de uma simples mensagem, na distância, ou no convívio diário;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; que conferiu apoio para que o presente trabalho fosse realizado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2020/01632-4;

Ao Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde/Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças (GAPPPS/FESIMA) por meio do Ofício CAF nº. 060/2019 por concederem apoio financeiro, tornando possível o desenvolvimento deste projeto em todas as suas atividades...

O meu sincero obrigado!!!

*“...as vezes encontramos nosso
destino pelo caminho que
tomamos para evitá-lo... sua mente
é como essa água meu amigo,
quando fica agitada,
não consegue ver claramente,
mas se permitir que se acalme,
a resposta fica clara.”*

Mestre Oogway (Kung Fu Panda)

RESUMO

SICONELLI, M. J. L. **Avaliação do vírus da febre do Nilo Ocidental no Estado de São Paulo: aves e equídeos como população sentinela.** 2023. 142f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O vírus da febre do Nilo Ocidental (WNV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus* (família: *Flaviviridae*) e foi isolado pela primeira vez na África em 1937. Embora esteja amplamente distribuído pela Europa, Oriente Médio e desde 1999, nos EUA, onde sazonalmente causa surtos epidêmicos, é considerado emergente na América do Sul. O WNV é responsável por causar uma doença semelhante à dengue em seres humanos, mas em cerca de 1% dos casos pode cursar com o comprometimento do sistema nervoso central (SNC). Nos animais, equídeos em geral, o comprometimento neurológico pode chegar a 10%. Esse vírus foi registrado oficialmente pela primeira vez no Brasil em 2014, um caso humano no Estado do Piauí e a primeira detecção animal foi em equídeos no Espírito Santo em 2018, por meio de técnicas moleculares e de isolamento viral. Depois disso, estados como Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Ceará e Piauí também confirmaram a detecção do WNV em equídeos. Embora as aves desempenhem papel central no ciclo de transmissão, até o momento nenhum isolamento foi relatado, e dessa forma o ciclo enzoótico permanece desconhecido. Dada à sua recente detecção na região sudeste e a ausência de uma vigilância bem estabelecida, este estudo buscou fomentar e propor um modelo de vigilância para o WNV em aves e equídeos no Estado de São Paulo (ESP). Foram estudados aves e equídeos que morreram com alguma síndrome neurológica ou de causa indeterminada. Todas as amostras de equídeos estudadas foram negativas para a raiva animal. Amostras de SNC e coração, este apenas para aves, foram coletadas desses animais. O material coletado foi conseguido devido à colaboração entre institutos de pesquisa e de diagnóstico da raiva animal, universidades, empreendimentos de fauna e unidades de vigilância de zoonoses do ESP, nomeada de Rede ZooARBO SP. Nesse estudo foi realizada a RT-qPCR para o WNV, encefalite de Saint Louis, e vírus dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*, além do diagnóstico histopatológico, com avaliação pela Hematoxilina e Eosina e imuno-histoquímica para o WNV. Entre os anos de 2017 e 2022, foram avaliados 1140 animais, sendo 364 equídeos e 776 animais selvagens, e destes, 679 aves, sendo os Passeriformes a ordem mais amostrada. Todos os animais testados foram negativos para os testes realizados. Apesar disso, 11 pombos da região nordeste do ESP foram testados pela técnica sorológica PRNT₈₀, sendo encontrado títulos de anticorpos neutralizantes contra o WNV em seis animais, evidenciando pela primeira vez, a possível circulação desse vírus no estado. Os estudos devem ser mantidos para que o ciclo de transmissão no Brasil seja elucidado e a vigilância direcionada corretamente. O estabelecimento da rede foi essencial para a realização desse inquérito viral e mostrou que é possível ampliar a vigilância das arboviroses com os fluxogramas e estruturas já existentes no sistema único de saúde do ESP, além da importância de unir esforços com os setores da agricultura e do meio ambiente. Somente com esse alinhamento será possível estabelecer um sistema de vigilância baseado em sentinelas, eficaz para que as ações de prevenção e controle necessárias sejam conduzidas oportunamente diante da presença de um caso confirmado, evitando-se assim uma epidemia.

Palavras-chave: WNV, encefalomielite viral, *Flavivirus*, vigilância sentinela, animais.

ABSTRACT

SICONELLI, M. J. L. **West Nile fever virus investigation in the State of São Paulo: birds and equids as a sentinel population.** Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

West Nile fever virus (WNV) is an arbovirus of the Flavivirus genus (family: *Flaviviridae*) and was isolated first in Africa in 1937. Although it is widely distributed throughout Europe, the Middle East and in the USA, where seasonally causes epidemic outbreaks since 1999. WNV is considered emerging in South America and is responsible for causing a disease like dengue in humans, but it can cause involvement of the central nervous system (CNS) at around 1% of cases. In animals, equids in general, neurological impairment can reach 10%. This virus was officially registered for the first time in Brazil in 2014, a human case in the State of Piauí and the first animal detection was in horses from Espírito Santo in 2018, using molecular and viral isolation techniques. After that, states such as Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Ceará and Piauí also confirmed the detection of WNV in horses. Although birds play a central role in the transmission cycle, to date no isolation has been reported, and thus the enzootic cycle remains unknown. Given its recent detection in the southeast region and the lack of well-established surveillance, this study aimed to promote and propose a surveillance model for WNV in birds and horses in the State of São Paulo (ESP). Birds and horses that died with a neurological syndrome or an undetermined cause were studied. All equine samples studied were negative for animal rabies. CNS and heart (only for birds) samples were collected from these animals. The material collected was obtained thanks to the collaboration between animal rabies research and diagnosis institutes, universities, fauna enterprises and zoonosis surveillance units at ESP, called the ZooARBO SP Network. In this study, RT-qPCR was performed for WNV, Saint Louis encephalitis, and viruses of the Flavivirus and Alphavirus genera, in addition to histopathological diagnosis, with evaluation by Hematoxylin and Eosin and immunohistochemistry for WNV. Between 2017 and 2022, 1140 animals were evaluated, 364 equids and 776 wild animals, and of these, 679 birds, with Passeriformes being the most sampled order. All animals tested were negative for the tests performed. Despite this, 11 pigeons from the northeast region of ESP were tested using the PRNT80 serological technique, with neutralizing antibody titers against WNV being found in six animals, demonstrating for the first time the possible circulation of this virus in the state. Studies must be maintained so that the transmission cycle in Brazil is elucidated and surveillance is correctly directed. The establishment of the network was essential for carrying out this viral survey and showed that it is possible to expand the surveillance of arboviruses with the flowcharts and structures already existing in the ESP single health system, in addition to the importance of joining efforts with the agriculture and environment sectors. Only with this alignment will it be possible to establish a surveillance system based on sentinels, effective so that the necessary prevention and control actions are carried out on time in the presence of a confirmed case, thus avoiding an epidemic.

Keywords: WNV, viral encephalomyelitis, Flavivirus, sentinel surveillance, animals.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** CICLO DE TRANSMISSÃO CLÁSSICO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL. SETAS EM VERMELHO CICLO ENZOÓTICO OU DE AMPLIFICAÇÃO ENTRE AVES E MOSQUITOS. FONTE: [HTTPS://EU.BIOGENTS.COM/WEST-NILE/?LANG=PT-BR](https://eu.biogents.com/west-nile/?lang=pt-br). 26
- FIGURA 2.** REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DAS ESPÉCIES DAS PRINCIPAIS ORDENS DE AVES CONSIDERADAS AMPLIFICADORAS DO WNV. FALCONIFORMES: 1 (*FALCO PEREGRINUS*) E 2 (*CARACARA PLANCUS*); STRIGIFORMES: 3 (*ASIO CLAMATOR*) E 4 (*ATHENE CUNICULARIA*); ANSERIFORMES: 5 (*DENDROCYGNA AUTUMNALIS*) E 6 (*DENDROCYGNA VIDUATA*); CHARADRIIFORMES: 7 (*VANELLUS CHILENSIS*); PASSERIFORMES: 8 (*CYANOCORAX CHRYSOPS*), 9 (*TURDUS RUFIVENTRIS*), 10 (*PAROARIA DOMINICANA*) E 11 (*PITANGUS SULPHURATUS*). FONTE: GOOGLE SEARCH, 2023..... 27
- FIGURA 3.** ROTAS MIGRATÓRIAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE AVES ENTRE A AMÉRICA DO NORTE E DO SUL. FONTE: NATIONAL GEOGRAPHIC MAGAZINE, 1979. 29
- FIGURA 4.** GRÁFICO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA E RESPOSTA IMUNOLÓGICA FRENTE A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DO WNV EM EQUÍDEOS (ANGENVOORT *ET AL.*, 2013). 31
- FIGURA 5.** LOCALIZAÇÃO DOS COLABORADORES DA REDE ZOOARBO SP PARA A VIGILÂNCIA E DIAGNÓSTICO DAS ARBOVIROSES ZOONÓTICAS CAUSADORES DE ENCEFALITE. TODOS OS COLABORADORES QUE ENVIARAM AS AMOSTRAS DIRETAMENTE PARA O CP/IAL-SP FORAM REPRESENTADOS NO MAPA PELA LOGO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. FONTE: GOOGLE EARTH, 2023..... 44
- FIGURA 6.** MODELO DE FLUXOGRAMA DE COLETA E ENCAMINHAMENTO DAS AMOSTRAS ATÉ O LVM/FMRP/USP; A) FLUXO SEGUIDO A PARTIR DA OCORRÊNCIA DOS CASOS; B) FLUXO SEGUINDO NA UNIDADE PARCEIRA; C) FLUXO DE ATIVIDADES REALIZADAS A PARTIR DO RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS NO LVM/FMRP/USP; *RECOMENDA-SE QUE APÓS 48 A 72H A FORMALINA SEJA SUBSTITUÍDA POR ETANOL 70%. SNC: SISTEMA NERVOSO CENTRAL; IHQ: IMUNO-HISTOQUÍMICA; UVZ: UNIDADE DE VIGILÂNCIA DE ZONÓSES..... 45
- FIGURA 7.** CURVA PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA RT-QPCR DUPLEX - WNV E SLEV, FEITAS EM DUPLICATAS. SETAS VERMELHAS INDICAM AS CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA WNV E AS CURVAS SEM SETAS PARA SLEV. 54
- FIGURA 8.** À ESQUERDA PLACA COM AMOSTRA DE SORO DE CAMUNDONGO INFECTADO COM WNV, CONSIDERADO POSITIVO, COM REDUÇÃO DE PLACAS ATÉ A DILUIÇÃO 1:80; A DIREITA AMOSTRA DE UM EQUINO, CONSIDERADO NEGATIVO. PRNT COM DILUIÇÕES DE 1:10 ATÉ 1:5120. INCUBAÇÃO DE 48H E COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA 1%. ÁREA ROXA: TAPETE CELULAR INTEGRO, SEM EFEITO CITOPÁTICO; PONTOS BRANCOS/TRANSPARENTES: EFEITO CITOPÁTICO (PLAQUES), CAUSADO PELA INFEÇÃO VIRAL. CV: CONTROLE DE VÍRUS; CN: CONTROLE NEGATIVO (AMOSTRA ISENTA DE ANTICORPOS ANTI-WNV, DILUÍDA 1:10)..... 64
- FIGURA 9.** POMBOS-CORREIOS (*COLUMBA LIVIA*) ENCAMINHADOS DO MUNICÍPIO DE FRANCA, APRESENTANDO CEGUEIRA APARENTE E SINAIS NEUROLÓGICOS INESPECÍFICOS..... 80
- FIGURA 10.** PRNT DE QUATRO POMBOS. A) 43921 – PRNT₅₀: 640 E PRNT₈₀: 40; B) 43924 – PRNT₅₀: 160 E PRNT₈₀: 10; C) 43925 – PRNT₅₀: 10 E PRNT₈₀:

NR; E D) 44031 – PRNT₅₀: NR E PRNT₈₀: NR. TESTE REALIZADO EM PLACAS DE 12 POÇOS, COM DILUIÇÃO FATOR 2, DE 1:10 ATÉ 1:5120 (EM UNICATA), CORADO COM CRISTAL VIOLETA APÓS 48 – 72 HORAS DE INCUBAÇÃO. ÁREA ROXA: TAPETE CELULAR INTEGRO, SEM EFEITO CITOPÁTICO; PONTOS BRANCOS/TRANSPARENTES: EFEITO CITOPÁTICO (PLAQUES), CAUSADO PELA INFEÇÃO VIRAL. CN: CONTROLE NEGATIVO (MEIO DE CULTIVO E VÍRUS); CV: CONTROLE DE VÍRUS..... 81

FIGURA 11. VISTA AÉREA DO TERRITÓRIO BRASILEIRO (ESTADOS E DISTRITO FEDERAL), COM OS PONTOS DE ORIGEM DE CADA ANIMAL AMOSTRADO PELOS INSTITUTOS DA REDE ZOOARBO SP. AMARELO: ANIMAIS SELVAGENS COLETADOS PELO SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS, FCAV/UNESP; ROSA: ZOOLOGICO MUNICIPAL DE RIBEIRÃO PRETO, ONDE FORAM COLETADOS 113 AVES DO MUNICÍPIO; VERMELHO: EQUÍDEOS RECEBIDOS NO INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO; VERDE: EQUÍDEOS RECEBIDOS NO INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO; AZUL CLARO: EQUÍDEOS RECEBIDOS NO SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO DE ZOONOSES DA FMVZ DE BOTUCATU/UNESP; ROXO: AVES SILVESTRES MARINHAS RESGATADOS NO INSTITUTO DE PESQUISAS CANANÉIA; BRANCO: UNIDADES COLABORADORES DO CENTRO DE PATOLOGIA DO IAL/SP RESPONSÁVEIS PELO ENCAMINHAMENTO DE AVES SELVAGENS. FONTE: GOOGLE EARTH PRO, 2023..... 83

FIGURA 12. VISTA AÉREA DO ESTADO DE SÃO PAULO, EM MAIOR AUMENTO, COM A LOCALIZAÇÃO DE CADA ANIMAL AMOSTRADO PELOS RESPECTIVOS INSTITUTOS DA REDE ZOOARBO SP. AMARELO: ANIMAIS SELVAGENS COLETADOS PELO SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS, FCAV/UNESP; ROSA: ZOOLOGICO MUNICIPAL DE RIBEIRÃO PRETO, ONDE FORAM COLETADOS 113 AVES DO MUNICÍPIO; VERMELHO: EQUÍDEOS RECEBIDOS NO INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO; VERDE: EQUÍDEOS RECEBIDOS NO INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO; AZUL CLARO: EQUÍDEOS RECEBIDOS NO SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO DE ZOONOSES DA FMVZ DE BOTUCATU/UNESP; ROXO: AVES SILVESTRES MARINHAS RESGATADOS NO INSTITUTO DE PESQUISAS CANANÉIA; BRANCO: UNIDADES COLABORADORES DO CENTRO DE PATOLOGIA DO IAL/SP RESPONSÁVEIS PELO ENCAMINHAMENTO DE AVES SELVAGENS. FONTE: GOOGLE EARTH PRO, 2023..... 84

FIGURA 13. VISTA AÉREA DOS ESTADOS QUE TIVERAM A DETECÇÃO DO WNV PELA TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR NO ANO DE 2019, EM CAVALOS COM DOENÇAS NEUROLÓGICAS. A) ESTADO DO CEARÁ COM MARCAÇÃO (SETA AMARELA) DO MUNICÍPIO DE BOA VIAGEM, LOCAL DE ORIGEM DO ANIMAL POSITIVO PARA WNV PELA RT-qPCR; B) ESTADO DO ESPÍRITO SANTO COM MARCAÇÃO (SETA AMARELA) DO MUNICÍPIO DE JOÃO NEIVA, LOCAL DE ORIGEM DO ANIMAL POSITIVO PARA WNV PELA RT-qPCR E ISOLAMENTO VIRAL; SETA VERMELHA: MUNICÍPIO DE SÃO MATEUS ONDE FOI FEITO O PRIMEIRO ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO COMPLETO EM 2018; PONTOS VERMELHOS: EQUÍDEOS ENCAMINHADOS AO IP/SP NO ANO DE 2017 E NEGATIVOS PARA OUTRAS WNV, SLEV, FLAVIVÍRUS E ALPHAVÍRUS. FONTE: GOOGLE EARTH PRO, 2023. 85

FIGURA 14. CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA RT-qPCR PARA WNV EVIDENCIANDO A POSITIVIDADE DOS RNAs ENCAMINHADOS PELO LFDA/MG. Cts: 804_01_ES, Ct: 25.98; 804_02_ES, Ct: 27.91; E 827_01_CE, Ct: 31.92. REAÇÃO REALIZADA NO APARELHO MASTERCYCLER® EP REALPLEX (EPPENDORF®)... 86

- FIGURA 15.** MICROSCÓPIA DO CULTIVO CELULAR EM CÉLULAS DE AFRICAN GREEN MONKEY KIDNEY (VERO), 6 DIAS DEPOIS DA INOCULAÇÃO, DA AMOSTRA 804_02_ES. IMAGEM À ESQUERDA: MOCK = GARRAFA CONTROLE NEGATIVO (SEM INÓCULO) EVIDENCIANDO O TAPETE CELULAR INTEGRO; IMAGEM CENTRAL, AUMENTO DE 10X: GARRAFA COM INFECÇÃO, TAPETE CELULAR DANIFICADO E PERDA DA INTEGRIDADE (ECP); IMAGEM À DIREITA, AUMENTO DE 40X: GARRAFA COM INFECÇÃO, TAPETE CELULAR DANIFICADO COM PERDA DA INTEGRIDADE/CONTINUIDADE (ECP), CÉLULAS REFRINGENTES E COM FORMATO ARREDONDADO. É POSSÍVEL VER CÉLULAS MORTAS EM SUSPENSÃO. 87
- FIGURA 16.** CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA RT-QPCR REALIZADA A PARTIR DO RNA EXTRAÍDO DO SOBRENADANTE DA 1ª PASSAGEM DO ISOLAMENTO DO WNV REALIZADO EM CÉLULAS VERO E C6/36. SOBRENADANTE DAS AMOSTRAS E OS RESPECTIVOS CTS: 804_02_ES #1P VERO (CT: 10.89); 804_02_ES #1P C6/36 (CT: 19.73); E 827_01_CE #1P C6/36 (CT: 0.0). REAÇÃO REALIZADA NO APARELHO MASTERCYCLER® EP REALPLEX (EPPENDORF®). 88
- FIGURA 17.** TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DA AMOSTRA 804_02_ES EM CÉLULAS VERO (A) E C6/36 (B), 6 DIAS DEPOIS DA INOCULAÇÃO (1ª PASSAGEM). COLORAÇÃO: AZUL = NÚCLEO CELULAR (DAPI); VERDE = PROTEÍNAS VIRAIS DO WNV. A E B: MOCK = CONTROLE NEGATIVO (SEM INOCULAÇÃO) APENAS CÉLULAS. A1 E B1: INFECÇÃO POSITIVA EVIDENCIANDO PROTEÍNAS VIRAIS EM VERDE AO REDOR DO NÚCLEO, EM AZUL. AUMENTO DE 40X. 89
- FIGURA 18.** RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA (MAXIMUM-LIKELIHOOD - ML) DO WNV DE 1953–2019. (A) 117 SEQUÊNCIAS COMPLETAS SELECIONADAS DO CONJUNTO DE DADOS GLOBAL FORAM INCLUÍDAS NESTA ANÁLISE, APRESENTANDO 0,1 SUBSTITUIÇÕES POR SITE. O MODELO DE SUBSTITUIÇÃO GTR+F+I+G4 E SUPORTE ANÁLISES DE 10.000 REPETIÇÕES FORAM UTILIZADAS PARA OBTER A ÁRVORE FILOGENÉTICA; (B) CAIXA TRACEJADA DESTACANDO AS CEPAS DA AMÉRICA DO SUL (AS), INCLUINDO O NOVO ISOLADO (MT905060), QUE AGRUPA COM LINHAGEM 1A CEPA NY99; APENAS VALORES DE BOOTSTRAP IGUAIS OU MAIORES QUE 70% FORAM MANTIDOS; (C) ROOT-TO-TIP ANÁLISES FORAM OBTIDAS COM TEMPÊST, USANDO RECONSTRUÇÃO ML OBTIDA A PARTIR DE 94 GENOMAS DAS LINHAGENS 1A E 1B; CORRELAÇÃO GRÁFICA ENTRE TEMPO (ANOS) E GENÉTICA DIVERGÊNCIA (SUBSTITUIÇÕES POR SITE) DA RAIZ DA ÁRVORE (TEMPO ATÉ O ANCESTRAL RECENTE MAIS COMUM, tMRCA) ÀS PONTAS (GENOMAS AMOSTRADOS) ESTÃO SENDO MOSTRADOS; TAXA DE INCLINAÇÃO EVOLUTIVA: $4,146 \times 10^{-4}$ SUBSTITUIÇÕES/LOCAL/ANO; CONTORNO DA SETA PRETA = NOVO ISOLADO. TODAS AS CEPAS COLORIDAS PERTENCEM À AS: BRASIL (VERMELHO), ARGENTINA (AZUL) E COLÔMBIA (VERDE). LINHAGENS DO VELHO MUNDO INCLUEM: 3 (RABENSBURG), 4A, 4B (9), 7 (KOUTANGO) E 8. 91

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.	ESTRATIFICAÇÃO EM PORCENTAGEM DO QUANTITATIVO DE AMOSTRAS AVALIADAS A PARTIR DE CADA INSTITUIÇÃO DE COLABORAÇÃO DA REDE ZOOARBO SP.	67
GRÁFICO 2.	ESTRATIFICAÇÃO DAS ORDENS DE AVES AMOSTRADAS ENTRE OS ANOS DE 2019 E 2022 CONFORME A INSTITUIÇÃO COLABORADORA DA REDE ZOOARBO SP.	77

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	ANIMAIS ESTUDADOS ENTRE OS ANOS DE 2017 E 2022, TRIADAS E AVALIADAS CONFORME CADA INSTITUIÇÃO DA REDE ZOOARBO SP.	67
QUADRO 2.	NÚMERO DE MAMÍFEROS E RÉPTEIS AMOSTRADOS PELO SEPAS/FCAV/UNESP ENTRE OS ANOS DE 2019 E 2022, DISTRIBUÍDAS CONFORME A ORDEM.	71
QUADRO 3.	NÚMERO DE AVES AMOSTRADAS ENTRE OS ANOS DE 2019 E 2022, DISTRIBUÍDAS CONFORME A ORDEM E A RESPECTIVA UNIDADE DE COLABORAÇÃO DA REDE ZOOARBO SP.....	76
QUADRO 4.	EQUÍDEOS SUBMETIDOS À AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA COLORAÇÃO H&E.	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE AVES AMOSTRADAS PELO SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS, DA FCAV/UNESP, NOS ANOS DE 2019 A 2022.....	68
TABELA 2.	DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE MAMÍFEROS AMOSTRADOS PELO SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS, DA FCAV/UNESP, DOS ANOS DE 2019 A 2022.....	69
TABELA 3.	DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE RÉPTEIS AMOSTRADOS PELO SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS, DA FCAV/UNESP, DOS ANOS DE 2019 A 2022.....	71
TABELA 4.	DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE AVES AMOSTRADAS PELO SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS, DO BZM/PMRP/RP, ENTRE OS ANOS DE 2021 E 2022.	71
TABELA 5.	DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE AVES SILVESTRES COSTEIRAS AMOSTRADAS PELO IPEC ENTRE OS ANOS DE 2020 E 2021.....	73
TABELA 6.	DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE AVES ENCAMINHADAS AO CP/IAL-SP ENTRE OS ANOS DE 2019 E 2022.....	73
TABELA 7.	INFORMAÇÕES E RESULTADOS DOS ANIMAIS, POMBOS, QUE FORAM SUBMETIDOS AOS TESTES DE RT-QPCR E PRNT.....	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVOS	40
4.1. GERAL.....	40
4.2. ESPECÍFICOS	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1. LOCAIS DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS E COLABORAÇÃO PARA A INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS ZONÓTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, COM A FORMAÇÃO DA REDE ZooARBO SP	43
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	45
5.2.1. Histórico dos animais.....	46
5.2.2. Tipo de material coletado	46
5.2.3. Coleta e armazenamento das amostras.....	47
5.2.3.1. Soro.....	47
5.2.3.2. Tecidos/órgãos.....	47
5.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR (RT-QPCR E NESTED-PCR).....	48
5.3.1. Extração do RNA total a partir de amostras de tecido.....	49
5.3.1.1. TRI Reagent® (Sigma-Aldrich®).....	49
5.3.1.2. RNeasy Mini Kit (Qiagen®).....	50
5.3.1.3. Preparo do material parafinado e extração de RNA Viral Bio Gene Kit (Bioclin-QUIBASA).....	51
5.3.2. RT-PCR em tempo real	51
5.3.2.1. Vírus da febre do Nilo Ocidental (WNV)	52
5.3.2.2. Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).....	53
5.3.2.3. Duplex para WNV e SLEV	53
5.3.2.4. Detecção de vírus do gênero Flavivírus.....	54
5.3.2.5. Detecção de vírus do gênero Alphavírus	55
5.3.2.6. Avaliação da detecção do genoma viral	55
5.3.3. PCR convencional e nested-PCR para o WNV	55
5.4. ISOLAMENTO VIRAL	56
5.4.1. Cultivo celular VERO e C6/36	56
5.4.2. Imunofluorescência indireta	57
5.4.3. Preparo da lâmina	57
5.4.4. Imunofluorescência indireta para WNV	58
5.5. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	59
5.5.1. Sequenciamento Sanger para WNV.....	59
5.5.2. NGS (New Generation Sequence)	59
5.5.3. Análise do sequenciamento e bioinformática	59
5.5.3.1. Montagem do consenso - Sanger.....	59
5.5.3.2. Montagem do consenso - NGS.....	60
5.5.3.3. Análise bioinformática	60

5.6. HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	60
5.6.1. Processamento histológico e histopatologia.....	60
5.6.2. Imuno-histoquímica	61
5.6.2.1. Anticorpos primários específicos anti-WNV	62
5.6.2.2. Controles, positivos e negativos, utilizados durante os ensaios	62
5.7. PADRONIZAÇÃO DO PRNT (PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZING TEST) PARA WNV.....	63
5.8. MAPEAMENTO DAS ÁREAS DE ORIGEM DOS ANIMAIS AMOSTRADOS	65
6. RESULTADOS	67
6.1. Distribuição e frequência dos animais amostrados	67
6.1.1. Ordens de aves estudadas.....	76
6.2. Identificação do RNA de outros arbovírus por RT-qPCR	78
6.3. Histopatologia e Imuno-histoquímica.....	78
6.4. PRNT (PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZING TEST) PARA O WNV EM POMBOS DA REGIÃO NORDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO	79
6.5. Georreferenciamento.....	82
6.6. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO WNV CIRCULANTE NO BRASIL.....	84
6.6.1. Isolamento e caracterização do vírus da Febre do Nilo Ocidental no Estado do Espírito Santo e Ceará	84
6.6.2. Confirmação do isolamento viral por RT-qPCR.....	87
6.6.3. Imunofluorescência indireta.....	88
6.6.4. Sanger	88
6.6.5. Sequenciamento e análise bioinformática	89
7. DISCUSSÃO.....	93
8. CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS	104
ANEXOS.....	129

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Febre do Nilo Ocidental (FNO) é uma doença zoonótica, não contagiosa, de transmissão vetorial, causada pelo vírus da Febre do Nilo Ocidental [em inglês, *West Nile virus* (WNV)]; e, portanto, neste projeto será abreviado como determina o ICTV]. O ciclo de transmissão e amplificação do WNV inclui mosquitos ornitofílicos/zoofílicos e aves. Mamíferos são considerados hospedeiros terminais, não servindo como fonte de infecção e conseqüentemente não participando na manutenção do ciclo, pois, desenvolvem viremia insuficiente para infectar o vetor.

O WNV foi isolado em 1937 no continente africano e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma arbovirose (vírus transmitidos por artrópodes) comum na África, Europa, Oriente Médio, América do Norte e Ásia Ocidental, porém assume caráter emergente em outras regiões do mundo como na América do Sul. O WNV alcançou as Américas em 1999, nos Estados Unidos, contudo no Brasil, embora houvesse evidências sorológicas em animais, o primeiro caso humano foi documentado apenas em 2014, no Estado do Piauí. O primeiro isolamento viral ocorreu apenas em 2018, a partir de equídeos que apresentavam síndrome neurológica, no Estado do Espírito Santo.

No Brasil a vigilância epidemiológica para o WNV era praticamente inexistente, até 2019, e quando feita, insipiente e, até hoje, a vigilância virológica para o WNV necessita de um melhor aprimoramento. Considerando a necessidade de melhorar a vigilância epidemiológica para este vírus, em 2019, deu-se início o presente trabalho de pesquisa visando o estabelecimento de uma rede de vigilância, com a colaboração de várias instituições de pesquisa e saúde pública do Estado de São Paulo. Essa rede criada foi denominada de Rede ZooARBO SP e inicialmente era constituída pelo Laboratório de Virologia Molecular, da FMRP/USP, e o Centro de Patologia, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, responsáveis pela padronização e ampliação do diagnóstico no Estado de São Paulo. Após a criação da Rede ZooARBO SP, outros institutos, universidades, empreendimentos de fauna (Zoológicos e CETRAS) e unidades de vigilância de zoonoses se uniram à rede e encaminharam amostras de animais para a vigilância dessa arbovirose.

A apresentação clínica das infecções pelo WNV se assemelha à dos vírus dengue, com exantema, febre, anorexia, fraqueza muscular, dor muscular, dor nos

olhos e dor de cabeça podendo, em alguns casos, evoluir para uma forma mais grave, com o acometimento do sistema nervoso central (SNC), desenvolvendo ataxia, tremores, meningite, encefalite ou encefalomielite.

O Brasil possui uma rica diversidade de arbovírus circulantes pertencentes ao gênero Flavivírus, o que torna o diagnóstico um desafio, pois, exige que os laboratórios tenham nível técnico elevado, capaz de padronizar e utilizar diferentes abordagens diagnósticas a fim de reduzir as reações cruzadas. Embora os kits comerciais sejam de fácil utilização, não estão amplamente distribuídos no Brasil, e quando disponível seu custo é elevado, o que inviabiliza seu uso. Junto a isso, os profissionais de saúde e a população não estão sensibilizados para a suspeita dessa doença. Assim, a implantação e o aprimoramento de um sistema de vigilância para o WNV e outras arboviroses zoonóticas causadores de encefalites a partir de animais sentinelas, como aves e equídeos, é necessária.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

O vírus causador da Febre do Nilo Ocidental (WNV) foi isolado pela primeira vez em 1937, em Uganda – distrito de “West Nile” (região a oeste do rio Nilo) – África, de uma paciente que apresentava febre (HUGHES *et al.*; SMITHBURN *et al.*, 1940; SEJVAR, 2003). Embora esse seja o primeiro registro oficial, encontram-se relatos desde a história antiga – a.C., de óbitos oriundos pela infecção por esse vírus, como o de Alexandre “O Grande” (MARR; CALISHER, 2003; OMETTO, 2013).

O WNV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, cujo protótipo é o vírus da Febre Amarela (MONATH, 2015). Antigenicamente pertence ao sorogrupo do vírus da encefalite Japonesa (JEV), que incluem os vírus das encefalites Japonesa, de Saint Louis (SLEV), Murray Valley (MVEV), Kunjin (KUNV) e Usutu (USUV) e ao clado dos vírus hemorrágicos que incluem os vírus dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Febre Amarela (YFV) (CALISHER *et al.*, 1989; KUNO *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2011).

Assim como os demais membros dessa família, possui formato icosaédrico e o genoma formado por uma simples fita de RNA, de sentido positivo e aproximadamente 11.000 nucleotídeos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2001; LINDENBACH *et al.*, 2013). O RNA viral é traduzido em uma única poliproteína, que após processamento dá origem a três proteínas estruturais (envelope – E, pre-membrana/membrana – prM/M, e nucleocapsídeo – C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (RICE *et al.*, 1985; LINDENBACH *et al.*, 2013; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019).

Estudos filogenéticos analisando a glicoproteína E de diferentes cepas isoladas de diversas regiões do mundo demonstraram grandes diferenças entre os vírus, agrupando as linhagens virais em dois grupos (LANCIOTTI *et al.*, 2002) com distintos subclados ou “clusters” (LANCIOTTI *et al.*, 2000; CHARREL *et al.*, 2003). A linhagem 1 está distribuída do oeste da África até o Oriente Médio, Europa Oriental, Américas e Austrália (OMETTO, 2013). Esta linhagem é subdividida em três cladogramas (RIDPATH *et al.*, 2017), sendo 1a cepas israelenses e americanas, isoladas entre 1997 e 2000; 1b cepas europeias e russas, isoladas entre 1996 e 2000 (CHARREL *et al.*, 2003); e 1c cepas de origem italiana, isoladas entre 1998 e 2008 (MONACO *et al.*, 2010). Em 2018 no Estado do Espírito Santo, Brasil, foi feito o primeiro isolamento do WNV, cepa

pertencente à linhagem 1 (MARTINS *et al.*, 2019). Anterior a isso, em outros países, surtos associados seres humanos e aves têm sido causadas por um subconjunto de cepas da linhagem 1 (OMETTO, 2013). A linhagem 2 concentra, principalmente, cepas isoladas na África subsaariana e Madagascar (RIDPATH *et al.*, 2017) e parece ser menos virulenta, já que tem sido detectada a partir de casos assintomáticos ou leves, e ao acaso, durante a pesquisa de outros agentes (MONINI *et al.*, 2010; OMETTO, 2013, RIDPATH *et al.*, 2017).

Embora a maior parte dos casos estejam relacionados às linhagens 1, principalmente, e 2 (RIDPATH *et al.*, 2017; FALL *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2019), novos estudos sugerem 9 linhagens distintas do WNV (3, 4, 6, e 9 – Europa; 5 – Índia; 7 e 8 – África), de acordo com a sua localização geográfica e tipo de hospedeiro (FALL *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2019).

O ciclo de transmissão natural está relacionado à mosquitos ornitofílicos ou zoofílicos e aves (Figura 1).

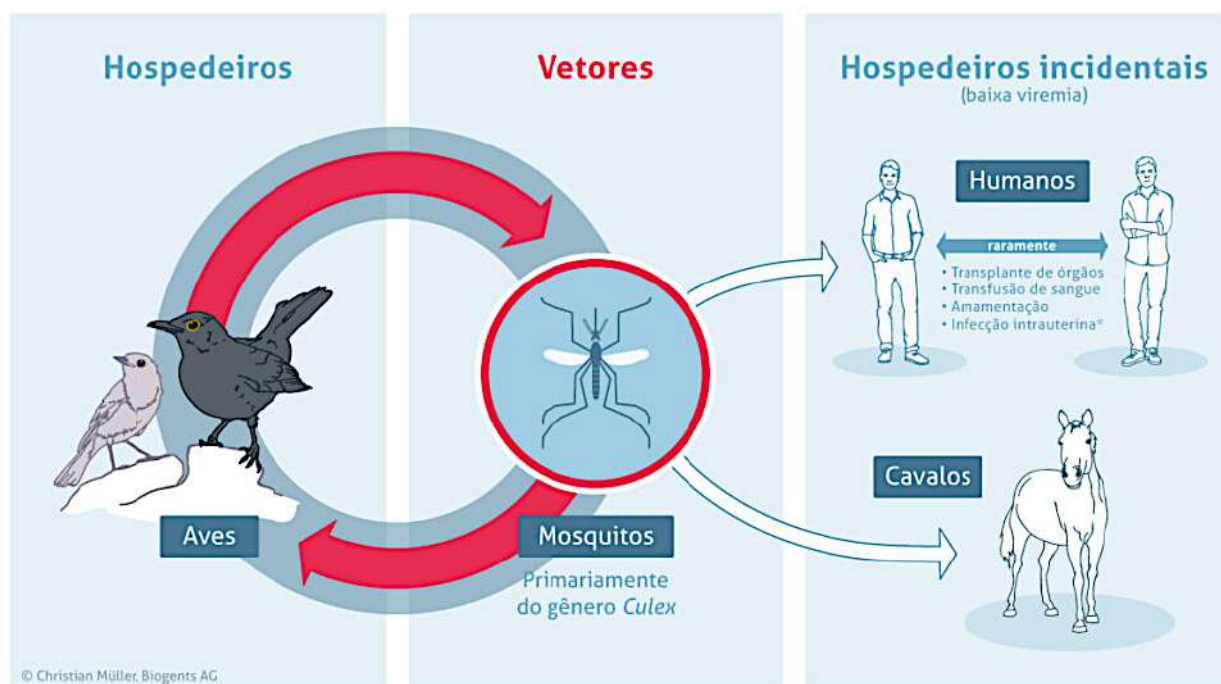


Figura 1. Ciclo de transmissão clássico do vírus da febre do Nilo Ocidental. Setas em vermelho ciclo enzoótico ou de amplificação entre aves e mosquitos. Fonte: <https://eu.biogents.com/west-nile/?lang=pt-br>

Os mosquitos do gênero *Culex*, em particular as espécies *Cx. pipens* e *Cx. restuans*, são considerados os principais vetores, embora mosquitos do gênero *Aedes* (*albopictus*) possuam grande potencial de transmissão (KULASEKERA *et al.*, 2001;

TURELL *et al.*, 2005). De acordo com o Ministério da Saúde (2011), a espécie predominante no Brasil é o *Cx. quinquefasciatus*, apresentando importância médica comprovada e potencial transmissor do WNV. Mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culiseta* e *Psorophora* já foram detectados com o WNV (CDC, 2017).

Diversas ordens de aves podem ser infectadas e atuar como hospedeiros de manutenção, amplificadores ou reservatórios, como por exemplo, os Falconiformes (falcões), os Charadriiformes (aves costeiras/limícolas), os Strigiformes (corujas), e os Anseriformes (patos e marrecos) (KOMAR *et al.*, 2003; HAYES *et al.*, 2005^a; TURELL *et al.*, 2005; BRASIL, 2016), mas a principal ordem envolvida no ciclo são os Passeriformes (pássaros) (Figura 2) (CAMPBELL *et al.*, 2002; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019; TAIEB *et al.*, 2020).



Figura 2. Representação ilustrativa das espécies das principais ordens de aves consideradas amplificadoras do WNV. Falconiformes: 1 (*Falco peregrinus*) e 2 (*Caracara plancus*); Strigiformes: 3 (*Asio clamator*) e 4 (*Athene cunicularia*); Anseriformes: 5 (*Dendrocygna autumnalis*) e 6 (*Dendrocygna viduata*); Charadriiformes: 7 (*Vanellus chilensis*); Passeriformes: 8 (*Cyanocorax*

chrysops), 9 (*Turdus rufiventris*), 10 (*Paroaria dominicana*) e 11 (*Pitangus sulphuratus*). Fonte: Google Search, 2023.

De acordo com Robles-Fernández *et al.* (2022) algumas famílias de Passeriformes como a *Turdidae*, a *Sittidae*, e a *Corvidae* são mais susceptíveis que outras, o que foi evidenciado durante a epidemia nos Estados Unidos (EUA) cujas taxas de mortalidade excederam os 40% (HAYES *et al.*, 2005a).

Equídeos, o próprio ser humano e outros mamíferos, de forma geral, são considerados hospedeiros acidentais ou hospedeiros terminais, já que não conseguem desenvolver viremia suficiente para infectar novos vetores e fazer a manutenção da transmissão do vírus (CAMPBELL *et al.*; BUNNING *et al.*, 2002; BRASIL, 2016).

As aves migratórias têm um papel importante na saúde pública frente à disseminação de patógenos, pois são capazes de atravessar fronteiras levando-os de um lado para outro (MALKINSON; BANET, 2002; REED *et al.*, 2003; KOMAR *et al.*, 2003; OWEN, *et al.*, 2006; JOURDAIN *et al.*, 2007; DUSEK *et al.*, 2009). Existem ao menos quatro principais rotas de aves migratórias que cruzam a cidade de Nova Iorque o que a fez um ponto estratégico para a provável disseminação do WNV para outras regiões dos EUA, outros países e continentes (RAPPOLE; DERRICKSON; HUBÁLEK, 2000). Dessa maneira, as rotas migratórias são grandes vias de dispersão (Figura 3) (OWEN, *et al.*, 2006; DUSEK *et al.*, 2009). Além das aves e mamíferos (terrestres e aquáticos), animais de sangue “frio” como anfíbios e répteis já foram encontrados infectados (KOSTIUKOV *et al.*, 1985; STEINMAN *et al.*, 2003; KLENK *et al.*, 2003).

Apesar de outras formas de transmissão já terem sido relatadas, como por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, vertical, perinatal e por aleitamento materno, elas não possuem importância epidemiológica para a manutenção do ciclo (WHO, 2017; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). Contudo, rotas alternativas a via vetorial, como as vias oral e fecal-oral podem contribuir para a manutenção e dispersão dos vírus no ambiente e a consequente infecção de novos indivíduos (DAWSON *et al.*, 2007; TREVEJO; EIDSON, 2008; MONTECINO-LATORRE; BARKER, 2018). Portanto, o contato direto entre algumas espécies deve ser considerado, assim como o contato com suas secreções.

O diagnóstico do WNV está relacionado à evolução da infecção, sendo definida

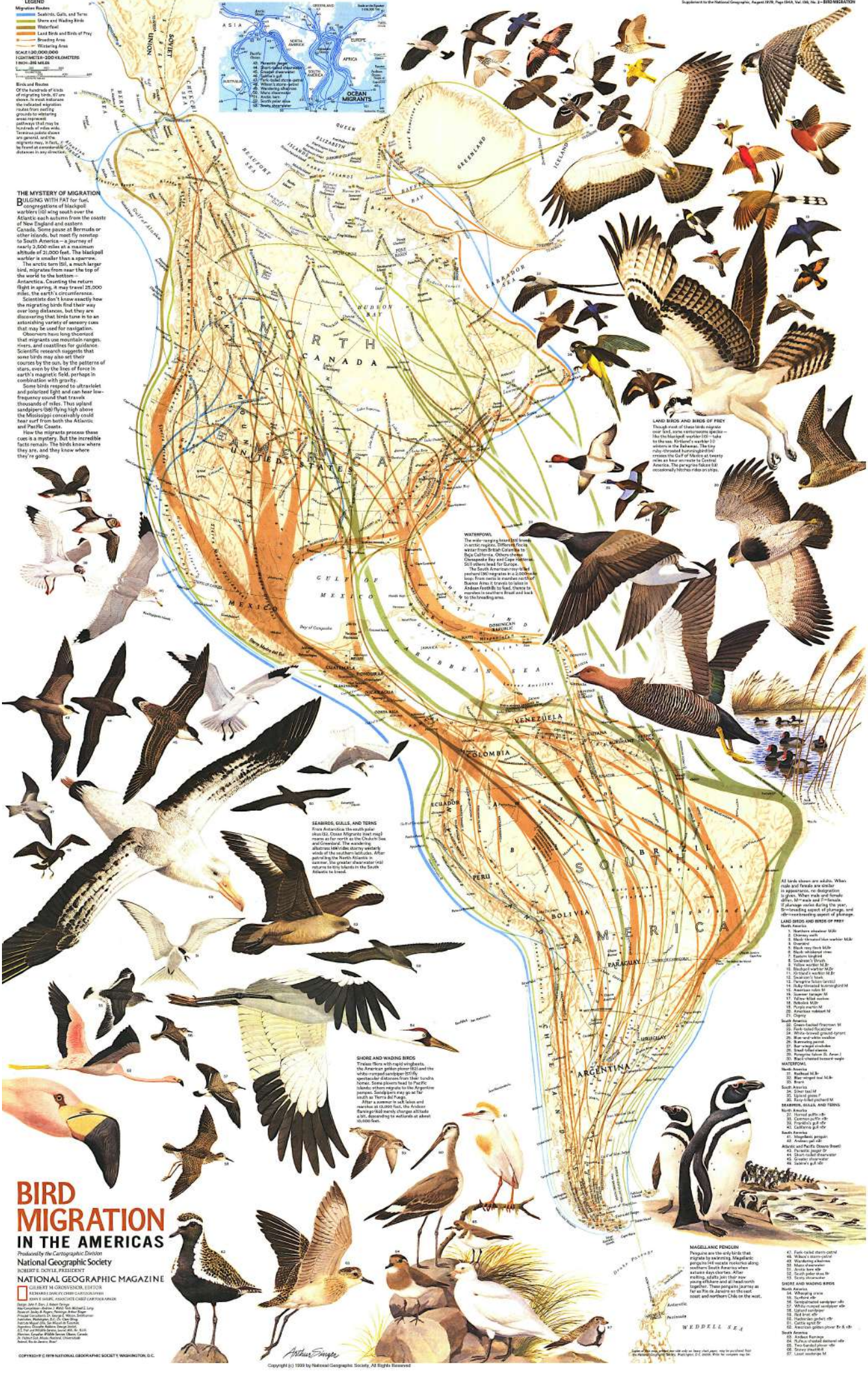
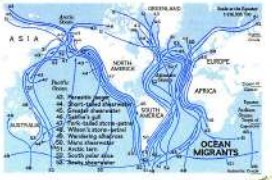
LEGEND

- Migratory Routes
- Seabirds, Gulls, and Terns
- Shore and Wading Birds
- Waterfowl
- Land Birds and Birds of Prey
- Swarming Area
- Wintering Area

SCALE: 1:100,000,000
1 CENTIMETER = 200 KILOMETERS
1 INCH = 250 MILES

THE MYSTERY OF MIGRATION
 BATTLEING WITH FAT for fuel, congregations of blackpoll warblers (1) wing south over the Atlantic, each autumn from the coast of New England and eastern Canada. Some pause on Bermuda or other islands, but most fly nonstop to South America—a journey of nearly 2,500 miles at a maximum altitude of 20,000 feet. The blackpoll warbler is smaller than a sparrow. The arctic tern (2), a much larger bird, migrates from near the top of the world to the bottom—Antarctica. Counting the return flight in spring, it may travel 25,000 miles, the earth's circumference. Scientists don't know exactly how the migrating birds find their way over long distances, but they are discovering that birds tune in to an astonishing variety of sensory cues that may be used for navigation.

Observers have long theorized that migrants use magnetic ranges, rivers, and coastlines for guidance. Scientific research suggests that some birds may also use their courses by the sun, by the patterns of stars, even by the lines of force in earth's magnetic field, perhaps in combination with gravity. Some birds respond to ultraviolet and polarized light and can hear low-frequency sound that travels thousands of miles. Thus upland sandpeeps (3) fly high above the Mississippi (conceivably could hear surf from both the Atlantic and Pacific Coasts). How the migrants process these cues is a mystery. But the incredible facts remain: The birds know where they are, and they know where they're going.



LAND BIRDS AND BIRDS OF PREY
 Though most of these birds migrate over land, some wondrous species—the blackpoll warbler (1) and the arctic tern (2)—take the sea. The blackpoll warbler (1) crosses the Atlantic, the long distance, in a single flight. The arctic tern (2) crosses the Gulf of Mexico at least twice a year, once in each direction. The peregrine falcon (3) migrates from the northern United States to the southern United States.

WATERFOWL
 The waterfowl migrate from the northern United States to the southern United States. The waterfowl migrate from the northern United States to the southern United States. The waterfowl migrate from the northern United States to the southern United States.

SEABIRDS, GULLS, AND TERNS
 From Antarctica to the north polar area (1), the seabirds migrate from the southern United States to the northern United States. The seabirds migrate from the southern United States to the northern United States.

SHORE AND WADING BIRDS
 These birds with long legs, the shore and wading birds (3) and the waterfowl (4) migrate from the southern United States to the northern United States. The shore and wading birds (3) and the waterfowl (4) migrate from the southern United States to the northern United States.

LAND BIRDS AND BIRDS OF PREY
 These birds migrate from the northern United States to the southern United States. The land birds and birds of prey (5) migrate from the northern United States to the southern United States.

- 1. Blackpoll warbler
- 2. Arctic tern
- 3. Upland sandpiper
- 4. Greater blue heron
- 5. Peregrine falcon
- 6. Sharp-shinned hawk
- 7. Red-shouldered hawk
- 8. Broad-winged hawk
- 9. Cooper's hawk
- 10. Northern goshawk
- 11. Sharp-shinned hawk
- 12. Broad-winged hawk
- 13. Red-shouldered hawk
- 14. Cooper's hawk
- 15. Northern goshawk
- 16. Sharp-shinned hawk
- 17. Broad-winged hawk
- 18. Red-shouldered hawk
- 19. Cooper's hawk
- 20. Northern goshawk
- 21. Sharp-shinned hawk
- 22. Broad-winged hawk
- 23. Red-shouldered hawk
- 24. Cooper's hawk
- 25. Northern goshawk
- 26. Sharp-shinned hawk
- 27. Broad-winged hawk
- 28. Red-shouldered hawk
- 29. Cooper's hawk
- 30. Northern goshawk
- 31. Sharp-shinned hawk
- 32. Broad-winged hawk
- 33. Red-shouldered hawk
- 34. Cooper's hawk
- 35. Northern goshawk
- 36. Sharp-shinned hawk
- 37. Broad-winged hawk
- 38. Red-shouldered hawk
- 39. Cooper's hawk
- 40. Northern goshawk
- 41. Sharp-shinned hawk
- 42. Broad-winged hawk
- 43. Red-shouldered hawk
- 44. Cooper's hawk
- 45. Northern goshawk
- 46. Sharp-shinned hawk
- 47. Broad-winged hawk
- 48. Red-shouldered hawk
- 49. Cooper's hawk
- 50. Northern goshawk

- 41. White-crowned sparrow
- 42. Song sparrow
- 43. Field sparrow
- 44. Chipping sparrow
- 45. Indigo bunting
- 46. American goldfinch
- 47. Downy woodpecker
- 48. Red-bellied woodpecker
- 49. Black-capped chickadee
- 50. Parula sparrow
- 51. Yellow-rumped warbler
- 52. Blue jay
- 53. Red-shouldered hawk
- 54. Sharp-shinned hawk
- 55. Broad-winged hawk
- 56. Cooper's hawk
- 57. Northern goshawk
- 58. Sharp-shinned hawk
- 59. Broad-winged hawk
- 60. Red-shouldered hawk
- 61. Cooper's hawk
- 62. Northern goshawk
- 63. Sharp-shinned hawk
- 64. Broad-winged hawk
- 65. Red-shouldered hawk
- 66. Cooper's hawk
- 67. Northern goshawk
- 68. Sharp-shinned hawk
- 69. Broad-winged hawk
- 70. Red-shouldered hawk
- 71. Cooper's hawk
- 72. Northern goshawk
- 73. Sharp-shinned hawk
- 74. Broad-winged hawk
- 75. Red-shouldered hawk
- 76. Cooper's hawk
- 77. Northern goshawk
- 78. Sharp-shinned hawk
- 79. Broad-winged hawk
- 80. Red-shouldered hawk
- 81. Cooper's hawk
- 82. Northern goshawk
- 83. Sharp-shinned hawk
- 84. Broad-winged hawk
- 85. Red-shouldered hawk
- 86. Cooper's hawk
- 87. Northern goshawk
- 88. Sharp-shinned hawk
- 89. Broad-winged hawk
- 90. Red-shouldered hawk
- 91. Cooper's hawk
- 92. Northern goshawk
- 93. Sharp-shinned hawk
- 94. Broad-winged hawk
- 95. Red-shouldered hawk
- 96. Cooper's hawk
- 97. Northern goshawk
- 98. Sharp-shinned hawk
- 99. Broad-winged hawk
- 100. Red-shouldered hawk
- 101. Cooper's hawk
- 102. Northern goshawk
- 103. Sharp-shinned hawk
- 104. Broad-winged hawk
- 105. Red-shouldered hawk
- 106. Cooper's hawk
- 107. Northern goshawk
- 108. Sharp-shinned hawk
- 109. Broad-winged hawk
- 110. Red-shouldered hawk
- 111. Cooper's hawk
- 112. Northern goshawk
- 113. Sharp-shinned hawk
- 114. Broad-winged hawk
- 115. Red-shouldered hawk
- 116. Cooper's hawk
- 117. Northern goshawk
- 118. Sharp-shinned hawk
- 119. Broad-winged hawk
- 120. Red-shouldered hawk
- 121. Cooper's hawk
- 122. Northern goshawk
- 123. Sharp-shinned hawk
- 124. Broad-winged hawk
- 125. Red-shouldered hawk
- 126. Cooper's hawk
- 127. Northern goshawk
- 128. Sharp-shinned hawk
- 129. Broad-winged hawk
- 130. Red-shouldered hawk
- 131. Cooper's hawk
- 132. Northern goshawk
- 133. Sharp-shinned hawk
- 134. Broad-winged hawk
- 135. Red-shouldered hawk
- 136. Cooper's hawk
- 137. Northern goshawk
- 138. Sharp-shinned hawk
- 139. Broad-winged hawk
- 140. Red-shouldered hawk
- 141. Cooper's hawk
- 142. Northern goshawk
- 143. Sharp-shinned hawk
- 144. Broad-winged hawk
- 145. Red-shouldered hawk
- 146. Cooper's hawk
- 147. Northern goshawk
- 148. Sharp-shinned hawk
- 149. Broad-winged hawk
- 150. Red-shouldered hawk
- 151. Cooper's hawk
- 152. Northern goshawk
- 153. Sharp-shinned hawk
- 154. Broad-winged hawk
- 155. Red-shouldered hawk
- 156. Cooper's hawk
- 157. Northern goshawk
- 158. Sharp-shinned hawk
- 159. Broad-winged hawk
- 160. Red-shouldered hawk
- 161. Cooper's hawk
- 162. Northern goshawk
- 163. Sharp-shinned hawk
- 164. Broad-winged hawk
- 165. Red-shouldered hawk
- 166. Cooper's hawk
- 167. Northern goshawk
- 168. Sharp-shinned hawk
- 169. Broad-winged hawk
- 170. Red-shouldered hawk
- 171. Cooper's hawk
- 172. Northern goshawk
- 173. Sharp-shinned hawk
- 174. Broad-winged hawk
- 175. Red-shouldered hawk
- 176. Cooper's hawk
- 177. Northern goshawk
- 178. Sharp-shinned hawk
- 179. Broad-winged hawk
- 180. Red-shouldered hawk
- 181. Cooper's hawk
- 182. Northern goshawk
- 183. Sharp-shinned hawk
- 184. Broad-winged hawk
- 185. Red-shouldered hawk
- 186. Cooper's hawk
- 187. Northern goshawk
- 188. Sharp-shinned hawk
- 189. Broad-winged hawk
- 190. Red-shouldered hawk
- 191. Cooper's hawk
- 192. Northern goshawk
- 193. Sharp-shinned hawk
- 194. Broad-winged hawk
- 195. Red-shouldered hawk
- 196. Cooper's hawk
- 197. Northern goshawk
- 198. Sharp-shinned hawk
- 199. Broad-winged hawk
- 200. Red-shouldered hawk
- 201. Cooper's hawk
- 202. Northern goshawk
- 203. Sharp-shinned hawk
- 204. Broad-winged hawk
- 205. Red-shouldered hawk
- 206. Cooper's hawk
- 207. Northern goshawk
- 208. Sharp-shinned hawk
- 209. Broad-winged hawk
- 210. Red-shouldered hawk
- 211. Cooper's hawk
- 212. Northern goshawk
- 213. Sharp-shinned hawk
- 214. Broad-winged hawk
- 215. Red-shouldered hawk
- 216. Cooper's hawk
- 217. Northern goshawk
- 218. Sharp-shinned hawk
- 219. Broad-winged hawk
- 220. Red-shouldered hawk
- 221. Cooper's hawk
- 222. Northern goshawk
- 223. Sharp-shinned hawk
- 224. Broad-winged hawk
- 225. Red-shouldered hawk
- 226. Cooper's hawk
- 227. Northern goshawk
- 228. Sharp-shinned hawk
- 229. Broad-winged hawk
- 230. Red-shouldered hawk
- 231. Cooper's hawk
- 232. Northern goshawk
- 233. Sharp-shinned hawk
- 234. Broad-winged hawk
- 235. Red-shouldered hawk
- 236. Cooper's hawk
- 237. Northern goshawk
- 238. Sharp-shinned hawk
- 239. Broad-winged hawk
- 240. Red-shouldered hawk
- 241. Cooper's hawk
- 242. Northern goshawk
- 243. Sharp-shinned hawk
- 244. Broad-winged hawk
- 245. Red-shouldered hawk
- 246. Cooper's hawk
- 247. Northern goshawk
- 248. Sharp-shinned hawk
- 249. Broad-winged hawk
- 250. Red-shouldered hawk
- 251. Cooper's hawk
- 252. Northern goshawk
- 253. Sharp-shinned hawk
- 254. Broad-winged hawk
- 255. Red-shouldered hawk
- 256. Cooper's hawk
- 257. Northern goshawk
- 258. Sharp-shinned hawk
- 259. Broad-winged hawk
- 260. Red-shouldered hawk
- 261. Cooper's hawk
- 262. Northern goshawk
- 263. Sharp-shinned hawk
- 264. Broad-winged hawk
- 265. Red-shouldered hawk
- 266. Cooper's hawk
- 267. Northern goshawk
- 268. Sharp-shinned hawk
- 269. Broad-winged hawk
- 270. Red-shouldered hawk
- 271. Cooper's hawk
- 272. Northern goshawk
- 273. Sharp-shinned hawk
- 274. Broad-winged hawk
- 275. Red-shouldered hawk
- 276. Cooper's hawk
- 277. Northern goshawk
- 278. Sharp-shinned hawk
- 279. Broad-winged hawk
- 280. Red-shouldered hawk
- 281. Cooper's hawk
- 282. Northern goshawk
- 283. Sharp-shinned hawk
- 284. Broad-winged hawk
- 285. Red-shouldered hawk
- 286. Cooper's hawk
- 287. Northern goshawk
- 288. Sharp-shinned hawk
- 289. Broad-winged hawk
- 290. Red-shouldered hawk
- 291. Cooper's hawk
- 292. Northern goshawk
- 293. Sharp-shinned hawk
- 294. Broad-winged hawk
- 295. Red-shouldered hawk
- 296. Cooper's hawk
- 297. Northern goshawk
- 298. Sharp-shinned hawk
- 299. Broad-winged hawk
- 300. Red-shouldered hawk
- 301. Cooper's hawk
- 302. Northern goshawk
- 303. Sharp-shinned hawk
- 304. Broad-winged hawk
- 305. Red-shouldered hawk
- 306. Cooper's hawk
- 307. Northern goshawk
- 308. Sharp-shinned hawk
- 309. Broad-winged hawk
- 310. Red-shouldered hawk
- 311. Cooper's hawk
- 312. Northern goshawk
- 313. Sharp-shinned hawk
- 314. Broad-winged hawk
- 315. Red-shouldered hawk
- 316. Cooper's hawk
- 317. Northern goshawk
- 318. Sharp-shinned hawk
- 319. Broad-winged hawk
- 320. Red-shouldered hawk
- 321. Cooper's hawk
- 322. Northern goshawk
- 323. Sharp-shinned hawk
- 324. Broad-winged hawk
- 325. Red-shouldered hawk
- 326. Cooper's hawk
- 327. Northern goshawk
- 328. Sharp-shinned hawk
- 329. Broad-winged hawk
- 330. Red-shouldered hawk
- 331. Cooper's hawk
- 332. Northern goshawk
- 333. Sharp-shinned hawk
- 334. Broad-winged hawk
- 335. Red-shouldered hawk
- 336. Cooper's hawk
- 337. Northern goshawk
- 338. Sharp-shinned hawk
- 339. Broad-winged hawk
- 340. Red-shouldered hawk
- 341. Cooper's hawk
- 342. Northern goshawk
- 343. Sharp-shinned hawk
- 344. Broad-winged hawk
- 345. Red-shouldered hawk
- 346. Cooper's hawk
- 347. Northern goshawk
- 348. Sharp-shinned hawk
- 349. Broad-winged hawk
- 350. Red-shouldered hawk
- 351. Cooper's hawk
- 352. Northern goshawk
- 353. Sharp-shinned hawk
- 354. Broad-winged hawk
- 355. Red-shouldered hawk
- 356. Cooper's hawk
- 357. Northern goshawk
- 358. Sharp-shinned hawk
- 359. Broad-winged hawk
- 360. Red-shouldered hawk
- 361. Cooper's hawk
- 362. Northern goshawk
- 363. Sharp-shinned hawk
- 364. Broad-winged hawk
- 365. Red-shouldered hawk
- 366. Cooper's hawk
- 367. Northern goshawk
- 368. Sharp-shinned hawk
- 369. Broad-winged hawk
- 370. Red-shouldered hawk
- 371. Cooper's hawk
- 372. Northern goshawk
- 373. Sharp-shinned hawk
- 374. Broad-winged hawk
- 375. Red-shouldered hawk
- 376. Cooper's hawk
- 377. Northern goshawk
- 378. Sharp-shinned hawk
- 379. Broad-winged hawk
- 380. Red-shouldered hawk
- 381. Cooper's hawk
- 382. Northern goshawk
- 383. Sharp-shinned hawk
- 384. Broad-winged hawk
- 385. Red-shouldered hawk
- 386. Cooper's hawk
- 387. Northern goshawk
- 388. Sharp-shinned hawk
- 389. Broad-winged hawk
- 390. Red-shouldered hawk
- 391. Cooper's hawk
- 392. Northern goshawk
- 393. Sharp-shinned hawk
- 394. Broad-winged hawk
- 395. Red-shouldered hawk
- 396. Cooper's hawk
- 397. Northern goshawk
- 398. Sharp-shinned hawk
- 399. Broad-winged hawk
- 400. Red-shouldered hawk
- 401. Cooper's hawk
- 402. Northern goshawk
- 403. Sharp-shinned hawk
- 404. Broad-winged hawk
- 405. Red-shouldered hawk
- 406. Cooper's hawk
- 407. Northern goshawk
- 408. Sharp-shinned hawk
- 409. Broad-winged hawk
- 410. Red-shouldered hawk
- 411. Cooper's hawk
- 412. Northern goshawk
- 413. Sharp-shinned hawk
- 414. Broad-winged hawk
- 415. Red-shouldered hawk
- 416. Cooper's hawk
- 417. Northern goshawk
- 418. Sharp-shinned hawk
- 419. Broad-winged hawk
- 420. Red-shouldered hawk
- 421. Cooper's hawk
- 422. Northern goshawk
- 423. Sharp-shinned hawk
- 424. Broad-winged hawk
- 425. Red-shouldered hawk
- 426. Cooper's hawk
- 427. Northern goshawk
- 428. Sharp-shinned hawk
- 429. Broad-winged hawk
- 430. Red-shouldered hawk
- 431. Cooper's hawk
- 432. Northern goshawk
- 433. Sharp-shinned hawk
- 434. Broad-winged hawk
- 435. Red-shouldered hawk
- 436. Cooper's hawk
- 437. Northern goshawk
- 438. Sharp-shinned hawk
- 439. Broad-winged hawk
- 440. Red-shouldered hawk
- 441. Cooper's hawk
- 442. Northern goshawk
- 443. Sharp-shinned hawk
- 444. Broad-winged hawk
- 445. Red-shouldered hawk
- 446. Cooper's hawk
- 447. Northern goshawk
- 448. Sharp-shinned hawk
- 449. Broad-winged hawk
- 450. Red-shouldered hawk
- 451. Cooper's hawk
- 452. Northern goshawk
- 453. Sharp-shinned hawk
- 454. Broad-winged hawk
- 455. Red-shouldered hawk
- 456. Cooper's hawk
- 457. Northern goshawk
- 458. Sharp-shinned hawk
- 459. Broad-winged hawk
- 460. Red-shouldered hawk
- 461. Cooper's hawk
- 462. Northern goshawk
- 463. Sharp-shinned hawk
- 464. Broad-winged hawk
- 465. Red-shouldered hawk
- 466. Cooper's hawk
- 467. Northern goshawk
- 468. Sharp-shinned hawk
- 469. Broad-winged hawk
- 470. Red-shouldered hawk
- 471. Cooper's hawk
- 472. Northern goshawk
- 473. Sharp-shinned hawk
- 474. Broad-winged hawk
- 475. Red-shouldered hawk
- 476. Cooper's hawk
- 477. Northern goshawk
- 478. Sharp-shinned hawk
- 479. Broad-winged hawk
- 480. Red-shouldered hawk
- 481. Cooper's hawk
- 482. Northern goshawk
- 483. Sharp-shinned hawk
- 484. Broad-winged hawk
- 485. Red-shouldered hawk
- 486. Cooper's hawk
- 487. Northern goshawk
- 488. Sharp-shinned hawk
- 489. Broad-winged hawk
- 490. Red-shouldered hawk
- 491. Cooper's hawk
- 492. Northern goshawk
- 493. Sharp-shinned hawk
- 494. Broad-winged hawk
- 495. Red-shouldered hawk
- 496. Cooper's hawk
- 497. Northern goshawk
- 498. Sharp-shinned hawk
- 499. Broad-winged hawk
- 500. Red-shouldered hawk
- 501. Cooper's hawk
- 502. Northern goshawk
- 503. Sharp-shinned hawk
- 504. Broad-winged hawk
- 505. Red-shouldered hawk
- 506. Cooper's hawk
- 507. Northern goshawk
- 508. Sharp-shinned hawk
- 509. Broad-winged hawk
- 510. Red-shouldered hawk
- 511. Cooper's hawk
- 512. Northern goshawk
- 513. Sharp-shinned hawk
- 514. Broad-winged hawk
- 515. Red-shouldered hawk
- 516. Cooper's hawk
- 517. Northern goshawk
- 518. Sharp-shinned hawk
- 519. Broad-winged hawk
- 520. Red-shouldered hawk
- 521. Cooper's hawk
- 522. Northern goshawk
- 523. Sharp-shinned hawk
- 524. Broad-winged hawk
- 525. Red-shouldered hawk
- 526. Cooper's hawk
- 527. Northern goshawk
- 528. Sharp-shinned hawk
- 529. Broad-winged hawk
- 530. Red-shouldered hawk
- 531. Cooper's hawk
- 532. Northern goshawk
- 533. Sharp-shinned hawk
- 534. Broad-winged hawk
- 535. Red-shouldered hawk
- 536. Cooper's hawk
- 537. Northern goshawk
- 538. Sharp-shinned hawk
- 539. Broad-winged hawk
- 540. Red-shouldered hawk
- 541. Cooper's hawk
- 542. Northern goshawk
- 543. Sharp-shinned hawk
- 544. Broad-winged hawk
- 545. Red-shouldered hawk
- 546. Cooper's hawk
- 547. Northern goshawk
- 548. Sharp-shinned hawk
- 549. Broad-winged hawk
- 550. Red-shouldered hawk
- 551. Cooper's hawk
- 552. Northern goshawk
- 553. Sharp-shinned hawk
- 554. Broad-winged hawk
- 555. Red-shouldered hawk
- 556. Cooper's hawk
- 557. Northern goshawk
- 558. Sharp-shinned hawk
- 559. Broad-winged hawk
- 560. Red-shouldered hawk
- 561. Cooper's hawk
- 562. Northern goshawk
- 563. Sharp-shinned hawk
- 564. Broad-winged hawk
- 565. Red-shouldered hawk
- 566. Cooper's hawk
- 567. Northern goshawk
- 568. Sharp-shinned hawk
- 569. Broad-winged hawk
- 570. Red-shouldered hawk
- 571. Cooper's hawk
- 572. Northern goshawk
- 573. Sharp-shinned hawk
- 574. Broad-winged hawk
- 575. Red-shouldered hawk
- 576. Cooper's hawk
- 577. Northern goshawk
- 578. Sharp-shinned hawk
- 579. Broad-winged hawk
- 580. Red-shouldered hawk
- 581. Cooper's hawk
- 582. Northern goshawk
- 583. Sharp-shinned hawk
- 584. Broad-winged hawk
- 585. Red-shouldered hawk
- 586. Cooper's hawk
- 587. Northern goshawk
- 588. Sharp-shinned hawk
- 589. Broad-winged hawk
- 590. Red-shouldered hawk
- 591. Cooper's hawk
- 592. Northern goshawk
- 593. Sharp-shinned hawk
- 594. Broad-winged hawk
- 595. Red-shouldered hawk
- 596. Cooper's hawk
- 597. Northern goshawk
- 598. Sharp-shinned hawk
- 599. Broad-winged hawk
- 600. Red-shouldered hawk
- 601. Cooper's hawk
- 602. Northern goshawk
- 603. Sharp-shinned hawk
- 604. Broad-winged hawk
- 605. Red-shouldered hawk
- 606. Cooper's hawk
- 607. Northern goshawk
- 608. Sharp-shinned hawk
- 609. Broad-winged hawk
- 610. Red-shouldered hawk
- 611. Cooper's hawk
- 612. Northern goshawk
- 613. Sharp-shinned hawk
- 614. Broad-winged hawk
- 615. Red-shouldered hawk
- 616. Cooper's hawk
- 617. Northern goshawk
- 618. Sharp-shinned hawk
- 619. Broad-winged hawk
- 620. Red-shouldered hawk
- 621. Cooper's hawk
- 622. Northern goshawk
- 623. Sharp-shinned hawk
- 624. Broad-winged hawk
- 625. Red-shouldered hawk
- 626. Cooper's hawk
- 627. Northern goshawk
- 628. Sharp-shinned hawk
- 629. Broad-winged hawk
- 630. Red-shouldered hawk
- 631. Cooper's hawk
- 632. Northern goshawk
- 633. Sharp-shinned hawk
- 634. Broad-winged hawk
- 635. Red-shouldered hawk
- 636. Cooper's hawk
- 637. Northern goshawk
- 638. Sharp-shinned hawk
- 639. Broad-winged hawk
- 640. Red-shouldered hawk
- 641. Cooper's hawk
- 642. Northern goshawk
- 643. Sharp-shinned hawk
- 644. Broad-winged hawk
- 645. Red-shouldered hawk
- 646. Cooper's hawk
- 647. Northern goshawk
- 648. Sharp-shinned hawk
- 649. Broad-winged hawk
- 650. Red-shouldered hawk
- 651. Cooper's hawk
- 652. Northern goshawk
- 653. Sharp-shinned hawk
- 654. Broad-winged hawk
- 655. Red-shouldered hawk
- 656. Cooper's hawk
- 657. Northern goshawk
- 658. Sharp-shinned hawk
- 659. Broad-winged hawk
- 660. Red-shouldered hawk
- 661. Cooper's hawk
- 662. Northern goshawk
- 663. Sharp-shinned hawk
- 664. Broad-winged hawk
- 665. Red-shouldered hawk
- 666. Cooper's hawk
- 667. Northern goshawk
- 668. Sharp-shinned hawk
- 669. Broad-winged hawk
- 670. Red-shouldered hawk
- 671. Cooper's hawk
- 672. Northern goshawk
- 673. Sharp-shinned hawk
- 674. Broad-winged hawk
- 675. Red-shouldered hawk
- 676. Cooper's hawk
- 677. Northern goshawk
- 678. Sharp-shinned hawk
- 679. Broad-winged hawk
- 680. Red-shouldered hawk
- 681. Cooper's hawk
- 682. Northern goshawk
- 683. Sharp-shinned hawk
- 684. Broad-winged hawk
- 685. Red-shouldered hawk
- 686. Cooper's hawk
- 687. Northern goshawk
- 688. Sharp-shinned hawk
- 689. Broad-winged hawk
- 690. Red-shouldered hawk
- 691. Cooper's hawk
- 692. Northern goshawk
- 693. Sharp-shinned hawk
- 694. Broad-winged hawk
- 695. Red-shouldered hawk
- 696. Cooper's hawk
- 697. Northern goshawk
- 698. Sharp-shinned hawk
- 699. Broad-winged hawk
- 700. Red-shouldered hawk
- 701. Cooper's hawk
- 702. Northern goshawk
- 703. Sharp-shinned hawk
- 704. Broad-winged hawk
- 705. Red-shouldered hawk
- 706. Cooper's hawk
- 707. Northern goshawk
- 708. Sharp-shinned hawk
- 709. Broad-winged hawk
- 710. Red-shouldered hawk
- 711. Cooper's hawk
- 712. Northern goshawk
- 713. Sharp-shinned hawk
- 714. Broad-winged hawk
- 715. Red-shouldered hawk
- 716. Cooper's hawk
- 717. Northern goshawk
- 718. Sharp-shinned hawk
- 719. Broad-winged hawk
- 720. Red-shouldered hawk
- 721. Cooper's hawk
- 722. Northern goshawk
- 723. Sharp-shinned hawk
- 724. Broad-winged hawk
- 725. Red-shouldered hawk
- 726. Cooper's hawk
- 727. Northern goshawk
- 728. Sharp-shinned hawk
- 729. Broad-winged hawk
- 730. Red-shouldered hawk
- 731. Cooper's hawk
- 732. Northern goshawk
- 733. Sharp-shinned hawk
- 734. Broad-winged hawk
- 735. Red-shouldered hawk
- 736. Cooper's hawk
- 737. Northern goshawk
- 738. Sharp-shinned hawk
- 739. Broad-winged hawk
- 740. Red-shouldered hawk
- 741. Cooper's hawk
- 742. Northern goshawk
- 743. Sharp-shinned hawk
- 744. Broad-winged hawk
- 745. Red-shouldered hawk
- 746. Cooper's hawk
- 747. Northern goshawk
- 748. Sharp-shinned hawk
- 749. Broad-winged hawk
- 750. Red-shouldered hawk
- 751. Cooper's hawk
- 752. Northern goshawk
- 753. Sharp-shinned hawk
- 754. Broad-winged hawk
- 755. Red-shouldered hawk
- 756. Cooper's hawk
- 757. Northern goshawk
- 758. Sharp-shinned hawk
- 759. Broad-winged hawk
- 760. Red-shouldered hawk
- 761. Cooper's hawk
- 762. Northern goshawk
- 763. Sharp-shinned hawk
- 764. Broad-winged hawk
- 765. Red-shouldered hawk
- 766. Cooper's hawk
- 767. Northern goshawk
- 768. Sharp-shinned hawk
- 769. Broad-winged hawk
- 770. Red-shouldered hawk
- 771. Cooper's hawk
- 772. Northern goshawk
- 773

cl clinicamente (BUSCH *et al.*, 2008; ANGENVOORT *et al.*, 2013). Assim técnicas como o isolamento viral, de biologia molecular, sorológicas e imuno-histopatológicas podem ser utilizadas (OIE, 2018; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). O período de incubação, assim como de outras arboviroses, pode variar em média de 2 a 15 dias (BUNNING *et al.*, 2002; VASCONCELOS, 2003; MURRAY *et al.*, 2011).

O isolamento viral pode ser realizado a partir de soro, líquido ou tecidos de animais ou pessoas que tenham vindo à óbito. Quando o material é proveniente de tecido, esse material deve ser macerado, homogeneizado e, após filtrado, ser inoculado em linhagens de células de mosquito *Aedes albopictus* - clone C6/36, ou em células de rim de macaco verde africano (VERO) (GOTTDENKER *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2019).

Outro método diagnóstico está baseado na identificação de ácidos nucleicos, a partir de fluidos ou tecidos, com *primers* específicos para o WNV (SHI *et al.*, 2001). A sensibilidade e especificidade são semelhantes ou até melhores que técnicas convencionais, dependendo do período em que a amostra foi colhida, além de apresentarem um diagnóstico mais preciso e rápido (MOUREAU *et al.*, 2007; OIE, 2018). Além disso, tem-se a possibilidade da confirmação do diagnóstico por sequenciamento, evitando dúvidas na identificação do agente viral detectado (LANCIOTTI, 2003). A PCR convencional é amplamente utilizada e, conforme recomendado pela OIE, a sensibilidade pode ser aumentada utilizando-se a nested-PCR, contudo as chances de contaminação são maiores, devendo ser feita e interpretada com maior cautela (DOMINGO *et al.*, 2011; OIE, 2018). Já a técnica de RT-PCR em tempo real trouxe grandes vantagens para o diagnóstico de WNV, pois combina alta sensibilidade e especificidade com um menor tempo de execução e menores chances de contaminação (LANCIOTTI *et al.*, 2000). Ademais, para o diagnóstico do WNV, que integra o sorocomplexo JEV, a utilização de sondas fluorogênicas específicas (TaqMan®) é recomendada, evitando falsos-positivos (LANCIOTTI *et al.*, 2000; JIMENEZ-CLAVERO *et al.*, 2006). Entretanto, devido ao curto período virêmico e a baixa carga viral em casos com doença neuroinvasiva, a PCR pode ter limitações e um resultado negativo não descarta a infecção pelo WNV (PAHO/WHO, 2016).

De acordo com a evolução da doença, a partir do 4º e 8º dias após o início dos sinais clínicos é possível detectar anticorpos da classe IgM e IgG, respectivamente,

não sendo mais detectada a presença do vírus no sangue (Figura 4) (BUSCH *et al.*, 2008; ANGENVOORT *et al.*, 2013; MAEDA; MAEDA, 2013; LUSTIG *et al.*, 2018). Baseado nisso, é possível proceder o diagnóstico a partir de diferentes técnicas como ELISA (IgM e IgG), Inibição da Hemaglutinação (HI) e neutralização por redução de placas (PRNT) (MAEDA; MAEDA, 2013; LUSTIG *et al.*, 2018; OIE, 2018; ZANONI *et al.*, 2018). Assim, caso haja a detecção de anticorpos IgM isoladamente ou a soroconversão para IgG, pode-se confirmar a doença na forma aguda (LUSTIG *et al.*, 2018). Embora o teste de eleição tenha sido o MAC-ELISA para confirmar infecções recentes, alguns inconvenientes podem ser encontrados como a persistência prolongada, por meses e até anos, de anticorpos da classe IgM contra o WNV (PRINCE *et al.*, 2005; BUSCH *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2010, 2011; PAPA *et al.*, 2011, 2015). Além disso, em países tropicais onde se tem a presença de outros arbovírus do mesmo gênero, como DENV, ZIKV e YFV a chance de que ocorra reação cruzada no diagnóstico é alta (MURRAY *et al.*, 2011; LUSTIG *et al.*, 2018). Dessa maneira, a melhor forma de fazer o diagnóstico sorológico é com amostras pareadas, destacando-se a soroconversão da primeira para a segunda amostra ou então um aumento no título de quatro vezes entre estas amostras, confirmando a doença aguda.

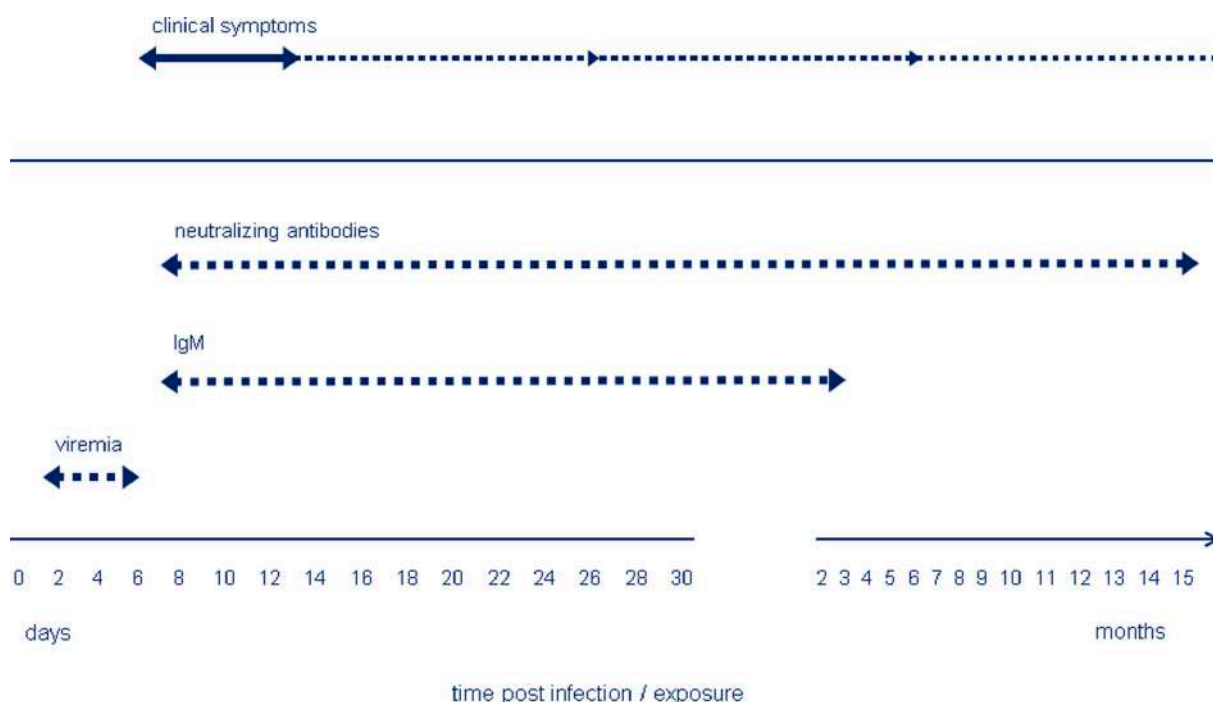


Figura 4. Gráfico da evolução clínica e resposta imunológica frente a utilização de diferentes metodologias de diagnóstico para a detecção do WNV em equídeos (ANGENVOORT *et al.*, 2013).

A confirmação do diagnóstico também pode ser feita pela utilização de técnicas imuno-histopatológicas, inicialmente pela coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e, se houver evidências de infecção viral, pela avaliação da presença do WNV na imuno-histoquímica (IHQ) usando anticorpos específicos para proteínas ou outros antígenos virais presentes nos tecidos (MURRAY *et al.*, 2011; CDC, 2013). Ao avaliar o cérebro de diversas aves Ellis *et al.* (2005) encontraram positividade em 92% por meio do isolamento viral, sendo esse considerado órgão alvo para o WNV, em particular o cerebelo (NIJDAM, 2010). Entretanto pela IHQ, no mesmo estudo, apenas 40% dos testes foram positivos na análise do sistema nervoso central, enquanto em tecido cardíaco 96% foram positivos (ELLIS *et al.*, 2005). Palmieri *et al.* (2011) encontraram achados semelhantes pela IHQ, 97,1% de positividade em tecido cardíaco e 56,7% em tecido nervoso. Dessa maneira, sugere-se que diversos tecidos sejam avaliados, aumentando a sensibilidade de detecção nesses animais (ELLIS *et al.*, 2005; NIJDAM, 2010; PALMIERI *et al.*; 2011). Isso não parece acontecer com os equídeos, já que o WNV demonstra forte tropismo pelo sistema nervoso central (STEELE *et al.*, 2000; CANTILE *et al.*, 2001) e parece não acometer outros tecidos, como coração, pulmões, fígado, rins, entre outros, com a mesma intensidade (NIJDAM, 2010), o que corrobora o fato de ser considerado um hospedeiro terminal (COLPITTS *et al.*, 2012). Histopatologicamente, as lesões causadas no sistema nervoso central são caracterizadas como meningoencefalomielite não supurativa com hemorragias perivascular, localizadas com maior frequência no tronco cerebral e medula espinhal (CANTILE *et al.*, 2001; READ *et al.*, 2005). Ademais, outras lesões como pan-encefalomielite multifocal e degeneração neuronal também podem ser encontradas (CANTILE *et al.*, 2001; TOPLU *et al.*, 2015). A manifestação da doença neurológica em equídeos pode chegar a 10% (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004), o que geralmente leva a suspeita pela infecção. Apesar da pequena proporção de acometimento neurológico, considerando-se a proporção de equídeos infectados, estes se tornam importantes sentinelas para a detecção precoce do vírus, assim como algumas espécies de aves da ordem dos passeriformes.

Desde o seu isolamento, em 1937, diversos surtos começaram a ser detectados em todo o mundo. No ano de 1951, em Israel, foi registrado o primeiro surto em seres humanos (BERNKOPF; LEVINE; NERSON, 1953). Ainda na década de 50, no Egito

(região do Delta do Nilo) e Sudão, verificou-se que a soroprevalência para o WNV era de 22% nas crianças e 61% nos adultos (HURLBUT *et al.*, 1956; MURGUE *et al.*, 2001). Em 1974, na África do Sul, uma epidemia resultou na infecção de 55% da população (MCINTOSH *et al.*, 1976). Até então, nenhum óbito pelo WNV havia sido registrado, quando em 1994 e 1996, na Algeria e na Romênia, ocorreram 02 e 17 óbitos, respectivamente (CHANCEY *et al.*, 2015). Após esses casos, muitos outros continuaram sendo reportados na Europa, Oriente Médio e África.

Até a década de 90, o WNV foi considerado um vírus do “Velho Mundo”, mas em 1999 cruza o Oceano Atlântico e chega à América do Norte, gerando um surto em Nova Iorque, com aumento na mortalidade de aves de vida livre e de zoológicos, além de 67 pessoas infectadas, com 21 delas indo à óbito (NASH *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005a; WARD *et al.*, 2006; LADEAU *et al.*, 2007; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). Depois desse primeiro surto epidêmico, o WNV conseguiu estabelecer um ciclo enzoótico e assim se dispersar por todo o país, causando surtos de encefalites em equinos e seres humanos, além da redução nas populações de aves silvestres (ROEHRIG, 2013; HADFIELD *et al.*, 2019). Embora diversas investigações tenham sido conduzidas para entender como esse vírus entrou nos EUA, não se chegou a nenhuma conclusão (SEJVAR *et al.*, 2003; ROEHRIG, 2013). Apesar disso, após realizarem o estudo filogenético das sequências isoladas em Nova Iorque durante a epidemia de 1999 e as obtidas em Israel a partir da epizootia que acometeu gansos e cegonhas em 1998, acredita-se que o vírus tenha tido sua origem nessa região do Oriente Médio (LANCIOTTI *et al.*, 1999; JIA *et al.*, 1999; GILADI *et al.*, 2001; MALKINSON; BANET, 2002; MALKINSON *et al.*, 2002). Desde então, o WNV ganhou uma maior importância tanto para a saúde pública, quanto para a saúde animal, uma vez que acomete muitas espécies animais, em especial aves e equídeos.

Aos anos que se seguiram, durante os anos 2001 e 2004, o WNV se dispersou pela América Central e Caribe (ESTRADA-FRANCO *et al.*, 2003; KOMAR; CLARK, 2006; ELIZONDO-QUIROGA, D.; ELIZONDO-QUIROGA, A., 2013). Na América do Sul diversos estudos envolvendo técnicas sorológicas, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a neutralização por redução de placas (PRNT), foram conduzidos a fim de verificar e rastrear a circulação do WNV (CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). De 2004 a 2006, países como Colômbia, Argentina e Venezuela, documentaram a circulação do WNV pela primeira em animais (aves e equinos), que

foram infectados e vieram à óbito (MATTAR *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2006; BOSCH *et al.*, 2007; DIAZ *et al.*, 2008; OSORIO *et al.*, 2012). Apenas em 2008 foram encontradas evidências sorológicas no Brasil, na região do Pantanal, de que o vírus possivelmente já circulava no território brasileiro (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011; MELANDRI *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; BRASIL, 2016; SILVA *et al.*, 2019). Em 2009, na Paraíba, região nordeste do país novas evidências foram encontradas, sugerindo que o vírus tivesse se deslocado da região Centro-Oeste do país para a região Nordeste, hipótese confirmada anos mais tarde, no Estado do Piauí, pelo primeiro caso humano registrado no Brasil em 2014. Apesar disso, o caso foi confirmado apenas por sorologia (VIEIRA *et al.*, 2015). Recentemente, Weber *et al.* (2021) ao analisaram amostras de equídeos colhidas em 2013, no Rio Grande do Sul, e encontraram animais reagentes ao WNV.

Em 2017, 10 possíveis casos humanos foram reportados, também no Piauí, porém apenas em 2019, um dos casos foi confirmado (CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). Dez anos após a primeira evidência sorológica, pesquisadores conseguiram isolar o vírus pela primeira vez no Estado do Espírito Santo, de 3 equinos que tiveram sintomatologia neurológica e tiveram que ser eutanasiados (MARTINS *et al.*, 2019). Um estudo conduzido no Ceará, após a confirmação de um equino no Município de Boa Viagem, em 2019 (SICONELLI *et al.*, 2021) levou a uma vasta investigação interministerial, onde foram detectados anticorpos neutralizantes em equídeos (11/25), aves domésticas (14/67) e silvestres de vida livre (13/278), seres humanos (2/48) e pequenos ruminantes (1/65) (CHALHOUB *et al.*, 2021). Após o alerta de animais positivos no Brasil, estudos retrospectivos foram conduzidos a partir de amostras de equídeos com síndrome neurológica e negativos para raiva, sendo detectados novos casos de WNV por sequenciamento genético nos estados de Minas Gerais (1) em 2018, Bahia (2), em 2018 e 2019, no do Ceará (1) em 2019, São Paulo (1) em 2019, Piauí (1) em 2020 e Paraná, em 2021 (COSTA *et al.*, 2021; PARANÁ, 2021; FRITSCH *et al.*, 2022). Neto *et al.* (2023) isolaram o WNV a partir de um pool de mosquitos do gênero *Culex* coletados em 2017 na região sudeste do Estado do Pará, próximo aos estados do Tocantins e Maranhão. Em maio de 2023 o Instituto Evandro Chagas, confirmou pela primeira vez no Estado do Tocantins um caso humano de FNO (MARANHÃO, 2023). Trata-se adolescente de 16 anos encaminhado para a UTI apresentando febre, confusão mental e rebaixamento importante da

consciência. Além desse, um segundo caso, uma criança de 11 anos (irmão do paciente confirmado), segue em investigação com a mesma sintomatologia.

Assim como em outras arboviroses do gênero *Flavivírus*, em seres humanos a infecção pelo WNV manifesta-se clinicamente em aproximadamente 20% dos casos (REISEN, 2017; LUSTIG *et al.*, 2018). Apenas 1% desses casos, geralmente pessoas idosas e imunocomprometidas, apresentaram a forma grave, neuroinvasiva, da doença (HAYES *et al.*, 2005b).

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país tropical e isso significa ter a combinação de períodos de alta pluviosidade e temperatura elevadas. Por estas características, enfermidades cuja transmissão se dá principalmente por meio de insetos hematófagos (vetores) em que a presença da água é necessária para o seu ciclo de vida, se tornam prevalentes. Nas últimas décadas, a população brasileira, e em particular do Estado de São Paulo, tem sofrido com diversas epidemias causadas por diferentes arbovírus, como pelos vírus Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela. Este último, além da população humana, teve grande impacto na população de primatas não humanos, excedendo 15 mil notificações de epizootias.

O Estado de São Paulo possui um sistema de vigilância robusto e bem alicerçado, contudo diante da diversidade viral, torna-se difícil prever qual demandará mais esforços do sistema de saúde, e ainda, se haverá a emergência de algum outro arbovírus. Estima-se que 60% dos patógenos que causam doenças nos seres humanos sejam zoonóticos, sendo mantidos em ciclos enzoóticos (NORRIS, 2004; OIE, 2017). Exemplos são os Flavivírus, principalmente os transmitidos por vetores, os quais podem acometer seres humanos e animais. Isso reforça a importância da vigilância em animais sentinelas, a fim de identificar precocemente qualquer circulação viral.

O WNV é um exemplo de arbovírus que está circulando, provavelmente, desde 2006 no Brasil, conforme estudos de soroprevalência realizados anteriormente, e que vem se dispersando silenciosamente por todo o país. Novos casos humanos e animais detectados entre 2018 e 2020, em estados da região nordeste e sudeste subsidiam essa afirmação. Por ser a economia mais forte do Brasil, o Estado de São Paulo possui alto fluxo migratório de pessoas e animais, e abriga uma população de aproximadamente 349.921 equinos (IBGE, 2021). Fatores como esses tornam o estado vulnerável e exigem que o sistema de vigilância seja aprimorado e atualizado constantemente, exercendo seu papel de prevenção.

Devido a sua cultura agropecuária, São Paulo conta com uma rede bem estabelecida de laboratórios para o diagnóstico de enfermidades de importância animal, algumas delas com potencial zoonótico. A raiva animal é um exemplo e possui sua rede de diagnóstico (Instituto Pasteur de São Paulo, Instituto Biológico de São

Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/Unesp, entre outros) bem consolidada. Apesar disso, esses laboratórios não possuem capacidade operacional para o diagnóstico diferencial de outros patógenos, como o WNV e outras encefalomyelites virais de importância para a saúde pública e animal. Cabe destacar que parte das amostras de equídeos com síndrome neurológica encaminhadas para diagnóstico de raiva animal, cerca de 20 a 30% é positiva para o vírus rábico, o restante fica sem diagnóstico conclusivo. Essa ausência de investigação para outros agentes que podem cursar com sinais clínicos semelhantes à raiva animal torna o sistema de vigilância vulnerável a introdução e manutenção de doenças jamais registradas, como por exemplo, o *Peruvian Horse Sickness virus* (Nota Informativa nº 123/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS, de 25 de junho de 2019; PATROCA-DA-SILVA *et al.*, 2022), que foi recentemente diagnosticado junto com o WNV no ES, até então exótico para o país.

A dificuldade no diagnóstico é patente e o sistema brasileiro de vigilância, junto à sua população, sofre com isso. Diante de todos os pontos elencados, a formação de uma rede para o fortalecimento do diagnóstico, vigilância e o desenvolvimento de pesquisas é importante para auxiliar na detecção precoce da circulação viral no nosso estado e subsidiar as autoridades na definição dos programas de vigilância. Desse modo, em colaboração com a rede de laboratórios do Estado de São Paulo e empreendimentos de fauna silvestre, o estudo buscou detectar precocemente a circulação do WNV, já que até o momento as informações existentes são frágeis e sem um contexto epidemiológico fundamentado.

Dentro do contexto do “One Health” o estudo de populações animais como sentinela, neste caso, aves e equídeos, é a forma mais adequada para se conhecer a situação epidemiológica de uma região. Assim a detecção precoce da circulação do WNV ou de outra arbovirose fornecerá subsídios às autoridades sanitárias (humana, animal e ambiental), para que, em tempo hábil, implementem medidas de prevenção e controle, mitigando a dispersão desse vírus e danos à saúde. Além disso, ajudará a entender e construir a epidemiologia desses vírus no território brasileiro, cujas informações são escassas.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar a circulação do WNV na população de aves e de equídeos do Estado de São Paulo.

4.2. Específicos

- Formar uma rede de colaboração para o fortalecimento da vigilância, diagnóstico, e pesquisas acerca do WNV;
- Coletar amostras de sistema nervoso central e coração de aves que vieram a óbito com ou sem manifestação de sinais neurológicos;
- Coletar amostras de sistema nervoso central de equídeos que vieram à óbito com ou sem manifestação de sinais neurológicos, ou ainda sem causa aparente ou definida;
- Avaliar a presença do material genético do WNV nas amostras que testaram negativas para raiva animal, pela técnica de RT-qPCR;
- Realizar o diagnóstico diferencial com a encefalite de Saint Louis (SLEV) nos animais que testarem negativos para WNV;
- Nas amostras negativas para ambos os vírus, WNV e SLEV, realizar a RT-qPCR para os gêneros Flavivírus e Alphavírus;
- Proceder o isolamento viral em cultivo celular (em células C6/36 e VERO) das amostras positivas pela RT-qPCR;
- Fazer o sequenciamento e caracterização dos vírus detectados nas amostras positivas e/ou quando isolado em cultivo celular;
- Realizar o exame histopatológico pela coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) em amostras disponíveis;

- Avaliar a presença de antígenos do WNV, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ) após a triagem pelo exame histopatológico de amostras que apresentem sinais de inflamação;
- Georreferenciar os pontos de origem dos animais amostrados;
- Na possibilidade de detecção do WNV ou outra encefalomielite viral em algum animal do estudo, comunicar a Secretaria de Saúde (SES) e de Abastecimento e Agricultura (SAA) do Estado de São Paulo para que sejam tomadas as medidas cabíveis para o controle desta doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Locais de condução dos experimentos e colaboração para a investigação de arbovírus zoonóticos no Estado de São Paulo, com a formação da Rede ZooARBO SP

As avaliações e atividades laboratoriais deste projeto de pesquisa foram desenvolvidas em dois diferentes locais, no Laboratório de Virologia Molecular, localizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (LVM/FMRP/USP), responsável pelos estudos de biologia molecular, cultivo celular e isolamento viral e no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo – Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo (CP/IAL-SP), responsável pelo diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico.

Esse estudo foi responsável por formar uma rede de trabalho conjunta, batizada de Rede ZooARBO SP, a qual reuniu esforços de diferentes instituições de pesquisa e diagnóstico do Estado de São Paulo (SP). Devido ao empenho do Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde e do Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças (GAPPPS/FESIMA), a Rede ZooARBO SP foi viabilizada via Ofício CAF nº. 060/2019 (ANEXO A) tornando possível o desenvolvimento das atividades.

Parte das amostras foram encaminhadas diretamente ao LVM/FMRP/USP e parte para o CP/IAL-SP. Para o LVM/FMRP/USP foram: o Laboratório de Raiva Animal, do Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP); o Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico de São Paulo (IB/SP); o Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ/Unesp); o Serviço de Patologia de Animais Selvagens da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (SEPAS/FCAV/Unesp), o Bosque e Zoológico “Dr. Fábio de Sá Barreto” do Município de Ribeirão Preto/SP (BZM/RP), e o Instituto de Pesquisas Cananéia (IPeC), localizado no litoral sul do Estado de São Paulo (Figura 5) (ANEXOS B – G). Para o CP/IAL-SP foram: Parque Ecológico de Americana, do Município de Americana/SP; Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros", do Município de Sorocaba/SP; CETRAS Barueri, do Município de Barueri/SP; CeMaCas (CETRAS) e CETRAS São Paulo, do Município de São Paulo; CETRAS São José dos

Campos, do Município de São José dos Campos/SP; Instituto Biopesca, do Município de Praia Grande/SP e Unidades de Vigilância de Zoonoses dos Municípios de Atibaia/SP, Campinas/SP, Cotia/SP e São Bernardo do Campo/SP. O fluxo de encaminhamento das amostras a partir do local de ocorrência do agravo até as instituições parceiras e posterior envio ao LVM/FMRP/USP foi proposto e executado conforme a figura 6.

Estabeleceu-se ainda a colaboração com o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG), por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o isolamento viral e sequenciamento de amostras testadas positivas (ANEXO H).



Figura 5. Localização dos colaboradores da Rede ZooARBO SP para a vigilância e diagnóstico das arboviroses zoonóticas causadoras de encefalite. Todos os colaboradores que enviaram as amostras diretamente para o CP/IAL-SP foram representados no mapa pela logo do Instituto Adolfo Lutz. Fonte: Google Earth, 2023.

A formação dessa rede de colaboração trouxe um ganho para a arbovirologia brasileira, principalmente no nível estadual, servindo também como um projeto piloto para uma rede de colaboração em nível nacional. Importante salientar que ela trouxe

o olhar da saúde única (*One Health*) e o esforço para ampliar a investigação dos vírus zoonóticos dentro da medicina veterinária.

Em acordo à regulamentação brasileira para a realização desse projeto de pesquisa foi solicitada a autorização do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade – Ministério do Meio Ambiente - ICMBio/MMA, por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), concedida sob nº 70580 (ANEXO I) e a apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), o qual emitiu parecer de dispensa (ANEXO J).

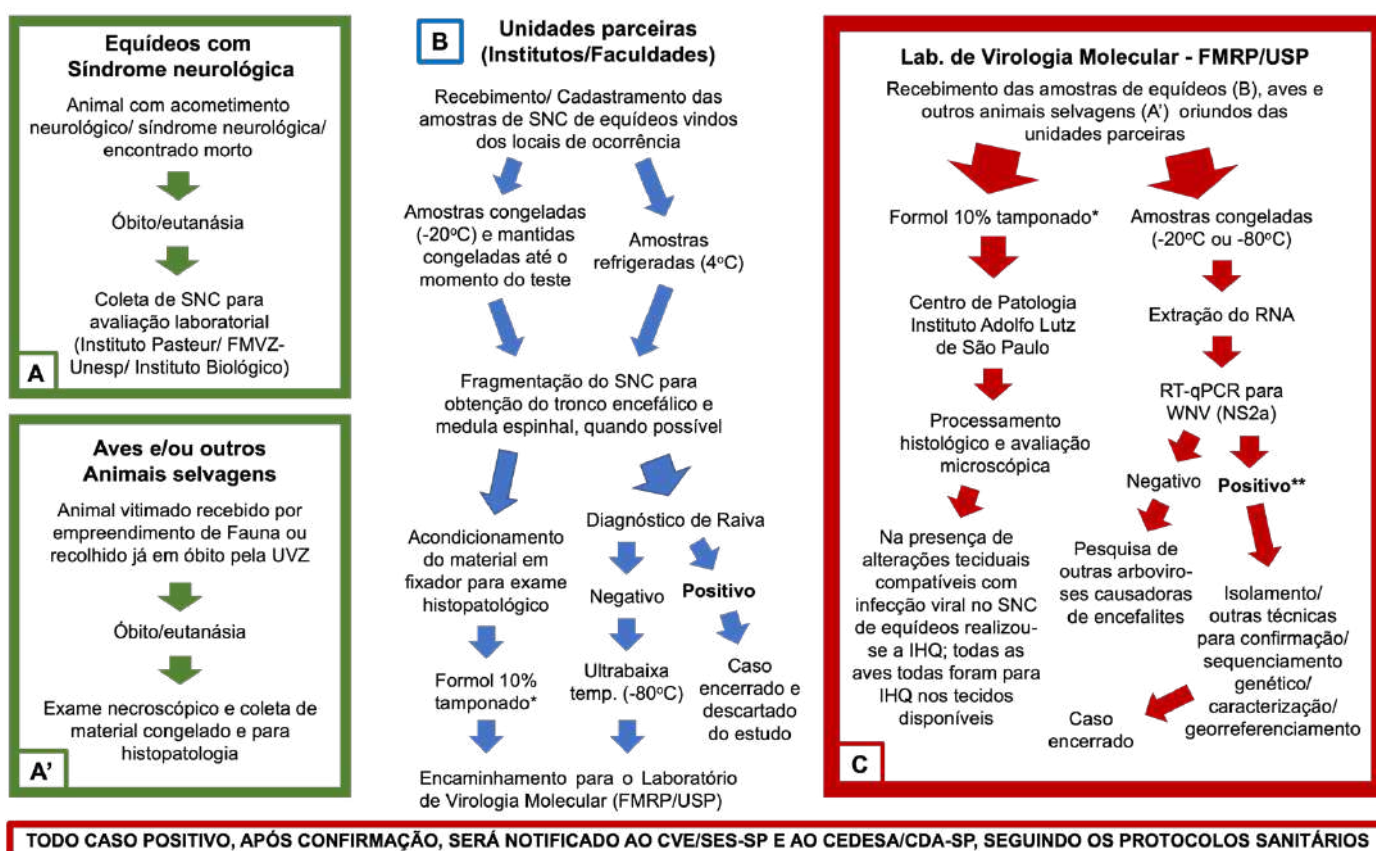


Figura 6. Modelo de fluxograma de coleta e encaminhamento das amostras até o LVM/FMRP/USP; A) Fluxo seguido a partir da ocorrência dos casos; B) Fluxo seguindo na unidade parceira; C) Fluxo de atividades realizadas a partir do recebimento das amostras no LVM/FMRP/USP; *recomenda-se que após 48 a 72h a formalina seja substituída por etanol 70%. SNC: sistema nervoso central; IHQ: imuno-histoquímica; UVZ: unidade de vigilância de zoonoses.

5.2. Caracterização das amostras

Nesse estudo foram analisadas amostras de animais selvagens (de fauna silvestre e fauna exótica) e equídeos. Majoritariamente o principal grupo amostrado, dentre os animais selvagens, foi o das aves, embora mamíferos, répteis e anfíbios

também tenham sido incluídas. Tais amostras foram provenientes de três diferentes locais, SEPAS/FCAV/Unesp, BZM/PMRP/SP e IPeC/SP. Todo animal recebido vivo e que evoluiu para óbito, independente da queixa principal foi incluído no estudo, assim como aqueles já recebidos mortos para avaliação necroscópica. Foram incluídos também animais cativos e de vida livre.

As amostras de equídeos foram provenientes de outros três locais, sendo IP/SP, IB/SP e FMVZ/Unesp, laboratórios de referência para o diagnóstico da raiva animal, os quais recebem apenas amostras de animais já em óbito com suspeita de síndrome neurológica, ou que tenha sido encontrado morto com ou sem histórico, para a investigação do vírus da raiva. Uma vez descartada a infecção pelo vírus rábico, esses animais, negativos, foram incluídos no estudo para a investigação de outros agentes virais causadores de encefalomielite transmitidos por artrópodes.

5.2.1. Histórico dos animais

A maior parte dos animais, principalmente os animais selvagens são recebidos sem nenhum histórico ou com um histórico inconsistente. Apesar disso, buscou-se compilar em planilha Microsoft Excel™ algumas informações base fornecidas pelas instituições parceiras, como: endereço, município, estado, sinais clínicos antes do óbito, data do óbito e da necrópsia, tipo material colhido, espécie, e no caso de equídeos a presença de vacinação contra as encefalomielite equinas (Leste, Oeste e Venezuelana) e raiva.

Assim, diante do caso positivo foi avaliado também o ambiente em que o animal estava inserido (urbano, rural ou silvestre), possíveis migrações (no caso das aves) ou viagens (no caso de animais domésticos ou domesticados).

5.2.2. Tipo de material coletado

A fim de padronizar-se as coletas, definiu-se dois grupos, sendo o grupo um: equídeos e mamíferos selvagens, e grupo dois: aves, répteis e anfíbios. Dessa forma, para o grupo um foi coletado, quando possível, em duplicata, os seguintes órgãos/regiões: Sistema Nervoso Central (SNC) [bulbo olfatório, córtex cerebral, cerebelo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, ponte, medula oblonga (bulbo

respiratório), medula espinhal cervical, torácica e lombar] e, além do SNC colheu-se também apenas uma única amostra de coração, fígado, baço e rim. Já para o grupo dois, as amostras foram colhidas em duplicata: cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rins; sendo intestino delgado e grosso uma única amostra; e apenas para aves: foi incluída também apenas uma amostra da bursa, proventrículo e ventrículo.

5.2.3. Coleta e armazenamento das amostras

5.2.3.1. Soro

Quando a amostra colhida foi sangue ou líquido, colheu-se, preferencialmente em tubo seco, com ou sem gel separador, de tampa vermelha ou amarela, para a obtenção do soro. As amostras de sangue foram centrifugadas a 5.000 RPM por 10 minutos para a separação completa do soro e na sequência divididas em duas alíquotas e congeladas a ultrabaixa temperatura (-80°C) até o momento da sua utilização.

5.2.3.2. Tecidos/órgãos

Os tecidos/órgãos oriundos dos equídeos foram coletados à campo ou durante a necropsia, em sua maioria por médicos veterinários autônomos ou pelo Serviço Veterinário Oficial de cada região e encaminhado para os laboratórios de referência para o diagnóstico de raiva animal diante da suspeita de alguma síndrome neurológica. O material é colhido apenas para congelamento. Após serem encaminhadas e terem o diagnóstico negativo para raiva as amostras foram disponibilizadas para esse estudo. Da mesma forma, as amostras oriundas de animais selvagens, em sua maioria vindo de animais congelados previamente, foram obtidas a partir da necropsia realizada nos centros colaboradores, e novamente coletadas apenas material congelado. Assim, cada amostra passou em média por duas etapas de congelamento antes de chegar ao nosso laboratório para o processamento.

As amostras foram separadas, em dois grupos: A) destinado a exames virológicos e B) destinado a exames anatomopatológicos, apesar do congelamento prévio. No grupo A, cada órgão/ fragmento foi acondicionado em diferentes criotubos,

e adequadamente identificados. Na sequência foram congelados, preferencialmente, em temperatura ultrabaixa (-80°C). Diante da indisponibilidade do freezer com temperatura ultrabaixa, as amostras foram mantidas congeladas temporariamente em freezer -20°C. No grupo B os órgãos foram cortados em fragmentos de 0,5 a 1,0 cm por, no máximo 2,0 cm, em seguida, acondicionados em potes com solução de formalina 4% tamponada (pH 7,4) para fixação do tecido, na proporção 1:10 (tecido:fixador). Preconizou-se que os fragmentos fossem mantidos por pelo menos 48 horas no fixador, garantindo a completa fixação do tecido e inativação de qualquer agente patogênico com potencial zoonótico. Quando possível, após a fixação, os fragmentos foram lavados com PBS 1X e transferidos para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até o momento do processamento para emblocamento em parafina.

Todos os procedimentos de coleta e armazenamento das amostras seguiram o embasamento técnico dos programas e manuais disponíveis: Manual Técnico do Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros, 2009 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (PNCRH-MAPA) (BRASIL, 2009), Cartilha Técnica do Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (PNEEB-MAPA) (BRASIL, 2015), Manual de Procedimentos para Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos, 2003 (PNEEB-MAPA) (BARROS, 2003), e Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras, 2010 – (MAPA/PAHO/OPAS) (PANAFTOSA/OPAS, 2010).

5.3. Diagnóstico molecular (RT-qPCR e nested-PCR)

As análises foram realizadas a partir do RNA extraído das amostras obtidas diretamente dos tecidos/órgãos colhidos dos animais conforme a descrição dos casos de interesse.

Embora não seja recomendado o processamento de amostras em estado de decomposição, pela baixa chance de recuperação, já foi relatada a recuperação antigênica para o vírus da raiva em até 144h *post-mortem* (ALBAS *et al.*, 1999). Portanto, todas as amostras colhidas foram incluídas no estudo, independente do estado de conservação.

5.3.1. Extração do RNA total a partir de amostras de tecido

A extração do RNA total ou RNA viral a partir de tecidos foi realizada de acordo com a disponibilidade do kit e do tipo de amostra a ser extraída. Foi empregada a extração de RNA por Tiocianato de Guanadina:Fenol (TRI Reagent® - Sigma-Aldrich®), conforme protocolo (KIM et al., 2014) descrito abaixo, otimizado no laboratório; adicionalmente também foi empregada a extração do RNA pelo kit comercial RNeasy Mini Kit (Cat n°/ID: 74106 – Qiagen®) e na disponibilidade do material parafinado, o RNA foi extraído utilizando o kit comercial Bio Gene Extração de DNA/RNA viral (Cat. n° K204 – Bioclin-QUIBASA), conforme recomendações do fabricante descritas na sequência. A maior parte das amostras foram extraídas com o kit de comercial da Qiagen®.

5.3.1.1. TRI Reagent® (Sigma-Aldrich®)

Utilizou-se 800 µL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) para 50 - 80 mg de amostra. A mistura foi macerada com o auxílio de um pistilo (Corning®) em microtubos de 1,5 mL e agitado em vórtex. Na sequência as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente; e foi adicionado 200 µL de clorofórmio. As amostras foram agitadas novamente em vórtex, e após terem sido incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente foram centrifugadas a 12.000 x g, 4°C, por 15 minutos. Uma vez separadas as fases, a fase aquosa foi transferida cuidadosamente para um novo tubo com 500 µL de isopropanol. A amostra foi homogeneizada em vórtex e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g, 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o *pellet* (RNA precipitado) foi submetido à duas lavagens com etanol 75%. Após adicionar o etanol, homogeneizou-se e repetiu-se a centrifugação a 12.000 x g, 4°C, por 15 minutos. Depois da última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto com a tampa para baixo para que todo o etanol evaporasse, por cerca de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Uma vez seco, o RNA foi eluído em 50 µL de água ultrapura e então congelado em ultrabaixa temperatura até o momento do uso. A avaliação da

quantidade e da qualidade do RNA foi realizada por meio da mensuração da absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm por meio do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

5.3.1.2. RNeasy Mini Kit (Qiagen®)

Utilizou-se de 600 – 700 µL do *buffer* de lise (RLT) para 30 - 50 mg de tecido. A mistura foi macerada com o auxílio de um pistilo (Corning®) para microtubos de 1,5 mL e agitado em vórtex. O lisado foi centrifugado em rotação $\geq 12000 \times g$ por 3 minutos para que os possíveis fragmentos fossem para o fundo. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo com volume equivalente (v/v) de etanol a 70% e misturou-se rapidamente em vórtex. Desse volume, 650 µL da amostra foi transferida, incluindo qualquer precipitado, para a coluna RNeasy Mini colocada em um tubo de coleta de 2 mL. O tubo foi centrifugado por 1 minuto e 30 segundos em rotação $\geq 8000 \times g$. Devido à grande quantidade de material, por vezes, após a centrifugação parte do volume ficava retido na membrana da coluna, portanto uma nova centrifugação com maior velocidade era realizada nesses casos. Na sequência repetiu-se essa etapa, passando o restante do volume. Após ter passado todo o conteúdo iniciou-se as lavagens, adicionando-se 650 µL de *buffer* RW1 à coluna RNeasy spin. Centrifugou-se a $\geq 8000 \times g$, por 60 segundos. Foram realizadas duas lavagens com 500 µL cada de *buffer* RPE, centrifugando-se a $\geq 8000 \times g$, por 60 segundos. A segunda lavagem foi centrifugada a $\geq 8000 \times g$, por 3 minutos. Trocou-se o tubo coletor e realizou-se outra centrifugação em velocidade máxima por 3 minutos para secar a membrana. Finalizada a centrifugação transferiu-se a coluna RNeasy spin para um novo tubo de coleta de 1,5 mL já identificado. Adicionou-se 60 µL de água livre de RNase diretamente à membrana da coluna giratória. Esperou-se 5 minutos para que a maior quantidade de material fosse liberada da membrana e centrifugou-se a $\geq 8000 \times g$, por 3 minutos para que o RNA fosse eluído. Uma vez finalizada essa etapa o RNA foi quantificado e avaliado com relação a sua qualidade via NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer). Em seguida, o RNA foi congelado em temperatura ultrabaixa até o momento de ser utilizado.

5.3.1.3. Preparo do material parafinado e extração de RNA Viral Bio Gene Kit (Bioclin-QUIBASA)

O protocolo de preparo da amostra parafinada para extração foi padronizado pelo CP/IAL-SP, conforme descrito: para obter o material a partir do bloco parafinado, este foi desgastado e os cortes/fragmentos foram colocados em um microtubo de 1,5 mL. Na sequência adicionou-se 1000 µL de xilol a cada microtubo. O microtubo foi centrifugado em velocidade máxima por 5 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta e adicionou-se 1000 µL de etanol absoluto para biologia molecular ao sedimento formado, para que o xilol fosse. O material foi centrifugado em velocidade máxima durante 5 minutos à temperatura ambiente. Feito isso, remove-se o etanol, cuidando para que o *pellet* seja mantido. Repetiu-se essa etapa, com 1000 µL de etanol e uma nova centrifugação por 3 minutos. O etanol foi removido e realizou-se uma nova centrifugação por 2 minutos a velocidade máxima. Ao final, o etanol residual foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Finalizada as etapas de lavagens, o microtubo foi colocado no termobloco a 37°C por 20 minutos, até que o etanol evaporasse por completo, secando o material. Após seco, o material foi suspenso em 150 µL de tampão de lise *in house*, sendo homogeneizado com o auxílio de uma ponteira. Na sequência adicionou-se 15 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e ficou à 55°C no termobloco com agitação a 650 rpm *overnight*. Após o preparo da amostra parafinada foi realizada a extração por meio do kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin-QuiBasa), seguindo as instruções do fabricante. Ao final o RNA foi armazenado em temperatura ultrabaixa até o momento da sua utilização.

5.3.2. RT-PCR em tempo real

As RT-qPCRs para todos os vírus foram realizadas conforme orientação do fabricante GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR, n. A6120/A6120X/A6121 (Promega Corporation, Madison, USA). Foram utilizados dois aparelhos para executar as reações em tempo real, sendo o Mastercycler® ep realplex (Eppendorf®) e o ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). As reações foram executadas majoritariamente no aparelho ABI 7500 Fast Real-Time PCR

System (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). Na primeira etapa (pré-PCR), a reação de transcrição reversa do RNA (síntese do cDNA) foi feita a 45°C por 15 minutos, seguida pela inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase a 95°C por dois minutos. Em seguida, foram feitos 45 ciclos de 95°C por 3 segundos para a desnaturação das fitas de cDNA, e 60°C por 30 segundos para o anelamento dos primers e extensão das fitas de DNA no modo FAST ou 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, e 60°C por 1 minuto no modo STANDARD. A partir da fluorescência emitida pela sonda FAM ou VIC (HEX), o aparelho realizou a quantificação detectando a intensidade da emissão. A realização de 45 ciclos buscou maximizar a detecção do genoma viral.

Os resultados foram analisados nos respectivos softwares dos aparelhos, o realplex 2.2 (Eppendorf®) e o 7500 Software v. 2.0.1 (Applied Biosystems®, Foster City, EUA), tendo como base o valor de CT (*cycle threshold*), que corresponde ao número de ciclos em que é atingido o limiar da detecção da fluorescência emitida pelo fluoróforo liberado da sonda durante a reação de PCR em tempo real.

5.3.2.1. Vírus da febre do Nilo Ocidental (WNV)

Para a detecção do genoma do WNV foi utilizado o protocolo orientado pelo Manual Terrestre da OIE (*Office International des Epizooties* - Organização Mundial de Saúde Animal, 2018). A técnica recomendada é uma adaptação do método desenvolvido por Eiden *et al.* (2010) para a identificação das linhagens 1 e 2 do WNV. O conjunto de *primers* (*Forward primer*: GGG-CCT-TCT-GGT-CGT-GTT-C; *Reverse primer*: GAT-CTT-GGC-YGT-CCA-CCT-C) e sonda (FAM-CCA-CCC-AGG-AGG-TCC-TTC-GCA-A-BHQ1) tem como referência a região de NS2a do genoma viral.

A reação de amplificação foi realizada utilizando 3 µL de RNA, 5 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP (Promega Corporation, Madison, USA), 0,2 µL do reagente GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 0,5 µL de cada oligonucleotídeos, *forward* e *reverse* (10 pmol), 0,250 µL da sonda (10pmol), e 0,55 µL de água para completar o volume final de 10µL.

5.3.2.2. *Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)*

A detecção do genoma do SLEV seguiu o protocolo descrito por Lanciotti e Kerst (2001), com modificação no *reporter* da *probe*. O conjunto de *primers* (*Forward primer* SLE834: GAA-AAC-TGG-GTT-CTG-CGC-A; *Reverse primer* SLE905c: GTT-GCT-GCC-TAG-CAT-CCA-TCC) e *Probe* SLE857 (HEX-TGG-ATA-TGC-CCT-AGT-TGC-GCT-GGC-BHQ1) tem como referência a região estrutural da glicoproteína M do genoma viral.

A reação de amplificação foi realizada utilizando 3 µL de RNA, 5 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP (Promega Corporation, Madison, USA), 0,2 µL do reagente GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 0,5 µL de cada oligonucleotídeos, *forward* e *reverse* (10 pmol), 0,5 µL da sonda (10pmol), e 0,3 µL de água para completar o volume final de 10µL.

5.3.2.3. Duplex para WNV e SLEV

Com o objetivo de otimizar o diagnóstico de duas enfermidades, cuja apresentação clínica é semelhante, padronizou-se uma reação duplex para a detecção dos genomas de ambos os vírus, WNV e SLEV, reduzindo o tempo de detecção, assim como a utilização de reagentes. Para isso, foi utilizada uma curva padrão contendo o RNA extraído dos estoques obtidos a partir do cultivo celular de cada vírus e que foram previamente titulados pela técnica de PFU (*Plaque Forming Units*). Para a obtenção da curva foram feitas diluições de 10^4 (10.000 cópias teóricas de RNA) até 10^{-1} (zero cópias teóricas de RNA) (Figura 7).

Verificou-se, portanto, que a sensibilidade era elevada, sendo possível a detecção de até uma única cópia teórica de RNA, permitindo a detecção de quantidades mínimas de RNA quando presentes nas amostras estudadas.

A reação de amplificação foi realizada utilizando 2 µL de RNA, 5 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP (Promega Corporation, Madison, USA), 0,2 µL do reagente GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 0,5 µL de cada oligonucleotídeos, *forward* e *reverse* (10 pmol) e 0,250 µL da sonda (10pmol) para WNV, 0,5 µL dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (10 pmol) e 0,5 µL da sonda (10pmol) para SLEV, e 0,05 µL de água para completar o volume final de 10µL.

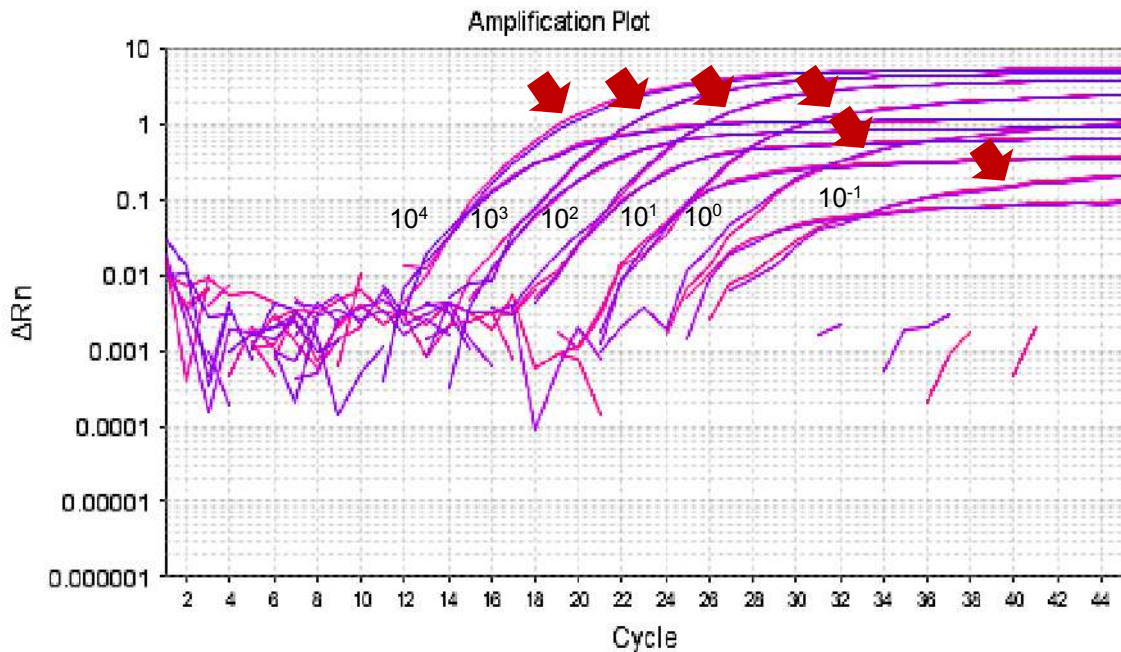


Figura 7. Curva padrão de amplificação da RT-qPCR duplex - WNV e SLEV, feitas em duplicatas. Setas vermelhas indicam as curvas de amplificação para WNV e as curvas sem setas para SLEV.

5.3.2.4. Detecção de vírus do gênero Flavivírus

A fim de ampliar a capacidade de detecção de espécies virais que podem estar infectando animais selvagens e domésticos, até o momento não descritas, optou-se por realizar o protocolo de RT-qPCR PAN-Flavi (PATEL *et al.*, 2013) que mostrou bons resultados para a detecção de outros arbovírus de menor frequência de detecção no país (CUNHA *et al.*, 2020).

O conjunto de *primers* utilizados foram: *Forward primer* Flavi all S (TACAACATgATggggAARAgAgARAA); *Reverse primer* Flavi all AS 2 (gTgTCCCAgCCNgCKgTgTCATCWgC) e *Probe LNA* Flavi all probe 3 mix (FAM-Tg+gTWYATgT+ggYTNg+gRgC—BBQ). Para o design dos conjuntos foi utilizada como referência uma região da proteína não estrutural 5 (NS5) do genoma viral.

A reação de amplificação foi realizada utilizando 3 µL de RNA, 5 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP (Promega Corporation, Madison, USA), 0,2 µL do reagente GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 0,5 µL de cada oligonucleotídeos, *forward* e *reverse* (10 pmol), 0,5 µL da sonda (10pmol), e 0,3 µL de água para completar o volume final de 10µL.

5.3.2.5. Detecção de vírus do gênero Alphavírus

Seguindo o mesmo objetivo, para ampliar a detecção de outras espécies virais que tem seus ciclos epidemiológicos envolvendo aves e outros animais selvagens, e acometendo equídeos, optou-se por realizar o diagnóstico diferencial para alguns vírus do gênero Alphavírus pela RT-qPCR (GIRY *et al.*, 2017).

O conjunto de *primers* que apresentaram melhor performance foram: *Forward primer* F2A (ATGATGAARTCIGGIATGTTYTT); *Reverse primer* R2A (ATYTTIACTTCCATGTTTCATCCA), R3A (ATYTTIACTTCCATRITTCARCCA) e R4A (ATYTTIACTTCCATGTTGACCCA); e *Probe* LNA P2 (FAM-AT+GTT+GTC+GT+CIC+CIAT-BHQ1). Para o design dos conjuntos foi utilizada como referência uma região da proteína não estrutural 4 (nsP4) do genoma viral.

A reação de amplificação foi realizada utilizando 3 µL de RNA, 5 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP (Promega Corporation, Madison, USA) e 0,2 µL do reagente GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR. Todos os oligonucleotídeos e sonda foram utilizados na concentração de 10 pmol, portanto: 0,5 µL do oligonucleotídeo F2A, 0,25 µL de cada oligonucleotídeo *reverse* (R2A, R3A e R4A), 0,3 µL da sonda, e 0,25 µL de água para completar o volume final de 10µL.

5.3.2.6. Avaliação da detecção do genoma viral

A positividade para WNV das amostras foi avaliada conforme orientação do Manual Terrestre da OIE (2018). Valores de Ct 37 ou menor foram considerados positivos; valores de Ct 37.1 até 42 foram considerados suspeitos; e valores acima do Ct 42 foram considerados negativos (OIE, 2018). Como não existe uma recomendação oficial para SLEV e para os demais conjuntos PAN, seguiu-se os mesmos padrões de avaliação.

5.3.3. PCR convencional e nested-PCR para o WNV

Embora o Manual Terrestre da OIE (2018) recomende a utilização da PCR convencional, seguida da nested-PCR, preferencialmente, em amostras do SNC de mamíferos, ambas as técnicas detectam apenas a linhagem 1 do WNV (JOHNSON *et*

al., 2001). Dessa maneira, após a verificação da sensibilidade do conjunto de primers para tempo real e a sua capacidade de detectar as linhagens 1 e 2, optou-se por utilizá-la preferencialmente. Assim, a PCR seguida da nested-PCR foi utilizada apenas em casos suspeitos, com Ct de 37.1 a 42.

A primeira reação, a RT-PCR *one-step* foi realizada com o conjunto *outer primers*: 1401F: ACC-AAC-TAC-TGT-GGA-GTC e 1845R: TTC-CAT-CTT-CAC-TCT-ACA-CT. Já a nested-PCR foi realizada com o conjunto *nested primers*: 1485F: GCC-TTC-ATA-CAC-ACT-AAA-G e 1732R: CCA-ATG-CTA-TCA-CAG-ACT. Para a amplificação, as reações foram realizadas em termociclador Veriti™ PCR (Applied Biosystems®), sendo realizados 35 ciclos em ambas as etapas (convencional e nested).

Os produtos da PCR e o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder Plus (NEB3231) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizadas sob luz UV em equipamento de foto documentação (GEL DOC XR – BioRad). O tamanho da banda esperada para amostras WNV-positivas é de 445 pb (*outer primer*) e/ou pela banda de 248 pb (*nested primer*) (OIE, 2018).

5.4. Isolamento viral

5.4.1. Cultivo celular VERO e C6/36

As amostras positivas na PCR convencional, nested-PCR e/ou RT-qPCR (Ct < 42) foram direcionadas para o isolamento viral em cultivo celular [linhagens de *Aedes albopictus* (clone C6/36 CRL 1660) e de *African green monkey kidney* (VERO; BCRJ 0245; ATCC CCL81)], descrito por Martins *et al.* (2019) e Siconelli *et al.* (2021). As amostras foram descongeladas em gelo e fragmentadas, obtendo-se de 0,03 a 0,05 gramas de material. Estes fragmentos de tecido foram macerados manualmente com o pistilo em microtubos de 1,5 mL (Corning®). A maceração foi feita em três etapas, sendo: 1) maceração a seco; 2) adicionou-se 100 µL de Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM - Hyclone™) para células VERO, suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS) e 2% de antibiótico/antimicótico (200 U/mL de penicilina; 200 µg/mL de estreptomicina; e 2,5 µg/mL de anfotericina - Cultilab™). Para o isolamento em células C6/36 substituiu-se o DMEM por Meio Leibovitz L15 (Cultilab™) e adicionou-

se ainda 2% de triptose. Macerou-se novamente; e 3) adicionou-se mais 200 µL e macerou-se novamente. Por fim adicionou-se 700 µL de meio suplementado no tubo e homogeneizou-se o conteúdo em vórtex. O tubo foi resfriado em gelo por 5 minutos e clarificado a 16.000 g por 10 minutos a 4°C. Embora possa ser filtrado, o sobrenadante foi inoculado diretamente em células VERO e C6/36, preparadas no dia anterior em garrafas T25, por 1h para adsorção. O *pellet* restante foi armazenado para posterior extração de RNA. Finalizada essa etapa foi adicionado o meio de manutenção (VERO: 2% SFB; C6/36: 2%SFB + 2% triptose) para cada linhagem celular e foram incubadas a 37°C (VERO) e 28°C (C6/36). Acompanhou-se durante 5-6 dias, até verificar efeito citopático (ECP) nas células VERO, sugerindo o sucesso do isolamento. Fez-se uma segunda a inoculação em ambas as células para aumentar o título do vírus isolado. Na ausência do ECP, como foi verificado nas células de inseto, realizou-se três passagens “cegas”. O sobrenadante de todas as passagens foi aliquotado e uma das alíquotas foi separada para posterior extração do RNA e RT-qPCR para confirmação. Após a realização RT-qPCR pode-se confirmar o isolamento viral em ambos os tipos celulares.

5.4.2. Imunofluorescência indireta

A confirmação do isolamento viral foi feita pela técnica de imunofluorescência indireta, a partir das células do isolado, utilizando anticorpos específicos anti-WNV.

5.4.3. Preparo da lâmina

Após o sobrenadante ter sido recolhido, foram feitas de 2 a 3 lavagens com 1 mL de PBS 1X. Essas células, juntamente com o “mock” (controle negativo - DMEM - Hyclone™), foram tripsinizadas com 500 µL de Tripsina (TrypLE™ Select 1X, GIBCO®) e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5% até que o tapete celular estivesse completamente solto, cerca de 5 minutos. Na sequência inativou-se a tripsina com o meio de cultivo adicionado com 10% de SFB. Após, transferiu-se o todo o conteúdo para um novo tubo e centrifugou-se a 1000 rpm à 4°C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se volume igual de PBS 1X, cuidando para que o pellet fosse desfeito de forma gentil. Repetiu-se a etapa de lavagens por três vezes.

Finalizada a última lavagem diluiu-se o pellet em um volume desejado de acordo com a quantidade de células existentes, cuidando para que não ficasse concentrado e que as células ficassem sobrepostas. Após a diluição, adicionou-se 20 µL do volume em cada “spot” da lâmina para imunofluorescência, predefinido de fábrica. Deixou-se secar naturalmente por aproximadamente 30 minutos e após secas as lâminas foram mergulhadas em acetona gelada a -20°C entre 20 minutos e 24 horas. As lâminas que não foram utilizadas na sequência foram secas e guardadas em freezer -20°C ou -80°C, protegidas da luz.

5.4.4. Imunofluorescência indireta para WNV

As lâminas foram retiradas do armazenamento e secas em temperatura ambiente. Para dar início ao ensaio foi adicionado 20 µL da solução de bloqueio (5% ou 1:20 - soro de cavalo:PBS 1X) nas lâminas por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Passado esse tempo, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS 1X. Na sequência, com a lâmina ainda úmida adicionou-se 15 µL do anticorpo primário na concentração 1:30, diluído numa solução de bloqueio a 3% (soro de cavalo diluído em PBS 1X), por 1 hora a 37°C em câmara úmida. O anticorpo primário, anti-WNV, foi preparado no laboratório a partir da imunização de camundongo Swiss (soro hiperimune) utilizando a cepa viral referência NY99. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS 1X, retirando-se o excesso e 15 µL do anticorpo secundário anti-*mouse* FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Sigma Immuno Chemicals – F2012) foi adicionado numa concentração de 1:150, diluído na mesma solução de bloqueio a 3%, por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. A partir dessa etapa as lâminas foram protegidas da luz. Após esse período, as células foram lavadas novamente e foi adicionado o corante nuclear DAPI 4',6'-diamino-2-fenil-indol (Sigma-Aldrich®) na concentração de 1:1000 a 37°C em câmara úmida. Após 10 minutos, as células foram lavadas novamente com PBX 1X, retirou-se o excesso e adicionou-se 3 gotas do meio de montagem (Fluoromount-G™ Mounting Medium, Thermo Fischer) e colocou-se a lamínula. Finalizada essa etapa as lâminas foram guardadas em geladeira, protegidas da luz e analisadas no dia seguinte no microscópio de imunofluorescência Olympus BX40, sendo realizados registros fotográficos.

5.5. Sequenciamento genético

5.5.1. Sequenciamento Sanger para WNV

Após confirmação do isolado, a partir do RNA obteve o cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™) e então fez-se a PCR (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, NEW ENGLAND BioLabs®) para a obtenção de aproximadamente 1000 pb, utilizando os primers para a detecção do genoma na região de proteína estrutural E. Os primers utilizados foram WNV_Seq_Forward: CTA-AGA-AAC-CAG-GAG-GGC e WNV_Seq_Reverse: CCC-AGC-CCC-TGT-CCA-CCA-CT. A Temperatura de anelamento utilizada foi de 55°C. Diante do fragmento gerado, preparou-se a reação de sequenciamento conforme a recomendação do kit ABI Prism BigDye® Terminator™ v.3.1 Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, USA) e purificada pelo protocolo Isopropanol-Etanol, já padronizado em laboratório. A separação eletroforética e a coleta de dados foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 sequencer Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

5.5.2. NGS (*New Generation Sequence*)

Após o sequenciamento via Sanger o RNA do isolado foi encaminhado para o Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica (LMSeq), do Departamento de Tecnologia, da FCAV/Unesp, campus de Jaboticabal. A plataforma de sequenciamento utilizada foi Illumina MiSeq para a obtenção de 1 milhão de reads.

5.5.3. Análise do sequenciamento e bioinformática

5.5.3.1. Montagem do consenso - Sanger

As sequências de nucleotídeos obtidas foram montadas com o auxílio do programa Bioedit v.7.1.3.0., utilizando sequências referência obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

5.5.3.2. Montagem do consenso - NGS

A partir das sequências geradas pelo MiSeq, e das sequências referências disponíveis no GenBank, procedeu-se a análise *de novo* utilizando um pipeline orientado para vírus. Os softwares utilizados na análise foram: FastQC versão 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), Trimmomatic versão 0.3.9 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) e AfterQC versão 0.9.7 (<https://github.com/OpenGene/AfterQC>). A montagem do vírus foi realizada com base em uma sequência padrão da cepa NY99 (GenBank accession: MH643887).

5.5.3.3. Análise bioinformática

Para as análises e comparações, independente do tipo de sequenciamento, o alinhamento foi feito via software MAFFT versão 7.0, utilizando um conjunto de dados obtido no NCBI e ViPR (<https://www.viprbrc.org>). Além desse programa, o software “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA) v.7 (TAMURA *et al.*, 2011), foi utilizado.

A reconstrução filogenética foi prioritariamente feita com ORFs completas. O software IQ-TREE 2.0 (<http://www.iqtree.org>) foi utilizado para gerar a árvore de máxima verossimilhança (*Maximum-Likelihood*). A edição gráfica foi feita pelo software iTOL v.5 (<https://itol.embl.de>).

5.6. Histopatologia e Imuno-histoquímica

5.6.1. Processamento histológico e histopatologia

Após obter os fragmentos do SNC, as amostras foram fixadas em formalina tamponada 4% (pH 7,4) por pelo menos 48h, sendo em alguns casos ultrapassados esse tempo. Na sequência foram processadas no histotécnico, conforme padronizado pelo CP/IAL-SP, onde foi realizada a desidratação pelos banhos de álcoois, a diafanização pelos banhos de xilol e a impregnação de parafina pelos banhos de parafina líquida. Em seguida realizou o emblocamento do material em parafina. Os blocos gerados foram cortados em micrótomo rotativo, produzindo cortes com

espessura de 3 a 5 μm , depositados em lâminas de vidro silanizadas, sendo uma destinada à histopatologia para coloração pelas técnicas histoquímicas de Hematoxilina e Eosina (H&E) e a outra submetida a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o agente do estudo. As lâminas foram avaliadas pelas médicas veterinárias patologistas Dra. Juliana Mariotti Guerra e Dra. Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes em microscopia óptica convencional (microscópio Nikon E200), nos aumentos de 10X, 40X e 100X, sendo descrita a presença ou ausência de infiltrado inflamatório. Os resultados foram indexados em planilhas elaboradas por meio de Microsoft Excel™.

5.6.2. Imuno-histoquímica

Para os testes de padronização da IHQ de WNV foi utilizado um emblocado celular parafinado proveniente de cultura de células de linhagem celular VERO infectada com o vírus e preparado de acordo com protocolo fornecido do Centers for Disease Control and Prevention - CDC, Atlanta - USA (não publicado) e Araujo *et al.* (2019). Para a técnica, foram confeccionados cortes histológicos de 3 μm de espessura aderidos a lâminas silanizadas e desparafinizadas em xilol a 70°C por 20 minutos. Procedeu-se uma segunda desparafinação em xilol a temperatura ambiente por 5 minutos, seguidos da hidratação. Para hidratação foi feita a seguinte bateria: três baterias de etanol absoluto (I, II e III) sendo deixado por 5 minutos em cada; seguido por 95% e 80%, por 5 minutos em cada. Lavou-se em água corrente por 2 minutos e em água destilada por 1 minuto. A recuperação antigênica se deu pelo calor úmido em panela de pressão (PP) com solução de ácido cítrico 10 mM/ pH 6,0 a 120°C por 3 minutos (após a pressão ter iniciado), portanto, 4,2 g para 2L de água destilada. Após esfriar, as lâminas foram mergulhadas em água destilada por 1 minuto. A peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 6% (20 volumes) a 37°C, por 45 minutos. Passado esse período as lâminas foram lavadas por 2 minutos em água corrente, e 1 minuto em água destilada. A fim de retirar qualquer contaminante realizou-se três banhos, realizando movimentos verticais nas lâminas por 100 vezes, em solução PBS 1X acrescida de Tween® 20 a 0,5%. A seguir, realizou-se a incubação overnight (12 a 18 horas) a 4°C com o anticorpo primário em câmara úmida. No dia seguinte realizou-se três lavagens em solução PBS 1X

acrescida de Tween[®] 20 a 0,5%, mexendo-se por 100 vezes. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário específico (anti-camundongo ou anti-coelho) (MACH4[™] Kit polímero AP universal; Biocare; CA, USA) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, seguido de três lavagens em solução PBS 1X acrescida de Tween[®] 20 a 0,5%. Após aplicou-se o micropolímero conjugado com a enzima fosfatase alcalina (amplificador do sinal) (MACH4[™] Kit polímero AP universal; Biocare; CA, USA) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, seguido de três lavagens em solução PBS 1X acrescida de Tween[®] 20 a 0,5%. Na sequência realizou-se a revelação com o kit substrato cromógeno fosfatase alcalina (Fast Red e Naftol Fosfato) (Warp Red; Biocare, CA, USA) por 7 minutos a 37°C, em câmara úmida. Lavou-se por 5 minutos em água corrente e 1 minuto em água destilada. Finalizada essa etapa procedeu-se a contra coloração (leve) com a hematoxilina de Harris por 30 segundos. Lavagens em água corrente e destilada foram realizadas como descrito anteriormente e seguido da lavagem com água amoniacal (NH₄OH) por 10 segundos. Por fim realizou-se outra lavagem em água corrente e água destilada. Para melhor qualidade da lâmina realizou-se a desidratação e clarificação em xilol à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Ao fim do processo fez-se a montagem com lâmina e lamínula e meio de montagem aquoso (Aqua-Mount[®] - Thermo Scientific) para posterior leitura em microscópio óptico de campo claro.

5.6.2.1. Anticorpos primários específicos anti-WNV

- anticorpo anti-WNV (Policlonal de camundongo proveniente do Instituto Evandro Chagas de Belém/PA) diluição 1:2500 feito em solução de albumina bovina a 1% + azida sódica a 0,1% em PBS;
- anticorpo anti-WNV M glycoprotein (Policlonal de coelho comercial ABCAM código: ab22070) diluição 1:1000 feito em solução de albumina bovina a 1% + azida sódica a 0,1% em PBS.

5.6.2.2. Controles, positivos e negativos, utilizados durante os ensaios

O controle positivo das reações foi realizado partir do emblocado celular proveniente de cultura de células infectadas com o vírus alvo, no caso WNV (cepa

NY99). Posteriormente foi feito o emblocamento seguindo o protocolo do Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta) e de Araujo *et al.* (2019), portanto, utilizou-se o mesmo protocolo da padronização. As condições de ensaio do anticorpo foram as mesmas previamente descritas, exceto para o controle negativo, para o qual se aplicou soro homólogo não imunizado da mesma espécie do anticorpo primário, sendo efetuada igualmente as demais etapas da reação.

5.7. Padronização do PRNT (*Plaque Reduction Neutralizing Test*) para WNV

Para a padronização adaptou-se o protocolo descrito por Friedrich e Beasley (2016). A detecção de anticorpos neutralizantes anti-WNV foi feita a partir de amostras de cavalos, obtidos de uma soroteca de animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/Unesp, e de camundongos que foram previamente infectados no laboratório com a cepa viral padrão do WNV NY99.

Uma alíquota de cada amostra, 12µL, foi inativada a 56°C por 30 a 45 minutos e, em seguida, iniciou-se a diluição seriada (em DMEM com antibiótico, antimicótico e sem SFB). Iniciou-se pela diluição 1:10, fez-se as diluições em série, utilizando fator 2, finalizando-se na diluição 1:5.120, totalizando 10 diluições. Para isso foi colocado 108 µL de meio para a diluição 1:10 e 60 µL para as demais. Assim ao final de cada diluição o volume final foi de 60 µL. Junto à diluição das amostras foi adicionado um controle do vírus (DMEM e vírus), um controle negativo na diluição 1:10 (uma amostra conhecidamente negativa para a presença de anticorpos anti-WNV, que também foi inativada a 56°C), e uma amostra sabidamente positiva, soro hiperimune confeccionado a partir da infecção em um camundongo Swiss com a cepa viral padrão NY99. Prontas a diluições e os controles, adicionou-se uma quantidade fixa de 60µL, contendo 40-70 PFU/tubo do WNV (NY99), e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após essa etapa, 100µL de cada diluição foi adicionada nos poços de uma placa de 12 poços, plaqueadas no dia anterior, com cerca de 8×10^5 células de *African green monkey kidney* (VERO; BCRJ 0245; ATCC CCL81)], de baixa passagem, por poço, e incubadas por 1 hora a 37°C, com agitação contínua leve, para a adsorção viral. Nessa etapa para garantir que os poços não secassem adicionou-se mais 100µL de DMEM sem SFB em cada poço. Após essa etapa, o inóculo foi retirado e 1,5 mL de *overlay*

(meio semi-sólido constituído de CMC 1,5% e meio DMEM suplementado com 2% de antibiótico/antimicótico e 2% de SFB) foi adicionado a cada poço da placa. A placa foi mantida em estufa com 5% de CO₂ a 37°C até que fosse possível a visualização adequada das placas, o que em média leva de 48 a 72 horas. Após esse período, revelou-se a placa; para isso adicionou-se uma solução de formol a 10% tamponado, em quantidade equivalente ao volume de *overlay* (1:1) para que as células fossem fixadas. Deixou-se em agitação leve por 1 a 2 horas. Na sequência, verteu-se a placa a fim de remover todo o conteúdo e adicionou-se formol para lavar os poços e retirar debris celulares. Deixou-se em agitação por 1 hora. Repetiu-se essa etapa de lavagem por três vezes. Após as lavagens com formol, adicionou-se a solução de cristal violeta 1%, deixando em contato com as células por mais 1 a 3 horas, em agitação leve. Uma vez coradas, lavou-se em água corrente, para retirar o cristal violeta, e em seguida colocou-se para secar. Após secas, as placas puderam ser visualizadas e contadas manualmente com o auxílio de um transiluminador de luz branca (Figura 8).

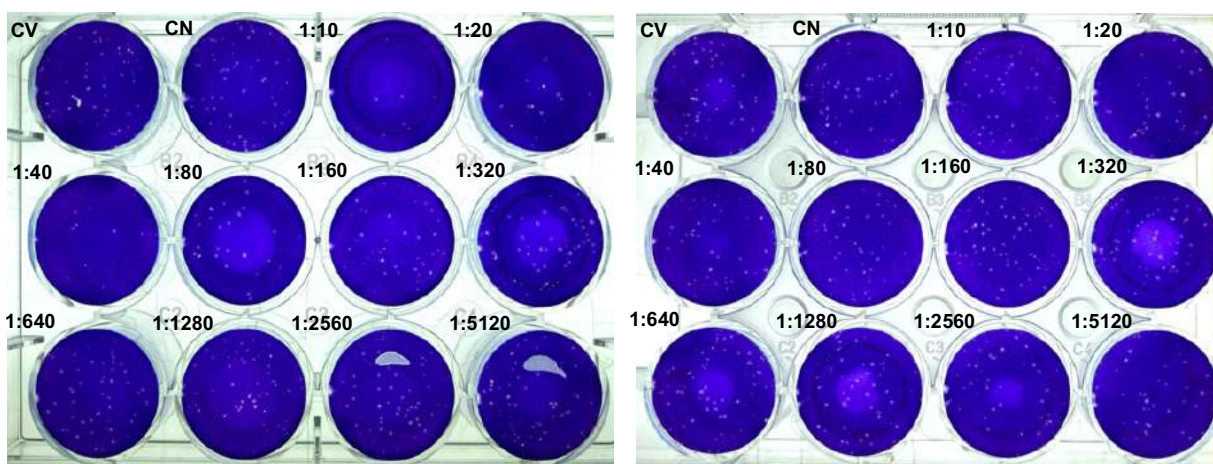


Figura 8. À esquerda placa com amostra de soro de camundongo infectado com WNV, considerado positivo, com redução de placas até a diluição 1:80; a direita amostra de um equino, considerado negativo. PRNT com diluições de 1:10 até 1:5120. Incubação de 48h e coloração com cristal violeta 1%. Área roxa: tapete celular integro, sem efeito citopático; Pontos brancos/transparentes: efeito citopático (plagues), causado pela infecção viral. CV: controle de vírus; CN: controle negativo (amostra isenta de anticorpos anti-WNV, diluída 1:10).

Foi realizado a triagem a partir do PRNT₅₀, e as positivas foram submetidas ao cálculo do PRNT₈₀ (FRIEDRICH; BEASLEY, 2016). Em ambos os casos foram consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes maiores ou iguais a 10 (GUIMARÃES *et al.*, 2022).

5.8. Mapeamento das áreas de origem dos animais amostrados

O mapeamento do local exato, do município ou da região de origem dos animais amostrados, independente do resultado obtidos pelas técnicas descritas, foi realizado com auxílio do Google Earth Pro (versão 7.3.6.9345).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Distribuição e frequência dos animais amostrados

Durante os anos de 2017 a 2022 foram recolhidas 1140 amostras (Quadro 1) de diferentes animais, incluindo animais selvagens (répteis, aves e mamíferos) e equídeos, do Estado de São Paulo. Além disso, pela divulgação do nosso estudo, recebemos amostras de outras localidades do Brasil.

Quadro 1. Animais estudados entre os anos de 2017 e 2022, triadas e avaliadas conforme cada instituição da Rede ZooARBO SP.

Local de estudo	Animal	Animais/Ano						Total
		2017	2018	2019	2020	2021	2022	
IP/SP	Equídeos	65	47	35	37	43	1	228
IB/SP		25	09	25	20	20	0	99
FMVZ/Unesp		00	18	18	01	00	00	37
SEPAS/FCAV/Unesp	Répteis, aves e/ou mamíferos	00	00	40	53	76	48	217
BZM/PMRP/SP		00	00	00	00	66	47	113
IPeC		00	00	00	116	07	00	123
CP/IAL-SP		00	00	03	11	93	216	323
Total		90	74	121	238	305	312	1140

Foram estudadas 364 amostras de equídeos, sendo 228 do IP/SP, 99 do IB/SP e 37 da FMVZ/Unesp; e 776 animais selvagens (Gráfico 1), sendo 217 animais (14 répteis, 120 aves, e 83 mamíferos) do SEPAS/FCAV/Unesp – Jaboticabal, 113 aves do BZM/PMRP/SP, 123 aves silvestres do IPeC e 323 aves do CP/IAL-SP.

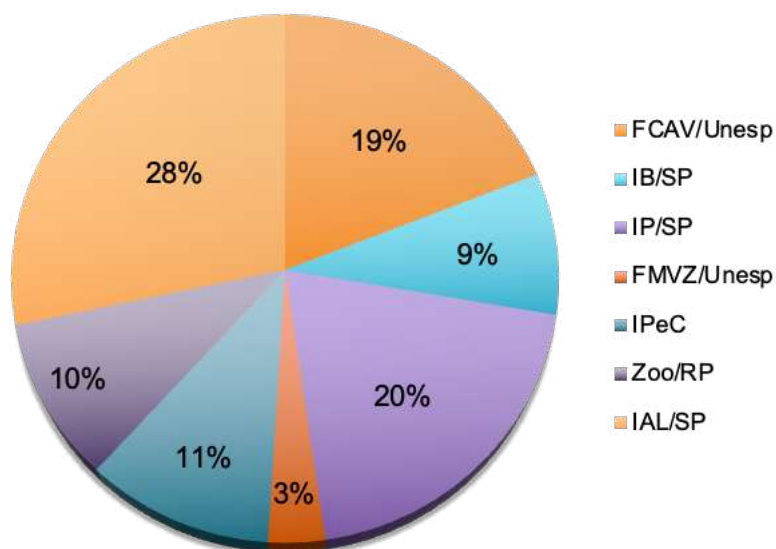


Gráfico 1. Estratificação em porcentagem do quantitativo de amostras avaliadas a partir de cada instituição de colaboração da Rede ZooARBO SP.

Embora projeto tenha tido início em 2019, de acordo com a disponibilidade de amostras, também foram incluídos animais de anos anteriores, realizando um estudo mais amplo, a fim de verificar a possível circulação desses vírus anos antes do início do estudo.

No período entre 2019 e 2022 o SEPAS/FCAV/UNESP realizou a coleta de 120 aves (217) (Tabela 1). A espécie *Columba livia* (Pombo-doméstico) foi mais frequente nos anos 2020 e 2021, correspondendo a 8,18% (18/120). Apesar disso, a ocorrência entre as demais espécies foi semelhante, destacando-se as ordens Columbiformes e Psittaciformes, com 26,7% (32/120) cada.

Tabela 1. Diversidade das espécies de aves amostradas pelo Serviço de Patologia de Animais Selvagens, da FCAV/Unesp, nos anos de 2019 a 2022.

Ano	Ordem	Espécie	Nome comum	M/N	nº
2019	Cariamiformes	<i>Cariama cristata</i>	Seriema	N	3
	Charadriiformes	<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	N	1
	Columbiformes	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	1
		N/I	N/I	N/I	1
	Falconiformes	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	N	4
	Gruiformes	<i>Aramides saracura</i>	Saracura-do-mato	N	1
	Nyctibiiformes	<i>Nyctibius griseus</i>	Urutau	N	1
	Pelecaniformes	<i>Ardea alba</i>	Garça-branca-grande	N	1
		<i>Syrigma sibilatrix</i>	Maria-faceira	N	1
		<i>Tigrisoma lineatum</i>	Socó-boi	N	1
	Psittaciformes	<i>Brotogeris chiriri</i>	Periquito-de-encontro-amarelo	N	1
		<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã (Maritaca)	N	1
	Strigiformes	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	N	1
		<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	N	2
		<i>Bubo virginianus</i>	Jacurutu	N	1
		<i>Tyto furcata</i>	Suindara	N	2
	Total				
2020	Charadriiformes	<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	N	1
	Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Pomba-doméstico*	N	12
		<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	1
	Passeriformes	<i>Serinus canaria domestica</i>	Canário-belga	Ex	3
		<i>Turdus sp.</i>	Sabiá	N	1
	Psittaciformes	<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	N	2
		<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	N	3
		<i>Ara spp.</i>	Arara-híbrida	N	1
		<i>Forpus sp.</i>	Tuim	N	1
		<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã (Maritaca)	N	1
		<i>Psittacula eupatria</i>	Grande-alexandre	Ex	1
	Strigiformes	<i>Psittacula krameri</i>	Ring neck	Ex	1
		<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	N	1
		<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	N	1
<i>Tyto furcata</i>		Suindara	N	2	
Total					32
2021	Anseriformes	<i>Cairina moschata</i>	Pato-do-mato	N	2
		N/I	N/I	N/I	1
	Charadriiformes	<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	N	3
	Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Pomba-doméstica*	N	5
<i>Patagioenas picazuro</i>		Pomba Asa-Branca	N	2	

		<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	3	
		N/I	N/I	N/I	2	
	Cuculiformes	<i>Guira guira</i>	Anu-branco	N	1	
	Galliformes	<i>Penelope obscura</i>	Jacuaçu	N	1	
	Passeriformes	<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	N	1	
	Pelecaniformes	N/I	N/I	N/I	1	
	Piciformes	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	N	2	
	Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	N	2	
		<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	N	2	
		<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	N	1	
		<i>Brotoyeris chiriri</i>	Periquito-de-encontro-amarelo	N	1	
		<i>Eclectus roratus</i>	Papagaio-eclétus	Ex	2	
		<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Ex	2	
		<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã (Maritaca)	N	1	
		Rheiformes	<i>Rhea americana</i>	Ema	N	1
		Strigiformes	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	N	2
		Tinamiformes	<i>Rhynchotus rufescens</i>	Perdiz	N	1
	Total				39	
2022	Anseriformes	<i>Tadorna sp.</i>	Pato	Ex	1	
	Charadriiformes	<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	N	1	
	Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Pombo-doméstico*	N	1	
		<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	N	1	
		<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	2	
		N/I	N/I	N/I	1	
	Cuculiformes	<i>Guira guira</i>	Anu-branco	N	1	
	Falconiformes	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	N	1	
		<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	N	1	
	Gruiformes	<i>Pardirallus maculatus</i>	Saracura-carijó	N	1	
	Passeriformes	<i>Passer domesticus</i>	Pardal*	N	1	
	Piciformes	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	N	2	
	Psittaciformes	<i>Amazona rhodocorytha</i>	Chauá	N	1	
		<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	N	3	
		<i>Aratinga auricapillus</i>	Jandaia-de-testa-vermelha	N	1	
		<i>Brotoyeris chiriri</i>	Periquito-de-encontro-amarelo	N	1	
		<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito-rei	N	1	
		<i>Melopsittacus undulatus</i>	Periquito-australiano	Ex	2	
		<i>Phasianus colchicus</i>	Faisão-coleira	Ex	1	
		Strigiformes	<i>Tyto furcata</i>	Suindara	N	1
		Tinamiformes	<i>Rhynchotus rufescens</i>	Perdiz	N	1
		Total				26
	Total geral				120	

N/I: não informado; M: migrante; N: não-migrante; Ex: exótico; *aves introduzidas no Brasil e que se estabeleceram criando grandes populações.

Além das aves, outros 97 animais pertencentes aos grupos dos mamíferos (Tabela 2) e répteis (Tabela 3) foram amostrados de acordo com a casuística local. Os mamíferos representaram 38,2% (83/217) e os répteis 6,45% (14/217) da amostragem. Durante o período não houve o registro de anfíbios.

Tabela 2. Diversidade das espécies de mamíferos amostrados pelo Serviço de Patologia de Animais Selvagens, da FCAV/Unesp, dos anos de 2019 a 2022.

Ano	Ordem	Espécie	Nome comum	M/N	nº
2019	Artiodactyla	<i>Subulo gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	N	1
	Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	N	1

		<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	N	1
		<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	N	2
		<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	N	1
		<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	N	2
Pilosa		<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-bandeira	N	2
Primates		<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	N	2
		<i>Callicebus personatus</i>	Sauá	N	1
		<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufos-pretos	N	2
		<i>Sapajus nigritus</i>	Macaco-prego	N	1
Rodentia		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	N	1
Total					17
2020	Artiodactyla	<i>Mazama americana</i>	Veado-mateiro	N	1
		<i>Subulo gouazoubira</i>	Veado-catingueiro	N	1
	Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	N	1
		<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	N	2
		<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	N	1
		<i>Panthera onca</i>	Onça-pintada	N	1
		<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	N	2
Pilosa		<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	N	2
		<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	N	1
Primates		<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	N	1
		<i>Alouatta guariba</i>	Bugio-ruivo	N	1
		<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufos-brancos	N	1
		<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufos-pretos	N	5
		<i>Sapajus nigritus</i>	Macaco-prego	N	1
Total					21
2021	Artiodactyla	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Cervo-do-pantanal	N	3
		<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	N	1
	Carnivora	<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	N	6
		<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	N	1
		<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	N	1
Cingulata		<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatupeba	N	1
Didelphimorphia		<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelhas-brancas	N	1
Pilosa		<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-bandeira	N	1
Primates		<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	N	1
		<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufos-brancos	N	1
		<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufos-pretos	N	5
		<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandril	Ex	1
		<i>Sapajus sp.</i>	Macaco-prego	N	1
Rodentia		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	N	1
		<i>Sphiggurus villosus</i>	Ouriço-cacheiro	N	1
Total					26
2022	Artiodactyla	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Cervo-do-pantanal	N	3
	Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	N	1
		<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	N	2
		<i>Puma concolor</i>	Onça-parda	N	1
		<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	N	2
Cingulata		<i>Dasyus novemcinctus</i>	Tatu-galinha	N	1
		<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatupeba	N	1
Didelphimorphia		<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá-de-orelhas-brancas	N	2
Pilosa		<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira	N	1
		<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá-mirim	N	2
Primates		<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	N	1
		<i>Callithrix penicillata</i>	Sagui-de-tufos-pretos	N	1
Rodentia		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capivara	N	1
Total					19
Total geral					83

M: migrante; N: não-migrante; Ex: exótico.

Tabela 3. Diversidade das espécies de répteis amostrados pelo Serviço de Patologia de Animais Selvagens, da FCAV/Unesp, dos anos de 2019 a 2022.

Ano	Ordem	Espécie	Nome comum	M/N	nº
2021	Squamata	<i>Boa constrictor</i>	Jibóia	N	2
		<i>Bothrops sp.</i>	N/I	N/I	1
		<i>Crotalus durissus</i>	Cascavél	N	2
		<i>Salvator merianae</i>	Teiú	N	2
		<i>Xenodon sp.</i>	Boipeva	N	1
	Testudinata	<i>Chelonoidis carbonaria</i>	Jabuti-piranga	N	2
		<i>Trachemys scripta elegans</i>	Tartaruga-de-orelha-vermelha	N	1
Total					11
2022	Squamata	<i>Salvator merianae</i>	Teiú	N	1
	Testudinata	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Tartaruga-de-orelha-vermelha	N	2
Total					3
Total geral					14

N/I: não informado; M: migrante; N: não-migrante.

As demais ordens estudadas foram: Artiodactyla (10,3%), Carnivora (28,8%), Cingulata (3,09%), Didelphimorphia (3,09%), Pilosa (9,27%), Primates (26,8%), Rodentia (4,1%), Squamata (9,27%) e Testudinata (5,15%) (Quadro 2). Dentre os mamíferos, as ordens de maior representatividade foram a Carnivora, Primates e Artiodactyla.

Quadro 2. Número de mamíferos e répteis amostrados pelo SEPAS/FCAV/Unesp entre os anos de 2019 e 2022, distribuídas conforme a ordem.

Grupo	Mamíferos						
Ordem	Artiodactyla	Carnivora	Cingulata	Didelphimorphia	Pilosa	Primates	Rodentia
Total	10	28	03	03	09	26	04
Grupo	Répteis						
Ordem	Squamata			Testudinata			
Total	09			05			

Entre os anos de 2021 e 2022 foi coletado no BZM/PMRP/RP o material de 113 aves, sendo a ordem mais amostrada os Passeriformes, correspondendo a 69,9% (79/113). Dentre os Passeriformes, as espécies mais frequentes foram: *Pitangus sulphuratus* (17,69%), *Passer domesticus* (9,73%) e *Pygochelidon cyanoleuca* (7,96%) (Tabela 4). Outras ordens estudadas incluíram: Apodiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Gruiformes, Pelecaniformes, Piciformes e Strigiformes.

Tabela 4. Diversidade das espécies de aves amostradas pelo Serviço de Patologia de Animais Selvagens, do BZM/PMRP/RP, entre os anos de 2021 e 2022.

Ano	Ordem	Espécie	Nome comum	M/N	nº
2021	Apodiformes	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	N	4
		<i>Chaetura meridionalis</i>	Andorinhão-do-temporal	N	1

	Cuculiformes	<i>Guira guira</i>	Anu-branco	N	2
	Passeriformes	<i>Cyanerpes cyaneus</i>	Saíra-beija-flor	N	1
		<i>Furnarius rufus</i>	João-de-barro	N	2
		<i>Hirundo rustica</i>	Andorinha-de-bando	M	1
		<i>Icterus cayanensis</i>	Inhapim	N	1
		<i>Knipolegus lophotes</i>	Maria-preta-de-penacho	N	1
		<i>Machetornis rixosa</i>	Suiriri-cavaleiro	N	1
		<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá-do-campo	N	4
		<i>Molothrus bonariensis</i>	Vira-bosta	N	1
		<i>Myiodynastes maculatus</i>	Bem-te-vi-rajado	N	2
		<i>Passer domesticus</i>	Pardal*	N	5
		<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	N	1
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	N	15
		<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha-pequena-de-casa	N	9
		<i>Todirostrum cinereum</i>	Ferreirinho-relógio	N	1
		<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá-poca	N	1
		<i>Thraupis palmarum</i>	Sanhaço-do-coqueiro	N	1
		<i>Troglodytes aedon</i>	Curruíra	N	1
		<i>Tyrannus melancholicus</i>	Suiriri	N	5
		<i>Tyrannus savana</i>	Tesourinha	N	1
	Piciformes	<i>Colaptes campestris</i>	Pica-pau-do-campo	N	1
		<i>Colaptes melanochloros</i>	Pica-pau-verde-barrado	N	3
	Strigiformes	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	N	1
	Total				66
2022	Apodiformes	<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	N	4
	Columbiformes	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	N	1
		<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	1
	Cuculiformes	<i>Crotophaga ani</i>	Anu-preto	N	4
		<i>Guira guira</i>	Anu-branco	N	1
	Gruiformes	<i>Aramides saracura</i>	Saracura-do-mato	N	1
	Passeriformes	<i>Cacicus cela</i>	Xexéu	N	1
		<i>Fluvicola nengeta</i>	Lavadeira-mascarada	N	1
		<i>Icterus pyrrhopterus</i>	Encontro	N	1
		<i>Passer domesticus</i>	Pardal*	N	6
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	N	5
		<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro	N	2
		<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho	N	1
		<i>Sporophila frontalis</i>	Pixoxó	N	1
		<i>Tersina viridis</i>	Saí-andorinha	N	1
		<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	N	1
		<i>Thamnophilus doliatus</i>	Choca-barrada	N	1
		<i>Tyrannus melancholicus</i>	Suiriri	N	2
		<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziu	N	1
		<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	N	1
	Pelecaniformes	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Savacu	N	1
		<i>Syrigma sibilatrix</i>	Maria-faceira	N	1
	Piciformes	<i>Colaptes campestris</i>	Pica-pau-do-campo	N	1
		<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	N	2
	Strigiformes	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	N	1
		<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	N	2
		<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	N	2
	Total				47
	Total geral				113

M: migrante; N: não-migrante; *aves introduzidas no Brasil e que se estabeleceram criando grandes populações.

O IPeC realiza o monitoramento do trecho sul de praias do Estado de São Paulo, onde recolheu 123 aves silvestres marinhas, sendo a maior parte migratória. As

espécies com maior número de ocorrências durante o período foram *Spheniscus magellanicus*, 46,34% (57/123) e *Puffinus puffinus*, 16,26% (20/123), das ordens Sphenisciformes e Procellariiformes, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Diversidade das espécies de aves silvestres costeiras amostradas pelo IpeC entre os anos de 2020 e 2021.

Ano	Ordem	Espécie	Nome comum	M/N	nº
2020	Charadriiformes	<i>Calidris fuscicollis</i>	Maçarico-de-sobre-branco	M	2
		<i>Charadrius collaris</i>	Batuíra-de-coleira	N	1
		<i>Larus dominicanus</i>	Gaivotão	N	1
		<i>Thalasseus acutiflavidus</i>	Trinta-réis-de-bando	N	2
	Procellariiformes	<i>Calonectris diomedea borealis</i>	Cagarra-grande	M	1
		<i>Macronectes giganteus</i>	Petrel-gigante	M	2
		<i>Pachyptila desolata</i>	Faigão-rola	M	1
		<i>Puffinus puffinus</i>	Bobo-pequeno	M	20
		<i>Procellaria aequinoctialis</i>	Pardela-preta	M	4
		<i>Pterodroma mollis</i>	Grazina-mole	M	1
		<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim-de-magalhães	M	57
	Suliformes	<i>Fregata magnificens</i>	Tesourão	N	4
		<i>Nannopterum brasilianum</i>	Biguá	N	3
		<i>Sula leucogaster</i>	Atobá-pardo	N	17
Total					116
2021	Charadriiformes	<i>Larus dominicanus</i>	Gaivotão	N	2
	Suliformes	<i>Fregata magnificens</i>	Tesourão	N	2
		<i>Sula dactylatra</i>	Atobá-grande	N	1
		<i>Sula leucogaster</i>	Atobá-pardo	N	2
Total					7
Total geral					123

M: migrante; N: não-migrante; Ex: exótico.

O CP/IAL-SP durante os anos de 2019 e 2022 recebeu 323 amostras de aves coletadas em diferentes localidades do Estado de São Paulo. A ordem mais amostrada foi a Passeriformes, representando 28,17% (91/323), seguida pelos Psittaciformes, 13,93% (35/323). Apesar disso, as espécies mais frequentes foram: *Coragyps atratus*, 7,43% (24/323) e *Spheniscus magellanicus*, 6,19% (20/323) (Tabela 6).

Tabela 6. Diversidade de espécies de aves encaminhadas ao CP/IAL-SP entre os anos de 2019 e 2022.

Ano	Ordem	Espécie	Nome comum	M/N	nº
2019	Passeriformes	<i>Molothrus bonariensis</i>	Vira-bosta	N	1
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	N	1
	Piciformes	<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-toco	N	1
Total					3
2020	Accipitriformes	<i>Harpia harpyja</i>	Harpia	N	1
	Columbiformes	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	1
	Galliformes	<i>Crax alector</i>	Mutum-poranga	N	1
	Passeriformes	<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	N	1
		<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	N	2

		<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha-pequena-de-casa	N	1
		<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro-verdadeiro	N	1
	Piciformes	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	N	1
	Psittaciformes	<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	N	2
	Total				11
2021	Accipitriformes	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Gavião-asa-de-telha	N	1
	Anseriformes	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	Pato-doméstico	Ex	4
		<i>Anser cygnoides domesticus</i>	Ganso-doméstico	Ex	4
		<i>Cairina moschata</i>	Pato-do-mato	N	1
		<i>Dendrocygna viduata</i>	Irerê	N	1
		<i>Nomonyx dominicus</i>	Aracuã-do-pantanal	N	1
	Caprimulgiformes	<i>Lurocalis semitorquatus</i>	Tuju	N	1
	Cathartiformes	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	N	8
	Charadriiformes	<i>Larus dominicanus</i>	Gaivotão	N	2
		<i>Thalasseus maximus</i>	Trinta-réis-real	N	1
	Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Pombo-doméstico*	N	3
		<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	N	2
		<i>Geotrygon montana</i>	Pariri	N	1
		<i>Patagioenas picazuro</i>	Pomba Asa-branca	N	1
		<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	2
	Falconiformes	<i>Caracara plancus</i>	Carcará	N	1
		<i>Falco femoralis</i>	Falcão-de-coleira	N	1
	Galliformes	<i>Aburria jacutinga</i>	Jacutinga	N	1
	Galliformes	<i>Penelope obscura</i>	Jacuaçu	N	1
	Passeriformes	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	N	3
		<i>Elaenia sp.</i>	N/I	N	1
		<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	N	2
		<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá-do-campo	N	2
		<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal	N	3
		<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	N	1
		<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro-verdadeiro	N	6
		<i>Serinus canaria</i>	Canário	Ex	1
		<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro	N	1
		<i>Sporophila caerulescens</i>	Coleirinho	N	1
		<i>Sporophila falcirostris</i>	Cigarra-verdadeira	N	1
		<i>Sporophila frontalis</i>	Pixoxó	N	1
		<i>Sporophila maximiliani</i>	Bicudo	N	1
		<i>Turdus albicollis</i>	Sabiá-coleira	N	1
		<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	N	1
		<i>Turdus sp.</i>	Sabiá	N	1
		<i>Thraupis sayaca</i>	Sanhaçu-cinzento	N	1
		<i>Tyrannus melancholicus</i>	Suiriri	N	1
		<i>Tyrannus savana</i>	Tesourinha	N	1
	Pelecaniformes	<i>Ardea alba</i>	Garça-branca-grande	N	2
		<i>Egretta thula</i>	Garça-branca-pequena	N	1
		<i>Nycticorax nycticorax</i>	Savacu	N	1
	Piciformes	<i>Celeus flavescens</i>	Pica-pau-de-cabeça-amarela	N	1
		<i>Colaptes melanochloros</i>	Pica-pau-verde-barrado	N	1
	Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	N	5
		<i>Amazona brasiliensis</i>	Papagaio-de-cara-roxa	N	1
		<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-rico	N	3
		<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã-pequena	N	1
		<i>Guaruba guarouba</i>	Ararajuba	N	1
		<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã (Maritaca)	N	3
	Suliformes	<i>Nannopterum brasilianum</i>	Biguá	N	1

	Strigiformes	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	N	2
		<i>Bubulcus ibis</i>	Garça-vaqueira	N	1
		<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	N	2
	Total				93
2022	Accipitriformes	<i>Amadonastur lacernulatus</i>	Gavião-pombo-pequeno	N	1
	Anseriformes	<i>Aix sponsa</i>	Pato-carolino	Ex	1
		<i>Anser cygnoides domesticus</i>	Ganso-doméstico	Ex	3
		<i>Cairina moschata</i>	Pato-do-mato	N	1
		<i>Cygnus atratus</i>	Cisne-negro	Ex	1
	Cariamiformes	<i>Cariama cristata</i>	Seriema	N	2
	Cathartiformes	<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	N	16
	Charadriiformes	<i>Larus dominicanus</i>	Gaivotão	N	15
		<i>Onychoprion fuscatus</i>	Trinta-réis-das-rocas	N	1
		<i>Thalasseus maximus</i>	Trinta-réis-real	N	2
	Columbiformes	<i>Columba livia</i>	Pomba-doméstico*	N	5
		<i>Patagioenas picazuro</i>	Pomba Asa-branca	N	2
	Columbiformes	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante	N	3
		NI	N/I	N/I	1
	Cuculiformes	<i>Piaya cayana</i>	Alma-de-gato	N	1
	Falconiformes	<i>Falco peregrinus</i>	Falcão peregrino	M	1
		<i>Micrastur semitorquatus</i>	Falcão-relógico	N	1
	Galliformes	<i>Pavo cristatus</i>	Pavão	Ex	3
		<i>Penelope jacucaca</i>	Jacucaca	N	1
		<i>Penelope pileata</i>	Jacupiranga	N	1
	Passeriformes	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	Azulão	N	1
		<i>Euphonia violacea</i>	Gaturamo-verdadeiro	N	1
		<i>Gnorimopsar chopi</i>	Graúna	N	2
		<i>Icterus jamacaii</i>	Corrupião	N	1
		<i>Paroaria dominicana</i>	Cardeal-do-nordeste	N	4
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bem-te-vi	N	1
		<i>Procnias nudicollis</i>	Araponga	N	1
		<i>Progne chalybea</i>	Andorinha-doméstica-grande	N	1
		<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	Andorinha-pequena-de-casa	N	2
		<i>Psarocolius decumanus</i>	Japu	N	1
		<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro-verdadeiro	N	8
		<i>Serinus canaria</i>	Canário	Ex	1
		<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra-verdadeiro	N	2
		<i>Sporophila caerulea</i>	Coleirinho	N	3
		<i>Sporophila maximiliani</i>	Bicudo	N	2
		<i>Tachyphonus coronatus</i>	Tiê-preto	N	1
		<i>Turdus amaurochalinus</i>	Sabiá-poca	N	1
		<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	N	1
		<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	N	1
		<i>Thraupis sayaca</i>	Sanhaçu-cinzento	N	1
		<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziu	N	1
		<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	N	2
	Pelecaniformes	<i>Cochlearius cochlearius</i>	Arapapá	N	1
		<i>Mesembrinibis cayennensis</i>	Coró-coró	N	3
	Piciformes	<i>Colaptes campestris</i>	Pica-pau-do-campo	N	4
		<i>Ramphastos dicolorus</i>	Tucano-de-bico-verde	N	3
		<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	N	2
	Procellariiformes	<i>Calonectris</i> sp.	Bobo	M	3
		<i>Oceanites oceanicus</i>	Alma-de-mestre	M	1
		<i>Puffinus puffinus</i>	Bobo-pequeno	M	8
		<i>Pterodroma mollis</i>	Grazina-mole	M	3
		<i>Thalassarche melanophris</i>	Albatroz-de-sobrancelha	M	1
	Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	N	12

	<i>Amazona autumnalis</i>	Papagaio-diadema	N	1
	<i>Amazona brasiliensis</i>	Papagaio-de-cara-roxa	N	1
	<i>Amazona ochrocephala</i>	Papagaio-campeiro	N	2
	<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-de-peito-roxo	N	2
	<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	N	3
	<i>Ara macao</i>	Araracanga	N	1
	<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-rico	N	3
	<i>Cyanopsitta spixii</i>	Ararinha-azul**	N	4
	<i>Eupsittula aurea</i>	Periquito-rei	N	1
	<i>Guaruba guarouba</i>	Ararajuba	N	1
	<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-verde	N	2
	<i>Platycercus eximius</i>	Rosella	Ex	1
	<i>Primolius maracana</i>	Maracanã-verdadeira	N	1
	<i>Psittacus erithacus</i>	Papagaio-do-congo	Ex	1
	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã (Maritaca)	N	8
Suliformes	<i>Fragata magnificens</i>	Tesourão	N	5
	<i>Nannopterum brasilianum</i>	Biguá	N	4
	<i>Sula leucogaster</i>	Atoba-pardo	R	9
Sphenisciformes	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim-de-magalhães	M	20
Strigiformes	<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	N	1
	<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	N	2
Tinamiformes	<i>Tinamus solitarius</i>	Macuco	N	1
Total				216
Total geral				323

N/I: não informado; M: migrante; N: não-migrante; Ex: exótico; *aves introduzidas no Brasil e que se estabeleceram criando grandes populações; **espécie extinta na natureza, sendo recentemente reintroduzida em seu habitat natural.

6.1.1. Ordens de aves estudadas

Dentre os 679 indivíduos amostrados (Quadro 3), foram estudadas as seguintes ordens de aves: Apodiformes (1,33%), Accipitriformes (0,59%), Anseriformes (3,09%), Cariamiformes (0,74%), Cathartiformes (3,53%), Charadriiformes (5,15%), Caprimulgiformes (0,15%), Columbiformes (8,1%), Cuculiformes (1,47%), Falconiformes (1,33%), Galliformes (1,33%), Gruiformes (0,44%), Nyctibiiformes (0,15%), Passeriformes (26,07%), Pelecaniformes (2,36%), Piciformes (3,53%), Procellariiformes (6,63%), Psittaciformes (11,34%), Rheiformes (0,15%), Sphenisciformes (11,34%), Strigiformes (3,83%), Suliformes (6,92%) e Tinamiformes (0,44%).

Quadro 3. Número de aves amostradas entre os anos de 2019 e 2022, distribuídas conforme a ordem e a respectiva unidade de colaboração da Rede ZooARBO SP.

Total de ordens de aves amostradas/testadas (2019 - 2022)					
Ordens	SEPAS/FCAVJ	IPeC	ZooRP	IAL/SP	Total (%)
Apodiformes	0	0	9	0	9 (1,33)
Accipitriformes	1	0	0	3	4 (0,59)
Anseriformes	4	0	0	17	21 (3,09)

Cariamiformes	3	0	0	2	5 (0,74)
Cathartiformes	0	0	0	24	24 (3,53)
Charadriiformes	6	8	0	21	35 (5,15)
Caprimulgiformes	0	0	0	1	1 (0,15)
Columbiformes	32	0	2	21	55 (8,10)
Cuculiformes	2	0	7	1	10 (1,47)
Falconiformes	5	0	0	4	9 (1,33)
Galliformes	1	0	0	8	9 (1,33)
Gruiformes	2	0	1	0	3 (0,44)
Nyctibiiformes	1	0	0	0	1 (0,15)
Passeriformes	7	0	79	91	177 (26,07)
Pelecaniformes	4	0	2	10	16 (2,36)
Piciformes	4	0	7	13	24 (3,53)
Procellariiformes	0	29	0	16	45 (6,63)
Psittaciformes	32	0	0	45	77 (11,34)
Rheiformes	1	0	0	0	1 (0,15)
Sphenisciformes	0	57	0	20	77 (11,34)
Strigiformes	13	0	6	7	26 (3,83)
Suliformes	0	29	0	18	47 (6,92)
Tinamiformes	2	0	0	1	3 (0,44)
Total	120	123	113	323	679 (100)

Portanto, sendo os Passeriformes, Psittaciformes, Sphenisciformes, Columbiformes, Suliformes e Procellariiformes as ordens mais amostradas (Gráfico 2), respectivamente.

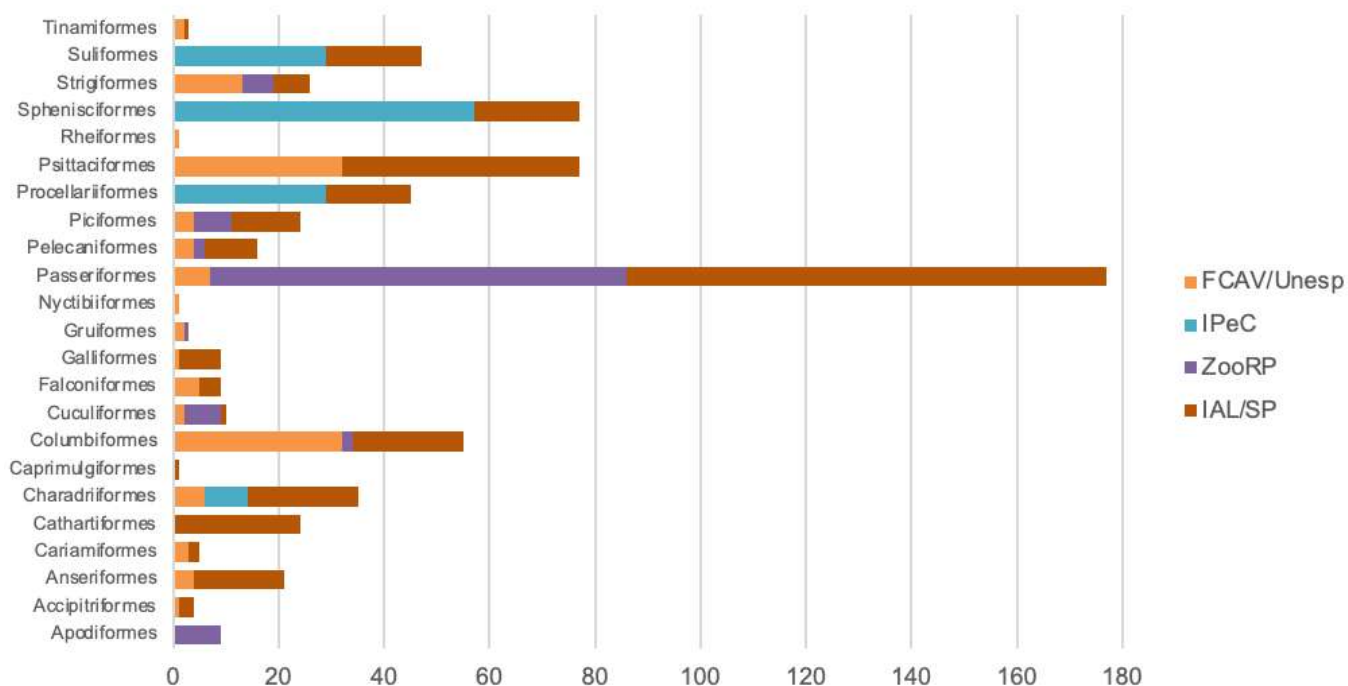


Gráfico 2. Estratificação das ordens de aves amostradas entre os anos de 2019 e 2022 conforme a instituição colaboradora da Rede ZooARBO SP.

O maior número de aves testadas pertence a ordem Passeriformes, 177/679, o que trouxe ao estudo uma maior chance de detecção do WNV, na possibilidade da sua circulação.

6.2. Identificação do RNA de outros arbovírus por RT-qPCR

Embora o vírus alvo do estudo fosse o WNV, outras arboviroses foram testadas paralelamente, como SLEV e vírus dos gêneros Flavivírus e Alphavírus. Dos 1140 animais, 867 foram avaliados pela técnica de RT-qPCR, resultando em aproximadamente 1370 amostras testadas. Exceto para mamíferos, ao menos duas amostras foram utilizadas a fim de aumentar a sensibilidade de detecção. Assim, foram realizadas cerca de 4000 reações de RT-qPCR (Duplex WNV/SLEV, Pan-Flavi e Pan-Alpha).

Todos os animais testados foram considerados negativos para WNV, SLEV e outros arbovírus dos gêneros Flavivírus e Alphavírus, já que não tiveram nenhum material genético alvo detectado.

6.3. Histopatologia e Imuno-histoquímica

Dos 1140 animais amostrados, 34,82% (397/1140) foram submetidos à avaliação histopatológica e IHQ, sendo 74 de equídeos e 323 de aves. Das 364 amostras dos equídeos avaliadas, apenas 20,32% (74/364) (Quadro 4) das amostras provenientes do IB/SP e da FMVZ/Unesp mantinham parte de sua estrutura macroscópica preservada, e puderam ser fragmentadas e fixadas em formalina 10% tamponada.

Quadro 4. Equídeos submetidos à avaliação histopatológica pela coloração H&E.

Unidade de colaboração	Animal	Ano			Total
		2018	2019	2020	
Instituto Biológico de São Paulo	Equídeos	06	19	13	38
FMVZ/Unesp		18	17	01	36
Total		24	36	14	74

Por serem amostras que são enviadas exclusivamente para o diagnóstico de raiva animal, são encaminhadas em quase sua totalidade já congeladas, e, portanto, passaram por uma ou mais etapas de congelamento/descongelamento. Mesmo

assim, foi realizada a triagem pela coloração H&E para avaliação da morfologia e presença de lesões compatíveis com infecção viral.

Dessas, apenas três amostras do IB/SP, sendo uma do ano de 2018 e duas de 2019 tiveram lesões compatíveis com uma encefalite não-supurativa, com variados graus de infiltrado inflamatório perivascular (manguitos). As lesões foram identificadas comumente em tronco encefálico, apesar de também estarem presentes no cérebro e cerebelo. Essas mesmas amostras foram submetidas à IHQ, sendo negativas para antígenos de WNV. Todas as 74 amostras apresentaram algum grau de autólise (87,84% marcante; 9,46% moderada e 2,7% discreta) e artefatos decorrentes do congelamento da amostra.

O mesmo não aconteceu com as 323 amostras encaminhadas diretamente ao CP/IAL-SP, as quais foram colhidas em sua maioria a partir de carcaças frescas ou refrigeradas, e esporadicamente congeladas, o que propiciou uma melhor qualidade das amostras. Para a investigação do WNV, 100% das amostras foram submetidas à avaliação IHQ e todas foram negativas.

6.4. PRNT (*Plaque Reduction Neutralizing Test*) para o WNV em pombos da região nordeste do Estado de São Paulo

O SEPAS/FCAV/Unesp tem como rotina a investigação de animais já em óbito, mas em casos em que a afecção clínica se apresenta de maneira atípica, e que a avaliação clínica não obteve êxito, uma alternativa é o encaminhamento dos animais acometidos do plantel para eutanásia e posterior necrópsia. No ano de 2020 o SEPAS/FCAV/Unesp recebeu 13 pombos para avaliação, sendo oito pombos-correios (*Columba livia*) do Município de Franca (Figura 9) e cinco pombos do Município de Pirangi, [quatro pombos-domésticos (*Columba livia*) e uma avoante (*Zenaida auriculata*)], ambos da região nordeste do Estado de São Paulo.

Os animais provenientes do Município de Franca eram de um criadouro comercial onde, de acordo com o relato do proprietário os animais, filhotes com aproximadamente quatro meses de idade, após sofrerem a muda de penas ficaram “cegos”, batiam a cabeça nos lugares e não conseguiam voar, e alguns evoluindo para o óbito. Alguns desses animais foram recebidos vivos para avaliação clínica e posterior eutanásia. Durante a avaliação verificou-se que os animais apresentavam

cegueira aparente e alterações neurológicas, como dificuldade para voar, torcicolo e incoordenação. Os animais foram eutanasiados conforme protocolo definido pelo SEPAS/FCAV/Unesp e na sequência realizou-se a necropsia e a coleta de material para investigação. Já os animais provenientes do Município de Pirangi chegaram em óbito e com o histórico de que haviam aparecido mortos em uma praça da cidade. Diante da ocorrência o órgão sanitário da Prefeitura recolheu alguns exemplares e os encaminhou ao SEPAS/FCAV/Unesp para avaliação.



Figura 9. Pombos-correios (*Columba livia*) encaminhados do Município de Franca, apresentando cegueira aparente e sinais neurológicos inespecíficos.

Assim, além da avaliação histopatológica, colheu-se em paralelo sangue para a obtenção de soro, o qual foi encaminhado ao Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP. Dos 13, 11 tiveram sangue coletado e dois já se encontravam em avançado de autólise, impossibilitando a obtenção da amostra. O soro foi inativado e PRNT realizado (Figura 10). Foram definidos dois *cut offs*, sendo o PRNT₅₀ para triagem e o PRNT₈₀ para confirmação.

Nove amostras (81,81%) apresentaram anticorpos neutralizantes no PRNT₅₀, com títulos variando de 10 a 640 (Tabela 7). Dessas, após o cálculo do PRNT₈₀, seis (54,5%) mantiveram títulos neutralizantes, variando de 10 a 40, sendo essas consideradas reagentes, e, portanto, positivas para WNV.

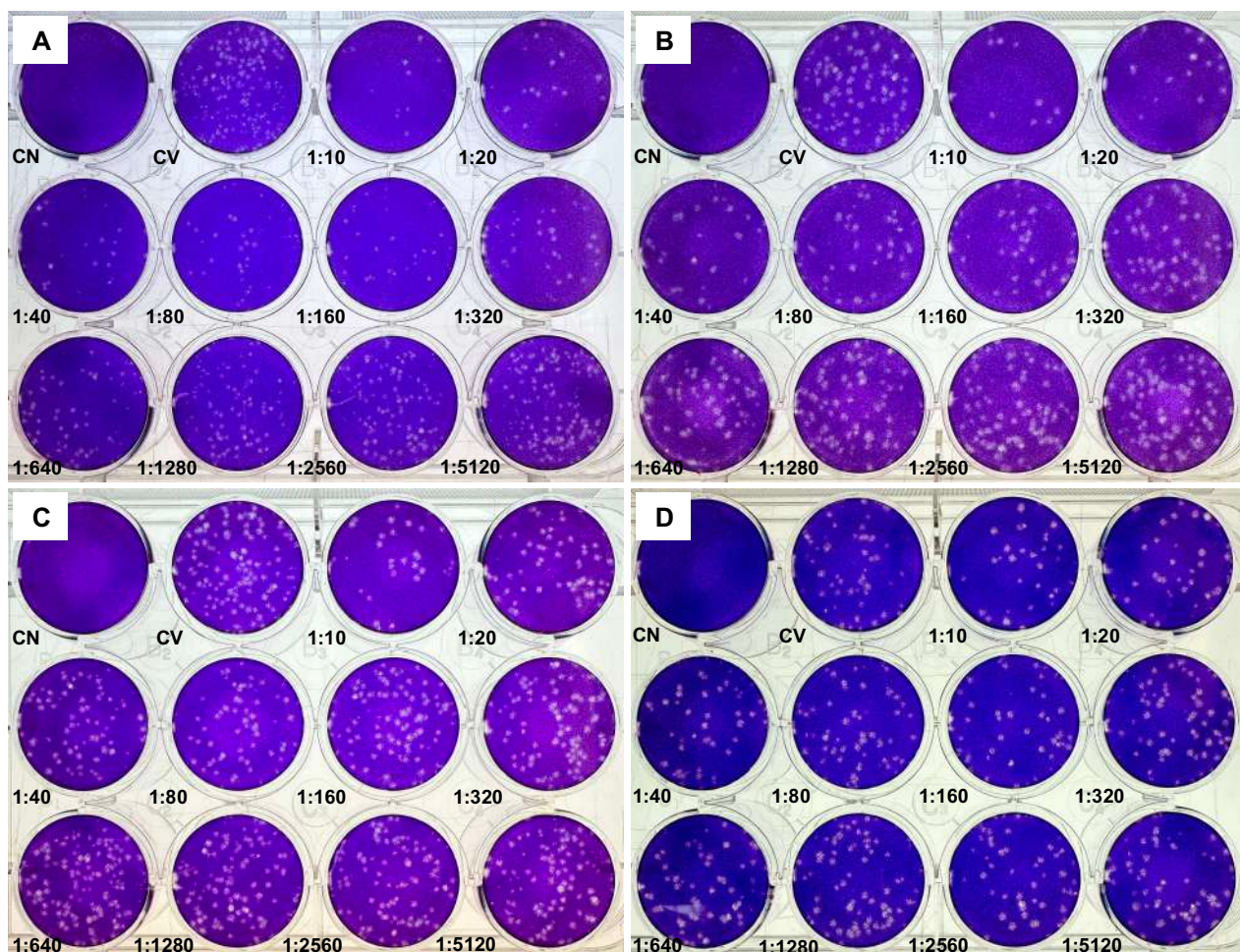


Figura 10. PRNT de quatro pombos. A) 43921 – PRNT₅₀: 640 e PRNT₈₀: 40; b) 43924 – PRNT₅₀: 160 e PRNT₈₀: 10; C) 43925 – PRNT₅₀: 10 e PRNT₈₀: NR; e D) 44031 – PRNT₅₀: NR e PRNT₈₀: NR. Teste realizado em placas de 12 poços, com diluição fator 2, de 1:10 até 1:5120 (em unicata), corado com cristal violeta após 48 – 72 horas de incubação. Área roxa: tapete celular íntegro, sem efeito citopático; Pontos brancos/transparentes: efeito citopático (plaques), causado pela infecção viral. CN: controle negativo (meio de cultivo e vírus); CV: controle de vírus.

Tabela 7. Informações e resultados dos animais, pombos, que foram submetidos aos testes de RT-qPCR e PRNT.

ID_USP	RG PATO	Cativo/ vida-livre	Espécie	Ordem	Município	WNV		
						RT-qPCR	PRNT ₅₀	PRNT ₈₀
05/20_FCAV	43919	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	20	NR
06/20_FCAV	43920	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	640	20
07/20_FCAV	43921	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	640	40
08/20_FCAV	43922	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	NR	NR
09/20_FCAV	43923	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	320	20
10/20_FCAV	43924	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	160	10
11/20_FCAV	43925	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	10	NR
12/20_FCAV	43926	cativo	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Franca	NEG	20	10
18/20_FCAV	44029	vida livre	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Pirangi	n/t	n/d	n/d
19/20_FCAV	44030	vida livre	<i>Zenaida auriculata</i>	Columbiformes	Pirangi	n/t	n/d	n/d
20/20_FCAV	44031	vida livre	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Pirangi	NEG	NR	NR
21/20_FCAV	44032	vida livre	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Pirangi	NEG	10	NR
22/20_FCAV	44033	vida livre	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Pirangi	NEG	80	10

PRNT: Plaque Reduction Neutralization Test; WNV: West Nile vírus; NEG: não-detectável; NR: não-reagente; n/t: não testado; n/d: amostra não disponível.

Além do PRNT, foi realizada a RT-qPCR conforme item 2.3.2. (Materiais e Métodos) a partir do SNC, sendo os 13 animais considerados negativos. Assim, apesar da detecção de anticorpos específicos contra o WNV, não se pode associar os achados clínicos desses animais com a infecção aguda pelo WNV, pois não foi detectada a presença desse vírus pela RT-qPCR. Contudo, pode-se tratar de uma causa de encefalite pós-infeciosa como já relatados em seres humanos.

6.5. Georreferenciamento

Os animais foram referenciados de acordo com as coordenadas geográficas fornecidas com as respectivas fichas encaminhadas, junto ao material biológico, para as unidades da Rede ZooARBO SP. Quando ausentes, os animais foram georreferenciados conforme o município de origem. As coordenadas foram inseridas no programa Google Earth Pro v.7.3. onde foi gerado o mapa com a área de cobertura do estudo. Devido à capilaridade e renome dos institutos que integram a Rede ZooARBO SP, animais de outros estados, não apenas do Estado de São Paulo, foram encaminhados ao laboratório e incluídos no estudo (Figura 11), ampliando o escopo de investigação.

Exceto pela região oeste do estado, cuja capilaridade da rede foi baixa, de 2017 a 2022 conseguiu-se realizar a cobertura de todo o Estado de São Paulo (Figura 12). Os pontos marcados referentes ao Centro de Patologia do IAL/SP (brancos) correspondem a unidade colaboradora que encaminhava os animais, como por exemplo: unidades de vigilância de zoonoses (UVZ) e empreendimentos de fauna (CETRAS e Zoológicos), não sendo, portanto, o ponto de origem de cada animal.

Da mesma maneira o ponto marcado referente ao Bosque e Zoológico Municipal “Dr. Fábio de Sá Barreto” (rosa), corresponde à localização da unidade, contemplando os 113 animais amostrados. Isso se deveu a inconsistência encontrada nos registros/marcação dos animais que eram recebidos no local, impossibilitando o rastreamento correto.

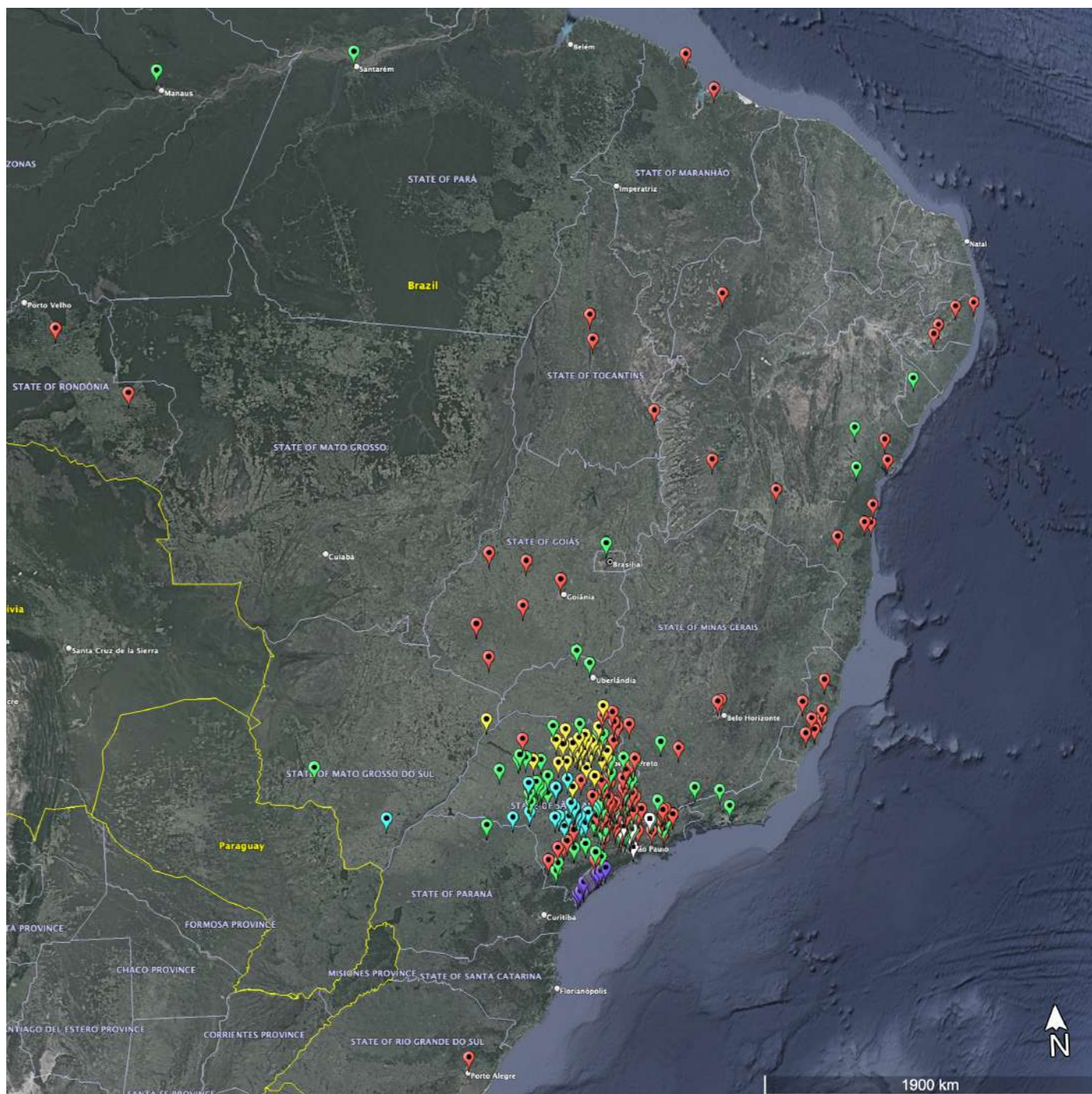


Figura 11. Vista aérea do território brasileiro (estados e distrito federal), com os pontos de origem de cada animal amostrado pelos institutos da Rede ZooARBO SP. Amarelo: animais selvagens coletados pelo Serviço de Patologia de Animais Selvagens, FCAV/Unesp; rosa: Zoológico Municipal de Ribeirão Preto, onde foram coletados 113 aves do município; vermelho: equídeos recebidos no Instituto Pasteur de São Paulo; verde: equídeos recebidos no Instituto Biológico de São Paulo; azul claro: equídeos recebidos no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ de Botucatu/Unesp; roxo: aves silvestres marinhas resgatados no Instituto de Pesquisas Cananéia; branco: unidades colaboradoras do Centro de Patologia do IAL/SP responsáveis pelo encaminhamento de aves selvagens. Fonte: Google Earth Pro, 2023.

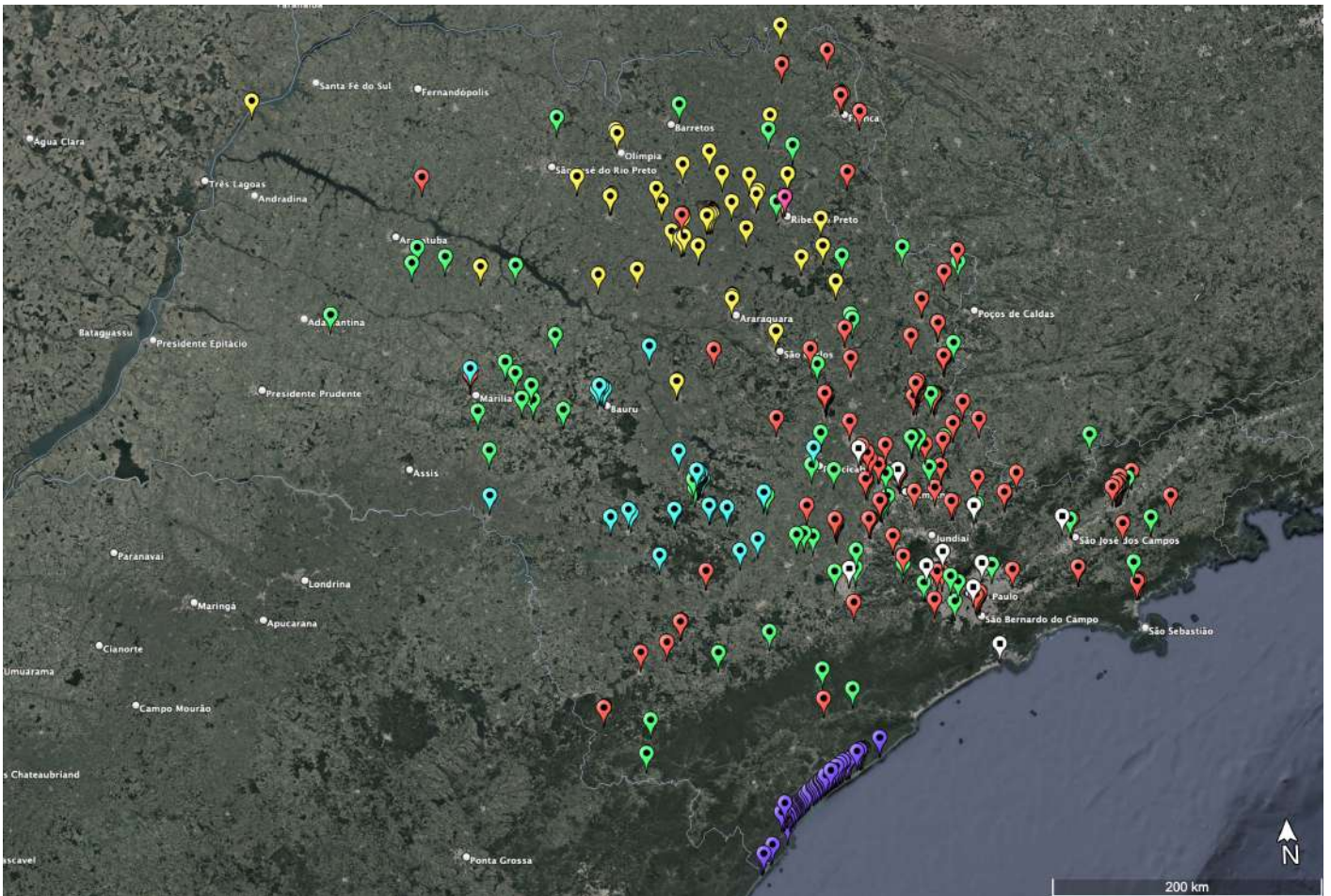


Figura 12. Vista aérea do Estado de São Paulo, em maior aumento, com a localização de cada animal amostrado pelos respectivos institutos da Rede ZooARBO SP. Amarelo: animais selvagens coletados pelo Serviço de Patologia de Animais Selvagens, FCAV/Unesp; rosa: Zoológico Municipal de Ribeirão Preto, onde foram coletados 113 aves do município; vermelho: equídeos recebidos no Instituto Pasteur de São Paulo; verde: equídeos recebidos no Instituto Biológico de São Paulo; azul claro: equídeos recebidos no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ de Botucatu/Unesp; roxo: aves silvestres marinhas resgatados no Instituto de Pesquisas Cananéia; branco: unidades colaboradoras do Centro de Patologia do IAL/SP responsáveis pelo encaminhamento de aves selvagens. Fonte: Google Earth Pro, 2023.

6.6. Isolamento e caracterização do WNV circulante no Brasil

Embora não estivesse no escopo inicial dos objetivos desse trabalho que, prioritariamente buscou a detecção da circulação do WNV no Estado de São Paulo, devido a singularidade do tema e da capacidade investigativa da rede criada, foi possível desenvolver outros trabalhos dentro do mesmo tema em outros tipos de amostras de origem animal e de outras localidades.

6.6.1. Isolamento e caracterização do vírus da Febre do Nilo Ocidental no Estado do Espírito Santo e Ceará

Em junho de 2019 foram notificados dois óbitos em cavalos, um no Município de João Neiva, no Espírito Santo, e o outro no Município de Boa Viagem no Ceará, ambos apresentando um quadro neurológico. Os sinais clínicos incluíram distúrbios neurológicos e locomotores como tremores, rigidez muscular, tremores de cabeça, fraqueza, ataxia, decúbito, hiperestesia, paresia dos membros, movimentos de pedalada e midríase. Amostras SNC foram coletadas para diagnóstico de raiva animal, o qual resultou negativo, pois, ambos os animais tinham sido vacinados recentemente. Na sequência as amostras foram encaminhadas ao LFDA/MG para o diagnóstico diferencial de outras encefalites, as quais testaram positivo para o WNV, pelo protocolo de RT-qPCR da OIE, o mesmo utilizado no presente estudo (OIE, 2018).

Por meio da colaboração com o LFDA/MG amostras desses dois equinos positivos foram encaminhadas ao LVM/FMRP/USP), para caracterização; duas amostras do Estado do Espírito Santo, 804_01_ES (encéfalo) e 804_02_ES (medula espinhal), e uma do Estado do Ceará, 827_01_CE (encéfalo) (Figura 13).

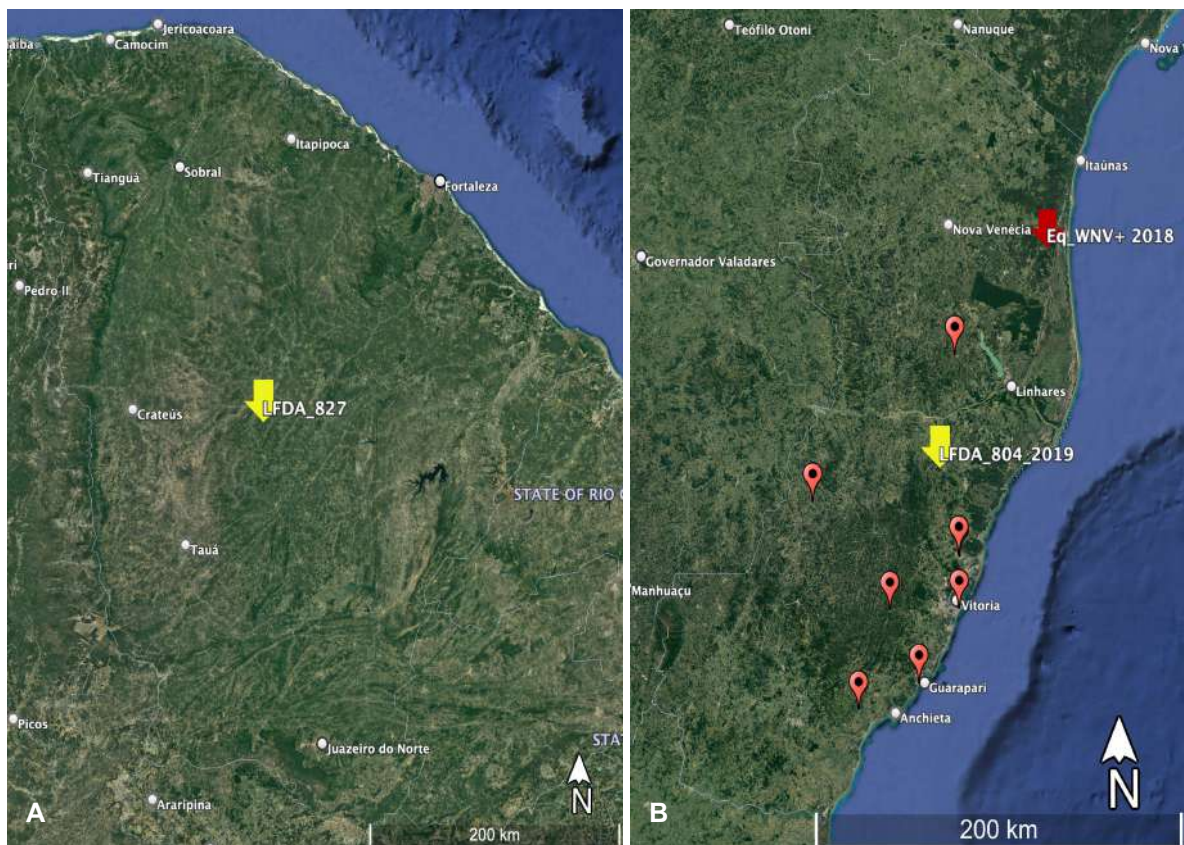


Figura 13. Vista aérea dos estados que tiveram a detecção do WNV pela técnica de biologia molecular no ano de 2019, em cavalos com doenças neurológicas. A) Estado do Ceará com

marcação (seta amarela) do Município de Boa Viagem, local de origem do animal positivo para WNV pela RT-qPCR; B) Estado do Espírito Santo com marcação (seta amarela) do Município de João Neiva, local de origem do animal positivo para WNV pela RT-qPCR e isolamento viral; seta vermelha: Município de São Mateus onde foi feito o primeiro isolamento e sequenciamento completo em 2018; pontos vermelhos: equídeos encaminhados ao IP/SP no ano de 2017 e negativos para outras WNV, SLEV, Flavivírus e Alphavírus. Fonte: Google Earth Pro, 2023.

Além dos fragmentos congelados, foram encaminhados também seus respectivos RNAs. Assim, antes de dar início ao isolamento viral, realizou-se a RT-qPCR a partir desses RNAs a fim de confirmar a positividade e viabilidade do material.

As três amostras foram positivas: 804_01_ES (Ct: 25.98), 804_02_ES (Ct: 27.91), e 827_01_CE (Ct: 31.92) (Figura 14). Foi selecionada uma amostra de cada animal, 804_02_ES e 827_01_CE para o isolamento em células, sendo utilizado entre 0,03-0,05 gramas de tecido. As infecções foram acompanhadas diariamente durante todo o período de incubação.

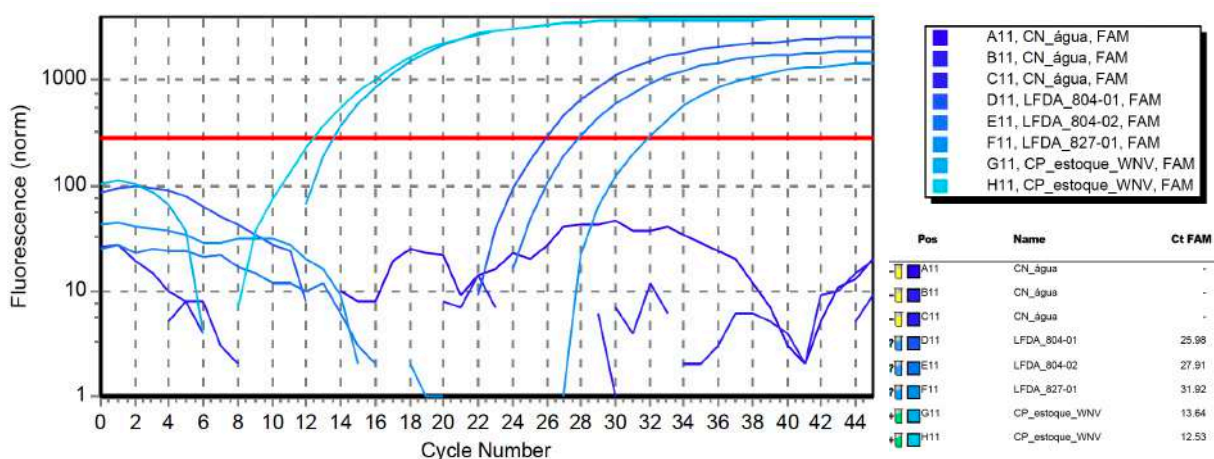


Figura 14. Curva de amplificação da RT-qPCR para WNV evidenciando a positividade dos RNAs encaminhados pelo LFDA/MG. Cts: 804_01_ES, Ct: 25.98; 804_02_ES, Ct: 27.91; e 827_01_CE, Ct: 31.92. Reação realizada no aparelho Mastercycler® ep realplex (Eppendorf®).

No dia seguinte à inoculação, verificou-se que o cultivo em células VERO da amostra 827_01_CE havia contaminado. O sobrenadante foi colhido, filtrado e armazenado. Após o 5º dia de incubação foi observado efeito citopático (ECP) no cultivo das células VERO da amostra 804_02_ES (figura 15). O sobrenadante foi colhido no 6º dia após a inoculação.

Realizou-se uma segunda passagem para confirmar e aumentar o título do isolado. Após 48 horas verificou-se novamente ECP em 50% da garrafa. O sobrenadante de cada passagem foi aliquoteado para posterior extração do RNA e RT-

qPCR para confirmação. Apesar de ter sido feito o mesmo processamento para a amostras 827_01_CE, não foi verificado ECP. O mesmo protocolo foi realizado em células C6/36, contudo nenhum ECP foi verificado durante as duas passagens de ambas as amostras, sendo o sobrenadante da 1ª passagem colhido no 6º dia pós-inoculação e da 2ª passagem colhido no 12º pós-inoculação. Também foram feitas alíquotas para extração e RT-qPCR.

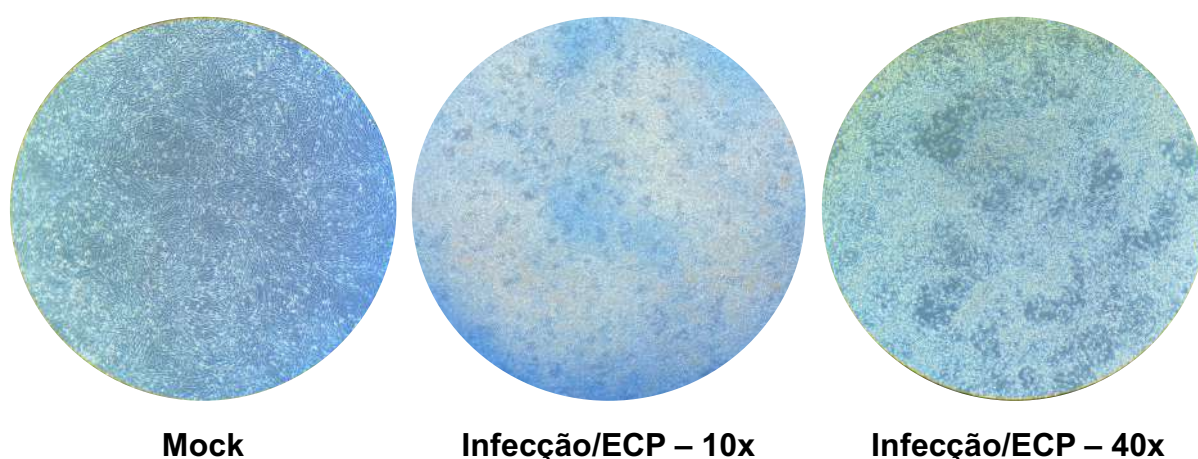


Figura 15. Microscópia do cultivo celular em células de *African green monkey kidney* (VERO), 6 dias depois da inoculação, da amostra 804_02_ES. Imagem à esquerda: Mock = garrafa controle negativo (sem inóculo) evidenciando o tapete celular íntegro; Imagem central, aumento de 10x: garrafa com infecção, tapete celular danificado e perda da integridade (ECP); Imagem à direita, aumento de 40x: garrafa com infecção, tapete celular danificado com perda da integridade/continuidade (ECP), células refringentes e com formato arredondado. É possível ver células mortas em suspensão.

6.6.2. Confirmação do isolamento viral por RT-qPCR

De acordo com os resultados da RT-qPCR (figura 16), foi possível verificar a diminuição do Cts em relação aos RNAs encaminhados (figura 14), comprovando a replicação viral e o aumento significativo da carga viral do isolado da amostra 804_02_ES. Os valores encontrados após a 1ª passagem foram: 804_02_ES #1p VERO (Ct: 10.89); 804_02_ES #1p C6/36 (Ct: 19.73) e 827_01_CE #1p C6/36 (Ct: 0.0). Além disso, foi possível verificar a diferença de aproximadamente de nove Cts entre a infecção realizada em cultivos celulares diferentes, VERO e C6/36. Após a 2ª passagem os Cts diminuíram novamente, alcançando os valores: 804_02_ES #2p VERO (Ct: 8.98); 804_02_ES #2p C6/36 (Ct: 11.34).

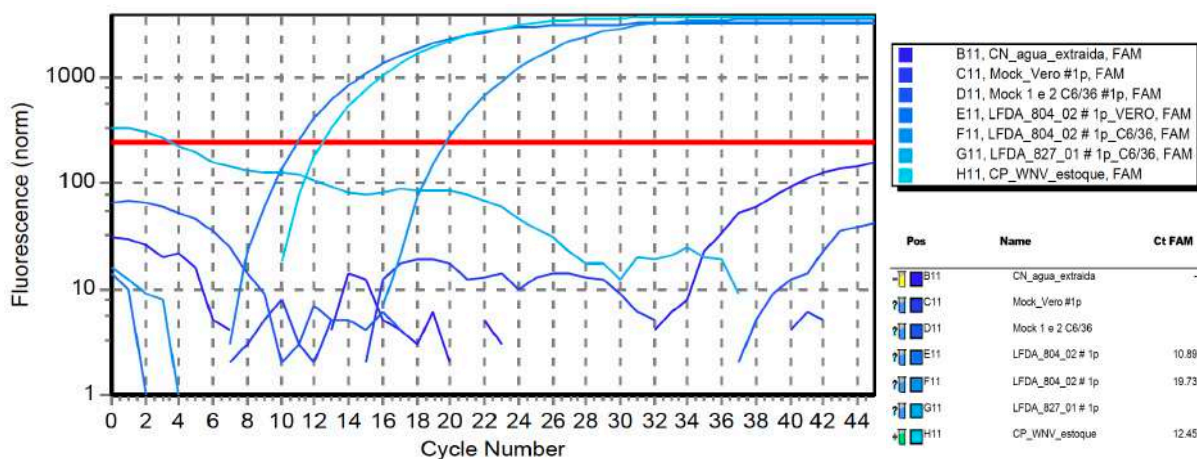


Figura 16. Curva de amplificação da RT-qPCR realizada a partir do RNA extraído do sobrenadante da 1ª passagem do isolamento do WNV realizado em células VERO e C6/36. Sobrenadante das amostras e os respectivos Cts: 804_02_ES #1p VERO (Ct: 10.89); 804_02_ES #1p C6/36 (Ct: 19.73); e 827_01_CE #1p C6/36 (Ct: 0.0). Reação realizada no aparelho Mastercycler® ep realplex (Eppendorf®).

6.6.3. Imunofluorescência indireta

A imunofluorescência foi realizada em células VERO e C6/36 coletadas após 5-6 dias da infecção e mostrou a presença de marcação para o vírus em região citoplasmática, confirmando, portanto, que a infecção pelo WNV ocorreu, e o isolamento viral também (Figura 17). Além disso, verifica-se uma diferença na eficiência da infecção entre os tipos celulares, de modo que as células VERO foram quase que completamente infectadas enquanto as células de *Aedes albopictus* (C6/36) foram infectadas em uma proporção inferior. A eficiência de infecção observada na figura 15 pode evidenciar o tropismo do WNV frente a infecção de outros gêneros de mosquitos, *Culex* sp. v.s. *Aedes* sp., demonstrando *in vitro*, que este vírus, como observado na natureza, tem transmissão primária pelos mosquitos do gênero *Culex*.

6.6.4. Sanger

Após ter resultados positivos pelas duas técnicas, realizou-se o sequenciamento clássico, por SANGER, do vírus oriundo da segunda passagem em células VERO. Os primers utilizados amplificam uma região de aproximadamente 1000 pb, porém recuperou-se cerca de 750 pb e por meio da ferramenta BLASTn

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), disponível no site do NCBI, confirmou-se que era o WNV.

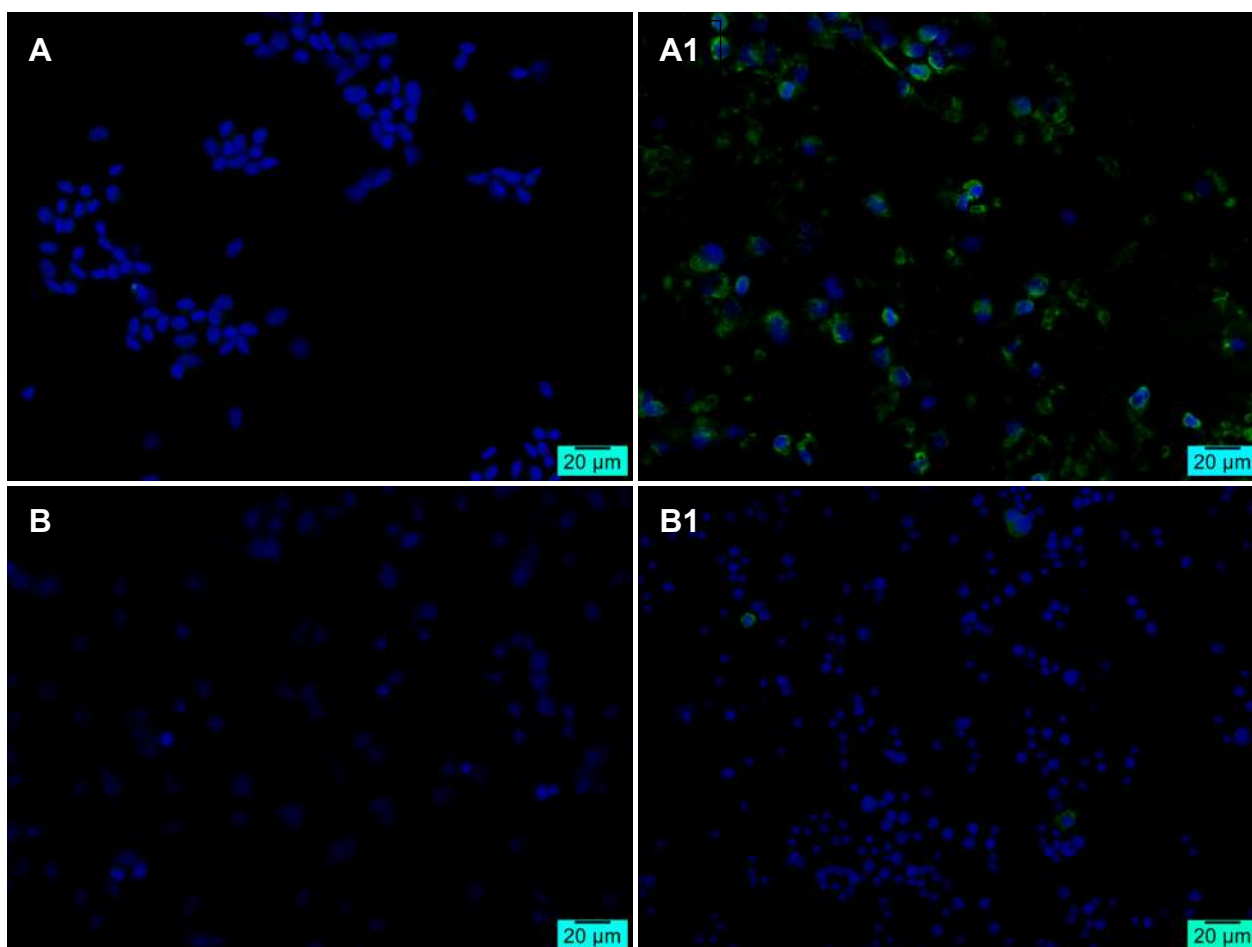


Figura 17. Técnica de Imunofluorescência Indireta da amostra 804_02_ES em células VERO (A) e C6/36 (B), 6 dias depois da inoculação (1ª passagem). Coloração: azul = núcleo celular (DAPI); verde = proteínas virais do WNV. A e B: Mock = controle negativo (sem inoculação) apenas células. A1 e B1: Infecção positiva evidenciando proteínas virais em verde ao redor do núcleo, em azul. Aumento de 40x.

6.6.5. Sequenciamento e análise bioinformática

Após todas as etapas prévias de confirmação, o RNA da 2ª passagem do isolado 804_02_ES e o RNA da amostra clínica do animal 827_01_CE foram encaminhados para sequenciamento por MiSeq Illumina (<https://www.illumina.com>) no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica (LMSeq), da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV).

Uma vez sequenciado foi feita a análise *de novo* usando um pipeline de bioinformática com foco em vírus. Os softwares utilizados na análise foram: FastQC versão 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>),

Trimmomatic versão 0.3.9 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) e AfterQC versão 0.9.7 (<https://github.com/OpenGene/AfterQC>). Para a montagem do vírus foi feito o mapeamento com base na cepa NY99, isolado de um equino, também do Espírito Santo, de 2018 (Acesso GenBank: MH643887) a fim de obter uma sequência de consenso. A sequência consenso final do animal 804_02_ES obteve 10.893 nucleotídeos de comprimento com uma identidade de 99,71% e 93,44%, para nucleotídeo e proteína, respectivamente. Não foi possível obter a sequência da amostra 827_01_CE.

O genoma 804_02_ES foi alinhado com o software MAFFT 7.0 usando um conjunto de dados obtido no NCBI e ViPR (<https://www.viprbrc.org>). Um total de 116 sequências (1953-2018) da distribuição mundial foram selecionados. O conjunto de dados foi editado e selecionado para uso em a árvore filogenética para manter a ORF inteira. A árvore de máxima verossimilhança (*Maximum-Likelihood*) foi realizada com o software IQ-TREE 2.0 (<http://www.iqtree.org>) em seleção automática, sendo GTR+F+I+G4 o melhor modelo de substituição de nucleotídeos, com análise de suporte de 10.000 replicas. Para a edição gráfica foi utilizado software iTOL v.5 (<https://itol.embl.de>) (Figura 18).

O genoma 804_02_ES (acesso GenBank: MT905060) foi filogeneticamente determinado como pertencente à linhagem WNV 1a, assim como o primeiro isolamento ocorrido em 2018 (acesso GenBank: MH643887), também no Espírito Santo (Município de São Mateus), divergindo em apenas 32 bases. TempEst v1.5.3 foi usado para realizar o relógio molecular para encontrar a hora dos Ancestrais Comuns Mais Recentes (tMRCA), e para inspecionar e identificar qualquer inconsistência em nossa sequência de acordo com todos os bancos de dados de estruturas.

******* O artigo referente aos resultados do isolamento, sequenciamento e caracterização do novo isolado do WNV, intitulado “Evidence for current circulation of an ancient West Nile virus strain (NY99) in Brazil” foi publicado Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/KfvjdzQwZsx9JGMSLHyM7LN/?lang=en>).**

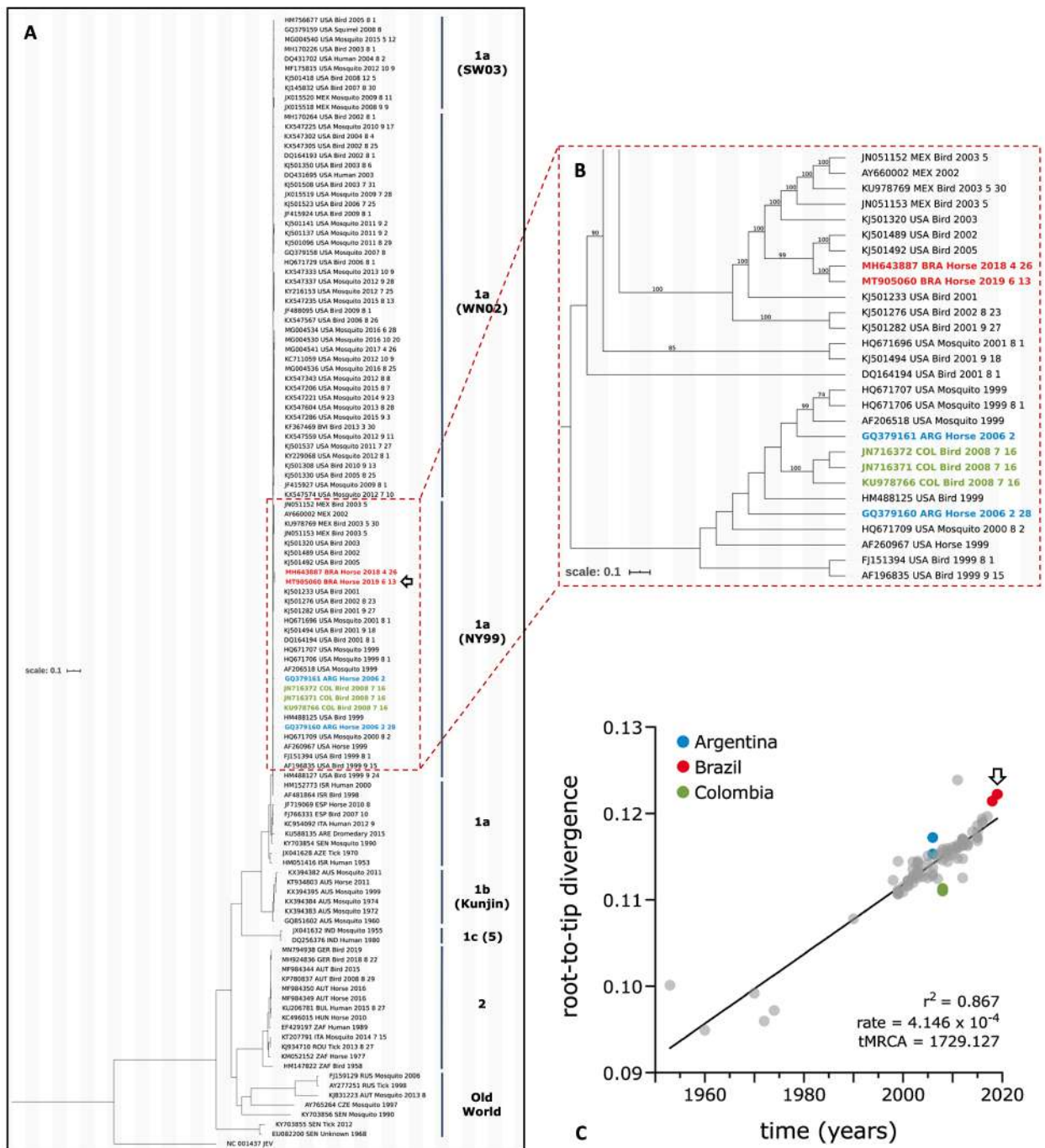


Figura 18. Reconstrução filogenética de máxima verossimilhança (Maximum-Likelihood - ML) do WNV de 1953–2019. (A) 117 sequências completas selecionadas do conjunto de dados global foram incluídas nesta análise, apresentando 0,1 substituições por site. O modelo de substituição GTR+F+I+G4 e suporte análises de 10.000 repetições foram utilizadas para obter a árvore filogenética; (B) caixa tracejada destacando as cepas da América do Sul (AS), incluindo o novo isolado (MT905060), que agrupa com linhagem 1a cepa NY99; apenas valores de bootstrap iguais ou maiores que 70% foram mantidos; (C) root-to-tip análises foram obtidas com TempEst, usando reconstrução ML obtida a partir de 94 genomas das linhagens 1a e 1b; correlação gráfica entre tempo (anos) e genética divergência (substituições por site) da raiz da árvore (tempo até o ancestral recente mais comum, tMRCA) às pontas (genomas amostrados) estão sendo mostrados; taxa de inclinação evolutiva: $4,146 \times 10^{-4}$ substituições/local/ano; contorno da seta preta = novo isolado. Todas as cepas coloridas pertencem à AS: Brasil (vermelho), Argentina (azul) e Colômbia (verde). Linhagens do velho mundo incluem: 3 (Rabensburg), 4a, 4b (9), 7 (Koutango) e 8.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Desde a sua introdução nos EUA, em 1999, o WNV causou uma epidemia até então nunca documentada, com óbitos humanos e animais (silvestres e domésticos) (NASH *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005a; WARD *et al.*, 2006; LADEAU *et al.*, 2007; KRAMER; STYER; EBEL, 2008; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). Em pouco mais de três anos o WNV havia chegado à costa oeste, atravessando todo o país (ROEHRIG, 2013; HADFIELD *et al.*, 2019). Dada a sua rápida dispersão gerou preocupação em diversos países, inclusive para a América do Sul, pois, diferente do que se conhecia para o SLEV, o WNV cursava com uma patogenia mais agressiva. De 2001 e 2004 o WNV foi detectado na América Central e Caribe (ESTRADA-FRANCO *et al.*, 2003; KOMAR *et al.*, 2006; ELIZONDO-QUIROGA, D.; ELIZONDO-QUIROGA, A., 2013), estabelecendo-se em novos territórios. Investigações realizadas em países da América do Sul revelaram a presença do WNV na Venezuela, em 2003 (BOSCH *et al.*, 2007), na Colômbia, em 2004 e 2008 (MATTAR *et al.*, 2005; OSORIO *et al.*, 2012), e na Argentina, em 2006 (MORALES *et al.*, 2006; DIAZ *et al.*, 2008) por meio de anticorpos e isolamento viral.

No Brasil, o Ministério da Saúde realizou um inquérito sorológico em 2003, em duas grandes áreas que recebem aves migratórias: Salina Diamante Branco, no Rio Grande do Norte e o Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Rio Grande do Sul (BRASIL, 2004a, 2004b). Apesar das quase 900 aves avaliadas, nenhuma evidência foi confirmada. Contudo, a partir de 2008 estudos conduzidos nas regiões central e oeste do Brasil, destacando-se a região pantaneira, detectaram anticorpos contra o WNV. Desde então, estados como Mato Grosso (2009), Mato Grosso do Sul (2009/2010), Paraíba (2009), Pará (2008/2010), Maranhão (2008/2010) e Rio Grande do Sul (2013) tiveram a detecção de anticorpos contra o WNV em animais (aves e equídeos) indicando uma possível circulação (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011; OMETTO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; CASTRO-JORGE *et al.*, 2019; WEBER *et al.*, 2021). Já em 2014 o primeiro caso humano foi registrado no Piauí (VIEIRA *et al.*, 2015).

Apesar desses estudos discutirem sobre a possibilidade do vírus estar circulando pelo país, ainda que de forma silenciosa, pois, nenhum surto ou epidemia foi registrada no Brasil desde então, somente em 2018 o primeiro isolamento viral foi

realizado, a partir de equinos com sintomatologia neurológica, no Estado do Espírito Santo (MARTINS *et al.*, 2019). De acordo com Silva *et al.* (2018), o surto acometeu ao menos 12 equinos, contudo esse número pode ter sido maior, pois Guimarães *et al.* (2022) detectaram mais nove animais com anticorpos neutralizantes para o WNV. A partir de então novos casos foram confirmados no ano de 2019, no ES e agora no Ceará (CE), ambos no mês de junho. Após a confirmação no LFDA/MG, as amostras foram encaminhadas para o LVM/FMRP/USP para que pudéssemos realizar o isolamento viral e sequenciamento. Uma nova RT-qPCR foi realizada e os dois animais foram confirmados, contudo apenas a amostra proveniente do equino do ES foi isolada e sequenciada completamente, confirmando, portanto, que o vírus está circulando no Brasil. Assim, pela primeira vez analisou-se que o WNV isolado pertencia a linhagem 1a e alinhava com a cepa original, NY99 (Figura 18) (SICONELLI *et al.*, 2021). Nos EUA, o vírus sofreu mutações na busca de adaptar-se as condições vetoriais do local, teoricamente, extinguindo a cepa original NY99 e dando origem as cepas WN02 [definida pela substituição de aminoácidos da proteína E (V159A)] e SW03 [definida pela substituição de aminoácidos nas proteínas NS4A (A85T) e NS5 (K314R)], o que conferiu vantagem adaptativa e culminou na sua dispersão por todo os EUA (HADFIELD *et al.*, 2019). Portanto, de acordo com a análise realizada por meio do relógio molecular, acredita-se que o WNV tenha sido introduzido no Brasil entre os anos de 2001 e 2005 (MARTINS *et al.*, 2019; SICONELLI *et al.*, 2021), o que vai de encontro com as últimas detecções dessa cepa, NY99, na América do Norte (HADFIELD *et al.*, 2019).

Após a confirmação desses casos, estudos retrospectivos detectaram, por sequenciamento, outros casos nos estados Pará (2017), Minas Gerais (2018), Bahia (2018/2019), Ceará (2019), Piauí (2020) e Paraná (2021) (COSTA *et al.*, 2021; PARANÁ, 2021; FRITSCH *et al.*, 2022; NETO *et al.*, 2023). E mais recente, o Estado do Tocantins foi o último a confirmar a detecção do WNV em um caso humano, de maio de 2023.

Muitos questionamentos foram feitos por Lorenz e Chiaravalloti-Neto (2022) e nosso grupo, pois, como o vírus estaria circulando por mais de duas décadas sem causar surtos ou uma epidemia, à semelhança do que foi visto nos EUA em 1999? A vigilância e o diagnóstico das encefalites, tanto em animais como em humanos, estão sendo feitas de forma inadequada ou insuficiente? Como e por que a cepa circulante

no Brasil ainda permanece como NY99? Não houve novas introduções deste vírus desde então ou essa cepa tem se mantido em algum reservatório não detectado nos EUA? Os vetores e aves são capazes de manter esse vírus de forma a produzir surtos esporádicos, ou apenas o mantem em níveis de sobrevivência? A diversidade de arboviroses circulantes no Brasil poderia estar fornecendo uma proteção heteróloga, evitando a amplificação desse vírus? A competência vetorial dos mosquitos brasileiros é menor do que os de outras regiões? (REIS *et al.*, 2023). É possível que ocorra a interferência viral entre os Flavivírus que circulam no Brasil e a cepa NY99 do WNV, em mosquitos, como descrito pelo nosso grupo de pesquisa entre os vírus dengue e febre amarela (ABRAO; FONSECA, 2016)? Embora muitas dessas perguntas ainda não tenham uma resposta concreta, investigações tem vem sendo feita no Estado de São Paulo desde a década de 70.

Três grandes estudos foram conduzidos na tentativa de identificar uma possível circulação do WNV em aves e equídeos, sendo: 1) entre 1978 e 1990 (FERREIRA *et al.*, 1994); 2) entre 2005 e 2006 (FREITAS, 2010); e 3) entre 2008/2009 (OMETTO, 2013). Contudo nada foi encontrado.

Anos se passaram sem nenhuma evidência de que o WNV pudesse estar circulando no estado, até que em julho de 2019, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (CDA/SP) notificou, por meio da Nota técnica 01/2019 – CEDESA/CDA, um equino positivo para o WNV a partir do diagnóstico molecular realizado no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, MG) (SÃO PAULO, 2019). Na sequência o caso foi notificado à Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA/OIE), listando o Estado de São Paulo como área de ocorrência para o WNV. Em decorrência disso, Bayeux *et al.* (2019) publicaram uma revisão em que relataram esse caso, um equino da raça American Trotter, sem sexo informado, de 20 anos, residente na zona leste de São Paulo, Município de Suzano. O CRMV/SP veiculou as mesmas informações, por meio de nota oficial em seu site. Costa *et al.* (2021) por meio de sequenciamento genético diagnosticaram um segundo caso no Estado de São Paulo, que teria ocorrido dias após o primeiro caso relatado, também em julho de 2019. Tratava-se de um equino sem raça informada, macho, de 13 anos, do Município de São Bernardo do Campo. Um ano depois, Siqueira *et al.* (2022) relatam dois equinos do ano de 2019, sendo um macho castrado, de 9 anos, da raça American Trotter, do

bairro de Itaquera, do Município de São Paulo, e o segundo, outro macho castrado, de 12 anos, sem raça informada, mas que era utilizada para hipismo, do Município de São Bernardo do Campo. Trata-se dos mesmos animais embora as informações sejam destoantes entre os relatos, o que causa certa confusão e desconfiança frente ao publicado.

O diagnóstico *post-mortem* em equídeos deve ser realizado preferencialmente a partir do SNC (BUSCH *et al.* 2008; ANGENVOORT *et al.*, 2013; CDC, 2013; PAHO/WHO, 2016), e não a partir do sangue (COSTA *et al.*, 2021; SIQUEIRA *et al.*, 2022), pois, em equinos e mamíferos de modo geral, os sinais clínicos surgem a partir do 6º dia, quando já não é mais possível detectar o vírus na corrente sanguínea, pois, teria sofrido *clearance* mediado pela presença de anticorpos neutralizantes (Figura 4) (BUNNING *et al.*, 2002; MINKE *et al.*, 2004; SEINO *et al.*, 2007; ANGENVOORT *et al.*, 2013). A detecção do WNV no Estado de São Paulo descrita por Costa *et al.* (2021) e Siqueira *et al.* (2022) contrapõem à investigação realizada pela Divisão de Vigilância de Zoonoses (DVZ), da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, e da Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo que, em investigação conjunta, não encontraram nenhuma evidência concreta da circulação do WNV nos animais amostrados no entorno do local provável de infecção (LPI) (SPINOLA, 2023; informação verbal - dados não publicados).

Outro ponto a ser considerado é que embora Siqueira *et al.* (2022) relate que os casos tenham sido confirmados posteriormente pelo Instituto Evandro Chagas, no Pará, laboratório de referência para o Ministério da Saúde, essas amostras foram enviadas primeiramente para um laboratório não oficial/não credenciado, o qual forneceu o diagnóstico positivo e a CEDESA/CDA acatou. O laboratório de referência para o diagnóstico de viroses do Ministério da Agricultura é LFDA/MG (LANAGRO/MG), no Município de Pedro Leopoldo/MG. A FNO está na categoria 1 da Instrução Normativa MAPA n. 50/2013 (BRASIL, 2013) e no Capítulo III, ANEXO 3, do ANEXO V, da Portaria de Consolidação n. 4, MS/GM (Portaria GM MS 782/2017) (BRASIL, 2017) devendo ser notificada diante da suspeita. O item 3.1., da Nota Técnica nº 5/2018/CGPZ/DSA/SDA/MAPA (BRASIL, 2018), orienta que as amostras animais colhidas diante da suspeita deverão ser encaminhadas para o LFDA/LANAGRO/MG, o que não foi feito.

Tendo em vista que o último inquérito no Estado de São Paulo, realizado em colaboração com o LVM/FMRP/USP e a Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (SVTA/IAL-SP), foi há aproximadamente 14 anos, aliados à enorme dificuldade de execução laboratorial de um novo inquérito na rotina dos órgãos oficiais e a existência de relatos epidemiológicos não oficiais confusos, foi criado um embrião de uma rede de investigação da circulação do WNV no Estado de São Paulo, a Rede ZooARBO SP. A Rede ZooARBO SP consiste em uma nova colaboração entre o LVM/FMRP/USP e o CP/IAL-SP, viabilizada pelo GAPPPS/FESIMA-SES/SP (Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde/ Fundo de Investimento para Educação Sanitária e Imunização em Massa contra Doenças Transmissíveis, da Secretaria Estadual de Saúde – São Paulo). A partir desta nova parceria, a rede reuniu diferentes instituições estaduais e municipais, em sua maioria públicas, com o objetivo de estabelecer a vigilância para o WNV e outras arboviroses causadoras de encefalites, por Flavivírus e Alphavírus. A ideia foi utilizar o fluxo do diagnóstico da raiva animal, que é bem consolidado em todo o Estado de SP e recolher amostras de equídeos que foram negativos para raiva, criando um novo fluxo de encaminhamento de amostras para a investigação etiológica de outras causas, com foco nas arboviroses. Além disso, a partir desse novo fluxo conseguiu-se reunir os empreendimentos de fauna (Zoológicos e CETRAS) e as UVZs, unidades importantes para a vigilância, principalmente para as arboviroses que tem seus ciclos enzoóticos em animais silvestres. Portanto, com o apoio da Secretaria Estadual da Saúde, a rede propôs um modelo de vigilância que fosse adaptável à estrutura física e operacional já existente no Estado de SP.

Foram estudados 1140 animais, 31,92% (364/1140) equídeos, sendo 62,64% (228/364) recebidos do IP/SP, 27,20% (99/364) do IB/SP e 10,16% (37/364) da FMVZ/Unesp. Do total, 68,08% (776/1140) eram animais selvagens, dos quais 59,56% (679/1140) eram aves.

Todas as aves encaminhadas ao CP/IAL-SP, 47,57% (323/679) foram submetidas à avaliação pela técnica da IHQ, sendo avaliados diferentes órgãos, como cérebro, coração, pulmão, fígado e baço. O protocolo adotado corrobora o orientado por Ellis *et al.* (2005), para que quando possível seja avaliado o maior número de tecidos, a fim de ampliar a sensibilidade de detecção, pois no estudo verificaram, pelo isolamento viral, uma positividade de 92% no cérebro e 75% no coração e, pela IHQ,

40% e 96%, respectivamente. Ademais, pelo fato de as aves apresentarem uma doença de caráter sistêmico (PANELLA *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2010) e haver ordens e espécies de maior ou menor susceptibilidade (KOMAR *et al.*, 2003; HAYES *et al.*, 2005a; TURELL *et al.*, 2005; BRASIL, 2016), não existe um padrão da infecção nestes animais. Isso se agrava ao analisarmos a diversidade da fauna brasileira, pois, embora algumas espécies tenham ocorrência aqui e em outros países, como o pardal-doméstico ou *house sparrow*, até o momento não se teve relato de isolamento ou detecção viral nessas aves no Estado de SP e no Brasil. Apesar de termos ampliado a sensibilidade do diagnóstico, avaliando diferentes tecidos e também ter utilizado dois anticorpos diferentes, um comercial e um referenciado pelo Instituto Evandro Chagas, todos os animais foram considerados negativos.

Do total de equídeos, apenas 20,33% (74/364) (Quadro 4) foram avaliados histopatologicamente e desses, apenas três apresentaram lesões compatíveis com uma encefalite não-supurativa e escasso infiltrado inflamatório perivascular, lesões essas compatíveis com o descrito por Cantile *et al.* (2000). Contudo, alguns autores relatam ser frequente a presença de hemorragia perivascular (CANTILE *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2014; TOPLU *et al.*, 2015). As lesões foram encontradas em fragmentos do tronco encefálico, cerebelo e cérebro. Cantile *et al.* (2001) e Williams *et al.* (2014) realizaram um estudo com 10 e sete cavalos, respectivamente onde verificaram que as regiões do SNC que mais apresentavam lesão e presença do vírus foram: tronco encefálico e medula espinhal. Portanto, esses fragmentos devem ser incluídos obrigatoriamente diante da suspeita tanto para o WNV, quanto para outras encefalites, como a raiva animal (PANAFTOSA/OPAS, 2010; BRASIL, 2022). Após a triagem pelo H&E, esses animais foram submetidos à IHQ, resultando negativo.

A qualidade do material a ser analisado, principalmente quando submetido a técnicas histopatológicas, deve ser priorizada, pois, a fixação realizada de forma incorreta pode prejudicar ou inviabilizar o diagnóstico. Todo material que será submetido à avaliação histopatológica deve ser fixado, geralmente em formalina, devendo ser acondicionada à temperatura ambiente (OPAS, 2010; BRASIL, 2017; TOCANTINS, 2019). As amostras dos equídeos utilizadas nesse estudo foram obtidas a partir do fluxo de encaminhamento já existente para o diagnóstico da raiva animal no Estado de SP, onde as amostras são enviadas refrigeradas ou congeladas (BARROS, 2003; SÃO PAULO, 2012; BRASIL, 2009, 2013, 2017, 2019, 2022). Dessa

maneira o material dos equídeos recebidos foi congelado por pelo menos uma vez, o que tornou as amostras inadequadas para o diagnóstico histopatológico. Apesar disso, todas as amostras foram avaliadas individualmente e aquelas que apresentavam morfologia relativamente conservada, cerca de 20% (74/364), foram fixadas em formalina tamponada 10%. Todas as amostras apresentaram algum grau de autólise (87,84% marcante; 9,46% moderada e 2,7% discreta) e todas apresentaram artefatos decorrentes do congelamento. No tocante as aves, cerca 52,43% (356/679) também passaram por alguma etapa de congelamento antes do animal passar pelo procedimento de necropsia/coleta de material. Já o restante, 323, tiveram a etapa pré-analítica realizada de forma mais adequada, sem congelamento prévio da carcaça, de modo que as amostras foram colhidas a partir da carcaça fresca ou refrigerada. Todas as amostras de aves testadas foram negativas na IHQ. Ellis *et al.* (2005) discute em seu trabalho que uma das maiores desvantagens das técnicas histopatológicas resultam dos processos de autólise e que quando submetidas à IHQ podem gerar um resultado inadequado. Apesar disso, o isolamento viral mante-se viável mesmo em amostras com autolisadas (ELLIS *et al.*, 2005). Estudos realizados com o vírus da raiva mostram que carcaças mantidas a 4°C por até 18 dias ou a 35°C por até três dias se mantêm positivas quando submetidas à PCR (MCELHINNEY *et al.*, 2014). Vírus de RNA são conhecidos pela sua susceptibilidade à degradação ambiental (FORDYCE *et al.*, 2013; MORGANTE *et al.*, 2015), sendo possível reverter isso com a utilização de soluções estabilizantes, principalmente do pH e enzimas, mantendo a molécula de RNA conservada e com isso ampliando a possibilidade de detecção (BLACKSELL; KHOUNSY; WESTBURY, 2004). A RT-qPCR mostra-se superior as demais técnicas, pois, a sua capacidade em detectar pequenos fragmentos de material, mesmo que a amostra já esteja parcialmente degradada, eleva a sensibilidade da técnica (CASTIGLIONE *et al.*, 2007; THERMOFISCHER, 2016).

Todas as amostras extraídas foram avaliadas com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-1000, onde a qualidade do RNA foi verificada, obtendo-se a relação da absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A maior parte das amostras apresentou qualidade satisfatória, entre 2,0 e 2,2 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; BARBAS III *et al.*, 2007; MORGANTE *et al.*, 2015) e mesmo as que estavam fora do esperado índice de pureza

também foram testadas pelo RT-qPCR. Fordyce *et al.* (2013) mostra em seu estudo que o RNA viral pode se manter estável por mais tempo do se conhece normalmente, possibilitando a sua detecção, mesmo em condições adversas.

Foram avaliados 867 animais por RT-qPCR para os conjuntos do WNV, SLEV, vírus dos gêneros Flavivírus e Alphavírus e em nenhuma amostra foi detectada a presença do RNA viral, sendo consideradas negativas. Ressalta-se ainda que para as aves mais de um tecido foi testado a fim de ampliar a capacidade de detecção (PANELLA *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2010).

Todos os resultados encontrados no presente estudo corroboram os trabalhos realizados até o momento no Estado de SP (FERREIRA *et al.*, 1994; FREITAS, OMETTO *et al.*, 2013; ORICO *et al.*, 2016), onde nenhuma evidência concreta foi encontrada, contrapondo-se aos resultados apresentados por Bayeux *et al.* (2019), Costa *et al.* (2021) e Siqueira *et al.* (2022). Entretanto, ao realizarmos o PRNT₈₀ de 11 pombos-comuns (*Columba livia*), seis apresentaram anticorpos neutralizantes contra a cepa padrão NY99, com títulos variando de 10 a 40, sendo considerados positivos. Esse é, portanto, o primeiro relato da evidência da circulação do WNV na região nordeste do estado, nos Município de Pirangi e Franca, ambos localizados a cerca de 100 Km de Ribeirão Preto/SP. Apesar dos animais terem apresentado sintomatologia neurológica, provavelmente o histórico clínico não se correlacione com o resultado, pois, o WNV não foi detectado pela RT-qPCR nas amostras de tecido. O PRNT₈₀ apresenta alta especificidade para o vírus testado, contudo outros arbovírus apresentam alta proximidade antigênica, como o SLEV e ILHV. Assim, esses animais deverão ser submetidos ao diferencial para confirmação.

Os achados reforçam a necessidade de implementar e ampliar a vigilância das arboviroses no Estado de São Paulo, com um olhar sentinela para as diferentes espécies animais e com técnicas de diagnóstico complementares.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

A ausência de detecção do WNV e dos outros arbovírus testados vem de encontro a outros trabalhos já realizados no Estado de São Paulo, contudo não isenta a possibilidade de estarem circulando de forma silenciosa em um ciclo enzoótico.

É possível, portanto, afirmar que o WNV circula no Estado de São Paulo, visto que pombos com doença neurológica apresentaram anticorpos contra o WNV, sendo o primeiro relato de positividade por meio de técnica PRNT₈₀, confirmatória para a infecção por este vírus.

Apesar disso, o presente estudo traz mais questionamentos do que respostas sobre a epidemiologia desse vírus no estado e no Brasil. Quais as ordens amplificadoras do WNV no Brasil e quais deveriam compor um sistema de vigilância sentinela? Seriam as mesmas encontradas nos EUA? Por que ainda não se detectou a circulação do WNV, como a que ocorreu nos EUA?

A vigilância de encefalites zoonóticas precisa ser organizada e desenvolvida, pois a região oeste do estado teve uma baixa capilaridade e pouca representatividade nas amostras coletadas neste estudo e existe uma rota de aves migratórias que inclui a bacia do Rio Paraná. E para isso os fluxos de coleta, armazenamento e envio do material devem ser melhorados para que os resultados possam expressar a realidade.

As áreas da saúde, agricultura e meio ambiente devem estar alinhadas para que essa vigilância possa acontecer e que diante de um caso confirmado as ações necessárias sejam tomadas em tempo hábil.

A formação da Rede ZooARBO SP foi essencial para a realização desse inquérito viral em todo o Estado de São Paulo, mostrando que é possível usar a estrutura já existente para que a vigilância seja ampliada, unindo diferentes instituições em prol de um mesmo objetivo. Finalmente, a investigação realizada em amostras coletadas pela rede corrobora com o fato de que, no Estado de São Paulo, o WNV não tem sido detectado em amostras oriundas de casos humanos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAO, E.P.; FONSECA, B. A L. Infection of Mosquito Cells (C6/36) by Dengue-2 Virus Interferes with Subsequent Infection by Yellow Fever Virus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 2, p. 124-130, 2016. DOI: 10.1089/vbz.2015.1804.

ALBAS, A.; FERRARI, C. I. L.; SILVA, L. H. Q.; BERNARDI, F.; ITO, F. H. Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 1, p. 19-22, 1999.

ANGENVOORT, J.; BRAULT, A. C.; BOWEN, R. A.; GROSCHUP, M. H. West Nile viral infection of equids. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1-2, p. 168-180, 2013. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.08.013.

ARAUJO, L. J. T.; SALAS-GÓMEZ, D.; KIMURA, L. M.; TAKAHASHI, J. F. P.; BARREL, J. S.; ROLLIN, D. C.; GUERRA, J. M. Culture Cell Block Controls as a Tool to the Biomolecular Diagnosis of Infectious Diseases. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 28, n. 6, p. 484-487, 2020. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000811.

BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Quantitation of DNA and RNA. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 1, n. 11, 2007.

BARROS, C. S. L. Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, 2003.

BAYEUX, J. J. M.; SILVA, A. S. G.; QUEIROZ, G. A.; SANTOS, B. S. Á. S.; ROCHA, M. N.; REHFELD, I. S.; FRANKLIN, L. F. S.; VALLE, L. B.; GUEDES, M. I. M. C.; TEIXEIRA, R. B. C.; COSTA, E. AZEVEDO. Epidemiological surveillance of West Nile vírus in the world and Brazil: relevance of equine surveillance in the context of "One Health". **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, 2019. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.164335

BERNKOPF, H.; LEVINE, S.; NERSON, R. Isolation of West Nile virus in Israel. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 93, n. 3, p. 207-218, 1953. DOI: 10.1093/infdis/93.3.207.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico – Febre do Nilo Ocidental**. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico – Febre do Nilo Ocidental**. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe / RS para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. 2004b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros**. 2. ed. Mapa/ACS, 2009. 124 p. (Manual técnico).

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus***. 1. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 76 p. (Série A. Normas e manuais técnicos).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Gabinete do Ministro. Instrução Normativa n 50, de 24 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, p. 47, 25 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. **Sistema Brasileiro de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)**. 2015. (Cartilha técnica).

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia Vigilância em Saúde**. 1. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 773 p.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Gabinete do Ministro. Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, 28 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Coordenação-geral de planejamento e avaliação zoossanitária (CGPZ). **NOTA TÉCNICA Nº 5/2018 – FICHA TÉCNICA FEBRE DO NILO OCIDENTAL - ORIENTAÇÕES AO SERVIÇO OFICIAL DE SAÚDE ANIMAL**. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Vigilância das Arboviroses. **Nota Informativa n. 123/2019 - Informa sobre a detecção do “Peruvian Horse Sickness Virus” durante investigação de epizootias de equídeos pelo vírus da Febre do Nilo Ocidental, Espírito Santo, Brasil, 2018 e 2019**. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia Vigilância em Saúde**. 5. ed. rev. e atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 1126 p.

BERNKOPF, H.; LEVINE, S.; NERSON, R. Isolation of West Nile virus in Israel. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 93, n. 3, p. 207-18, 1953.

BLACKSELL, S. D.; KHOUNSY, S.; WESTBURY, H. A. The effect of sample degradation and RNA stabilization on classical swine fever virus RT-PCR and ELISA methods. **Journal of Virological Methods**, v. 118, n. 1, p. 33-37, 2004. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.01.015.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. Doenças virais transmitidas por artrópodes & roedores. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, A.E. (Ed.). **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 375–393.

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

BUNNING, M. L.; BOWEN, R. A.; CROPP, C. B.; SULLIVAN, K. G.; DAVIS, B. S.; KOMAR, N.; GODSEY, M.; BAKER D.; HETTLER, D. L.; HOLMES, D. A.; BIGGERSTAFF, B. J.; MITCHELL, C. J. Experimental infection of horses with West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 380-386, 2002.

BUSCH, M. P.; KLEINMAN, S. H.; TOBLER, L. H.; KAMEL, H. T.; NORRIS, P. J.; WALSH, I.; MATUD, J. L.; PRINCE, H. E.; LANCIOTTI, R. S.; WRIGHT, D. J.; LINNEN, J. M.; CAGLIOTI, S. Virus and antibody dynamics in acute West Nile virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, p. 984 –993, 2008.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S.; WESTAWAY, E. G.; BRANDT, W. E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37– 43. 1989.

CAMPBELL, G. L.; MARFIN, A. A.; LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; West Nile virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 519-29, 2002.

CANTILE, C.; DI GUARDO, G.; ELENI, C.; ARISPICI, M. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 31-35, 2000. DOI: 10.2746/042516400777612080.

CANTILE, C.; DEL PIERO, F.; DI GUARDO, G.; ARISPICI, M. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occuring West Nile Virus Infection in Horses. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 4, p. 414-421, 2001.

CASTIGLIONE, F.; DEGL'INNOCENTI, D. R.; TADDEI, A.; GARBINI, F.; BUCCOLIERO, A. M.; RASPELLINI, M. R.; PEPI, M.; PAGLIERANI, M.; ASIRELLI, G.; FRESCHI, G.; BECHI, P.; TADDEI, G. L. Real-time PCR analysis of RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues: effects of the fixation on outcome reliability. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**. v. 15, n. 3, p. 338-342, 2007. DOI: 10.1097/01.pai.0000213119.81343.7b.

CASTILLO-OLIVARES, J. & WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 467–483, 2004.

CASTRO-JORGE, L. A.; SICONELLI, M. J. L.; RIBEIRO, B. S.; MORAES, F. M.; MORAES, J. B.; AGOSTINHO, M. R.; KLEIN, T. M.; FLORIANO, V. G.; FONSECA, B. A. L. West Nile virus infections are here! Are we prepared to face another flavivirus epidemic? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019. DOI:10.1590/0037-8682-0089-2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Division of Vector-Borne Diseases. **West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control**. Fort Collins, CO, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). ArboNET, Mosquito species in which West Nile virus has been detected, United States, 1999-2017. **Arboviral Diseases Branch**, 2017. <Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/46971>>

CHALHOUB, F. L. L.; QUEIROZ-JÚNIOR E. M.; DUARTE, B. H.; PINHEIRO-DE-SÁ, M. E.; CERQUEIRA-LIMA, P.; CARNEIRO-DE-OLIVEIRA, A.; CASSEB, L. M. N.; LEAL-DAS-CHAGAS, L.; MONTEIRO, H. A. O.; NEVES, M. S. A. S.; CHAVES, C. F.; MOURA, P. J. S.; RAPELLO-DO-NASCIMENTO, A. M.; PINHEIRO, R. G.; VIEIRA, A.

R. S.; MOURA, F. B. P.; RODRIGUES-DA-SILVA, L. O.; ESCÓSSIA, K. N. F.; CARANHA-DE-SOUSA, L.; RAMALHO, I. L. C.; LOPES-DA-SILVA, A. W.; MELLO, L. M. S.; FELIX-DE-SOUZA, F.; ALMEIDA, F. C.; RODRIGUES, R. S.; CHAGAS, D. V.; FERREIRA-DE-BRITO, A.; CAVALCANTE, K. R. L. J.; MARES-GUIA, M. A. M. M.; CAMPOS, V. M. G.; FARIA, N. R. C.; VIEIRA, M. A. C. S.; MENDONÇA, M. C. L.; PIVISAN, N. C. A. A.; MORENO, J. O.; VIEIRA, M. A. D.; GOMES, R. G. A.; ARAÚJO, F. M. C.; PASSOS, P. H. O.; RAMOS, D. G.; ROMANO, A. P. M.; CARÍCIO L. M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DE FILIPPIS, A. M. B.; PAUVOLID-CORRÊA, A. West Nile Virus in the State of Ceará, Northeast Brazil. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1699, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9081699.

CHANCEY C.; GRINEV A.; VOLKOVA E.; RIOS, M. The global ecology and epidemiology of West Nile Virus. **Biomed Research International**, 2015.

CHARREL, R. N.; BRAULT, A. C.; GALLIAN, P.; LEMASSON, J. J.; MURGUE, B.; MURRI, S.; PASTORINO, B.; ZELLER, H.; DE CHESSE, R.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. **Virology**, v. 315, n. 2, p. 381–388, 2003.

COLPITTS, T. M.; CONWAY, M. J.; MONTGOMERY, R. R.; FIKRIG, E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 635–648, 2012. DOI:10.1128/CMR.00045-12.

COSTA, E. A.; GIOVANETTI, M.; SILVA-CATENACCI, L.; FONSECA, V.; ABURJAILE, F. F.; CHALHOUB, F. L. L.; XAVIER, J.; CAMPOS-DE-MELO-IANI, F.; VIEIRA, M. A. C. S.; FREITAS-HENRIQUES, D.; MEDEIROS, D. B. A.; GUEDES, M. I. M. C.; SANTOS, B. S. Á. S.; GONÇALVES-SILVA, A. S.; MARANHÃO, R. P. A.; FARIA, N. R. C.; SIQUEIRA, R. F.; OLIVEIRA, T.; CAVALCANTE, K. R. L. J.; MOURA, N. F. O.; ROMANO A. P. M.; ALBUQUERQUE, C. F. C.; FEITOSA, L. C. S.; BAYEUX, J. J. M.; TEIXEIRA, R. B. C.; LOBATO, O. L.; COSTA-SILVA, S.; FILIPPIS A. M. B.; VENÂNCIO-DA-CUNHA, R.; LOURENÇO, J.; ALCANTARA, L. C. J. West Nile Virus in Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 896, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10070896.

CUNHA, M. S.; COSTA, A. C.; FERNANDES, N. C. C. A.; GUERRA, J. M.; SANTOS, F. C. P.; NOGUEIRA, J. S.; D'AGOSTINO, L. G.; KOMNINAKIS, S. V.; WITKIN, S. S.; RESSIO, R. A.; MAEDA, A. Y.; VASAMI, F. G. S.; KAIGAWA, U. M. A.; AZEVEDO, L. S.; FACIOLI, P. A. S.; MACEDO, F. L. L.; SABINO, E. C.; LEAL, E.; SOUZA, R. P. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new áreas (2016–2017). **Scientific Reports**, 2019.

CUNHA, M. S.; LUCHS, A.; SANTOS, F. C. P.; CALEIRO, G. S.; NOGUEIRA, M. L.; MAIORKA, P. C. Applying a pan-flavivirus RT-qPCR assay in Brazilian public health surveillance. **Archives of Virology**, v. 165, n. 8, p. 1863-1868, 2020. DOI: 10.1007/s00705-020-04680-w.

DAWSON, J. R.; STONE, W. B.; EBEL, G. D.; YOUNG, D. S.; GALINSKI, D. S.; PENSABENE, J. P.; FRANKE, M. A.; EIDSON, M.; KRAMER, L. D. Crow deaths caused by West Nile virus during winter. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1912-1914, 2007. DOI: 10.3201/eid1312.070413.

DIAZ, L. A.; KOMAR, N.; VISINTIN, A.; DANTUR JURI, M. J.; STEIN, M.; LOBO ALLENDE, R.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W. Contigiani, M. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689-691, 2008.

DOMINGO, C.; PATEL, P.; LINKE, S.; ACHAZI, K.; NIEDRIG M. Molecular diagnosis of flaviviruses. **Future Virology**, v. 6, n. 9, p. 1059–1074, 2011.

DUSEK, R. J.; MCLEAN, R. G.; KRAMER, L. D.; UBICO, S. R.; DUPUIS-II, A. P.; EBEL, G. D.; GUPTILL, S. C. Prevalence of West Nile virus in migratory birds during spring and fall migration. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 6, p. 1151-1158, 2009. DOI: 10.4269/ajtmh.2009.09-0106.

EIDEN, M.; VINA-RODRIGUEZ, A.; HOFFMANN, B.; ZIEGLER, U.; GROSCHUP, M. H. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 748–753, 2010.

ELIZONDO-QUIROGA, D.; ELIZONDO-QUIROGA, A. West Nile virus and its theories, a big puzzle in Mexico and Latin America. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 168-175, 2013. DOI: 10.4103/0974-777X.122014.

ELLIS, A. E.; MEAD, D. G.; ALLISON, A. B.; GIBBS, S. E. J.; Gottdenker, N. L.; STALLKNECHT, D. E.; HOWERTH, E. W. Comparison of Immunohistochemistry and Virus Isolation for Diagnosis of West Nile Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2904–2908, 2005.

ESTRADA-FRANCO, J. G.; NAVARRO-LOPEZ, R.; BEASLEY, D. W.; COFFEY, L.; CARRARA, A. S.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.; CLEMENTS, T.; WANG, E.; LUDWIG, G. V.; CORTES, A. C.; RAMÍREZ, P. P.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D.; WEAVER, S. C. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1604-1607, 2003. DOI: 10.3201/eid0912.030564.

FALL, G.; DI PAOLA, N.; FAYE, M.; DIA, M.; FREIRE, C. C. M.; LOUCOUBAR, C.; ZANOTTO, P. M. A.; FAYE, O.; SALL, A. A. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus (DWC Beasley, Ed.). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1-23, 2017.

FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M.; MARTI, A. T.; SOUZA, L. T.; IVERSSON, L. B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest Region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 3, p. 265-274, 1994. DOI: 10.1590/s0036-46651994000300011.

FORDYCE, S. L.; KAMPMANN, M. L.; VAN DOORN, N. L.; GILBERT, M. T. Long-term RNA persistence in postmortem contexts. **Investigative Genetics**, v. 4, n. 1, p. 7, 2013. DOI: 10.1186/2041-2223-4-7.

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

FRIEDRICH, B. M. and BEASLEY, D. W. C. ELISA and Neutralization Methods to Measure Anti-West Nile Virus Antibody Responses in: COLPITTS T. M. (ed.), **West Nile Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, cap. 11, v. 1435, 2016. p. 129-141.

FRITSCH, H.; PEREIRA, F. M.; COSTA, E. A.; FONSECA, V.; TOSTA, S.; XAVIER, J.; LEVY, F.; OLIVEIRA, C.; MENEZES, G.; LIMA, J.; SANTOS, L.; SILVA, L.; NARDY, V.; ASTETE, M. K. G.; SANTOS, B. S. Á. D. S.; AGUIAR, N. R.; GUEDES, M. I. M. C.; FARIA, G. C.; FURTINI, R.; DRUMOND, S. R. M.; CUNHA, G. M.; SOUZA, M. S. P. L.; JESUS, R.; GUIMARÃES, S. A. F.; NUNO, I. C.; SANTANA, I. C. B.; SÁ, J. E. U.; SANTOS, G. R.; SILVA, W. S.; GUEDES, T. F.; ARAÚJO, E. L. L.; SAID, R. F. D. C.; ALBUQUERQUE, C. F. C.; PETERKA, C. R. L.; ROMANO, A. P. M.; CUNHA, R. V. D.; FILIPPIS, A. M. B.; LEAL-E-SILVA-DE-MELLO, A.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. J. Retrospective Investigation in Horses with Encephalitis Reveals Unnoticed Circulation of West Nile Virus in Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1540, 2022. DOI: 10.3390/v14071540.

GILADI, M.; METZKOR-COTTER, E.; MARTIN, D. A.; SIEGMAN-IGRA, Y.; KORCZYN, A. D.; ROSSO, R.; BERGER, S. A.; CAMPBELL, G. L.; LANCIOTTI, R. S. West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 659-661, 2001. DOI: 10.3201/eid0704.010410.

GIRY, C.; ROQUEBERT, B.; LI-PAT-YUEN, G.; GASQUE, P.; JAFFAR-BANDJEE, M. C. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 164, 2017. DOI: 10.1186/s12866-017-1080-9.

GOTTDENKER, N. L.; HOWERTH, E. W.; MEAD, D. G. Natural infection of a great egret (*Casmerodius albus*) with eastern equine encephalitis virus. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 3, p. 702–706, 2003.

GUIMARÃES, M. C. N.; FREITAS, M. N. O.; SOUSA, A. W.; CUNHA, M. A. C. R.; ALMADA, G. L.; ROMANO, A. P. M.; SANTOS, M. G. D. P.; RODRIGUES, G. A. P.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; CASSEB, L. M. N. Serological Evidence of Arboviruses in Horses During West Nile Fever Monitoring Surveillance in Southeastern Brazil. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, 2022. DOI: 10.3389/fitd.2022.881710

HADFIELD, J.; BRITO, A. F.; SWETNAM, D. M.; VOGELS, C. B. F.; TOKARZ, R. E.; ANDERSEN, K. G.; SMITH, R. C.; BEDFORD, T.; GRUBAUGH, N. D. Twenty years of West Nile virus spread and evolution in the Americas visualized by Nextstrain. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 10, 2019. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008042.

HAYES, E. B.; KOMAR, N.; NASCI, R. S.; MONTGOMERY, S. P.; O'LEARY, D. R.; CAMPBELL, G. L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1167-1173, 2005a.

HAYES, E. B.; SEJVAR, J. J.; ZAKI, S. R.; LANCIOTTI, R. S.; BODE, A. V.; CAMPBELL, G. L. Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p.1174-1179, 2005b.

HUGHES, T. P.; PAUL, J. H.; SMITHBURN, K. C.; BURKE, A. W. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1-20, n. 4, p. 471-492, 1940.

HURLBUT, H. S.; RIZK, F.; TAYLOR, R. M.; WORK, T. H. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, n. 4, p. 579-620, 1956.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa da Pecuária Municipal. **População de equinos do Estado de São Paulo**. 2021. <Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/sp>>

JIA, X.; BRIESE, T.; JORDAN, I.; RAMBAUT, A.; CHI, H. C.; MACKENZIE, J. S.; HALL, R. A.; SCHERRET, J.; LIPKIN, W. I. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. **The Lancet**, v. 354, n. 9194, p. 1971-1972, 1999.

JIMENEZ-CLAVERO, M. A.; AGUERO, M.; ROJO, G.; GOMEZ-TEJEDOR. A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile Viruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 459-462, 2006.

JOHNSON, D. J.; OSTLUND, E. N.; PEDERSEN, D. D.; SCHMITT, B. J. Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 739–741, 2001.

JOURDAIN, E.; GAUTHIER-CLERC, M.; BICOUT, D. J.; SABATIER, P. Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 365-372, 2007. DOI: 10.3201/eid1303.060301.

KLENK, K.; KOMAR, N. Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 260-262, 2003.

KOMAR, N.; LANGEVIN, S.; HINTEN, S.; NEMETH, N.; EDWARDS, E.; HETTLER, D.; DAVIS, B.; BOWEN, R.; BUNNING, M. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 311-322, 2003.

KOMAR, N.; CLARK, G. G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 19, n. 2, p. 112-117, 2006. DOI: 10.1590/s1020-49892006000200006.

KOSTIUKOV, M. A.; GORDEEVA, Z. E.; BULYCHEV, V. P.; NEMOVA, N. V.; DANIIAROV, O. A. The lake frog (*Rana ridibunda*)--one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan--a reservoir of the West Nile fever virus. **Meditssinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni**, n. 3, p. 49-50, 1985.

KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 61-81, 2008. DOI: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093258.

KULASEKERA, V. L.; KRAMER, L.; NASCI, R. S.; MOSTASHARI, F.; CHERRY, B.; TROCK, S. C.; GLASER, C.; MILLER, J. R. West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 722-725, 2001.

KUNO, G.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; KARABATSOS, N.; CROPP, C. B. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73-83, 1998.

LADÉAU, S. L.; KILPATRICK, A. M.; MARRA, P. P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 710-713, 2007. DOI: 10.1038/nature05829.

LANCIOTTI, R. S.; ROEHRIG, J. T.; DEUBEL, V.; SMITH, J.; PARKER, M.; STEELE, K.; CRISE, B.; VOLPE, K. E.; CRABTREE, M. B.; SCHERRET, J. H.; HALL, R. A.; MACKENZIE, J. S.; CROPP, C. B.; PANIGRAHY, B.; OSTLUND, E.; SCHMITT, B.; MALKINSON, M.; BANET, C.; WEISSMAN, J.; KOMAR, N.; SAVAGE, H. M.; STONE, W.; MCNAMARA, T.; GUBLER, D. J. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2333-2337, 1999. DOI: 10.1126/science.286.5448.2333.

LANCIOTTI, R. S.; KERST, A. J.; NASCI, R. S.; GODSEY, M. S.; MITCHELL, C. J.; SAVAGE, H. M.; KOMAR, N.; PANELLA, N. A.; ALLEN, B. C.; VOLPE, K. E.; DAVIS, B. S.; ROEHRIG, J. T. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066–4071, 2000.

LANCIOTTI, R. S. and KESRT, A. J. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assays for Rapid Detection of West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4506–4513, 2001.

LANCIOTTI, R. S.; EBEL, G. D.; DEUBEL, V.; KERST, A. J.; MURRI, S.; MEYER, R.; BOWEN, M.; MCKINNEY, N.; MORRILL, W. E.; CRABTREE, M. B.; KRAMER, L. D.; ROEHRIG, J. T. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96–105, 2002.

LANCIOTTI, R. S. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 67–99, 2003.

LINDENBACH, B. D.; MURRAY, C. L.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 6th Edition. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 712-746.

LORENZ, C.; CHIARAVALLOTTI-NETO, F. Why are there no human West Nile virus outbreaks in South America? **The Lancet Regional Health – Americas**, v.12, 2022. DOI: 10.1016/j.lana.2022.100276.

LUSTIG, Y.; SOFER, D.; BUCRIS, E. D.; MENDELSON, E. Surveillance and diagnosis of west nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2421, 2018.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Veterinary Journal** (London, England: 1997), v. 195, n. 1, p. 33–40, 2013.

MALKINSON, M.; BANET, C. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, n. 267, p. 309-322, 2002. DOI: 10.1007/978-3-642-59403-8_15.

MALKINSON, M.; BANET, C.; WEISMAN, Y.; POKAMUNSKI, S.; KING, R.; DROUET, M. T.; DEUBEL, V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 392-397, 2002. DOI: 10.3201/eid0804.010217.

MARANHÃO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde. **ALERTA/CIEVS/SES-MA N. 12 – 24/05/2023**. 2023. Disponível em: <https://www.saude.ma.gov.br/wp-content/uploads/2023/06/ALERTA-No-12-FEBRE-DO-NILO-NO-ESTADO-DO-TOCANTIS-1.pdf>

MARR, J. S.; CALISHER, C. H. Alexander the Great and West Nile virus encephalitis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1599–1603, 2003.

MARTINS, L. C.; SILVA, E. V. P.; CASSEB, L. M. N.; SILVA, S. P.; CRUZ, A. C. R.; PANTOJA, J. A. S. P.; MEDEIROS, D. B. A.; MARTINS-FILHO, A. J.; CRUZ, E. R. M.; ARAÚJO, M. T. F.; CARDOSO, J. F.; CUNHA, M. A. C. R.; ALMADA, G. L.; ROMANO, A. P. M.; SANTOS, M. G. D. P.; RODRIGUES, G. A. P.; CHIANG, J. O.; QUARESMA, J. A. S.; CARVALHO, V. L.; VASCONCELOS, P. F. C. First isolation of West Nile virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

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

MCELHINNEY, L. M.; MARSTON, D. A.; BROOKES, S. M.; FOOKS, A. R. Effects of carcase decomposition on rabies virus infectivity and detection. **Journal of Virological Methods**, n. 207, p. 110-113, 2014. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.024.

MCINTOSH, B. M.; JUPP, P.G.; SANTOS, I.; MEENEHAN, G.M. Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. **South African Journal of Science**, v. 72, n. 10, p. 295–300, 1976.

MELANDRI, V.; GUIMARÃES, A. E.; KOMAR, N.; NOGUEIRA, M. L.; MONDINI, A.; FERNANDEZ-SESMA, A.; ALENCAR, J.; BOSCH, I. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.

MINKE, J. M.; SIGER, L.; KARACA, K.; AUSTGEN, L.; GORDY, P.; BOWEN, R.; RENSHAW, R. W.; LOOSMORE, S.; AUDONNET, J. C.; NORDGREN, B. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. **Archives of Virology - Supplementa**, n. 18, p. 221-230, 2004. DOI: 10.1007/978-3-7091-0572-6_20.

MONACO, F.; LELLI, R.; TEODORI, L.; PINONI, C.; DI GENNARO, A.; POLCI, A.; CALISTRI, P.; SAVINI, G. Re-emergence of West Nile virus in Italy. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7-8, p. 476–486, 2010.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F.C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, n. 64, p. 160–173, 2015. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.08.030.

MONINI, M.; FALCONE, E.; BUSANI, L.; ROMI, R.; RUGGERI, F. M. West Nile Virus: Characteristics of an African Virus Adapting to the Third Millennium World. **The Open Virology Journal**, v. 4, p. 42–51, 2010.

MONTECINO-LATORRE, D., BARKER, C.M. Overwintering of West Nile virus in a bird community with a communal crow roost. **Scientific Reports**, n. 8, p. 6088, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-24133-4.

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

MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. da C. Q.; SILVA, A. K.; OLIVEIRA, T. N. de; GUIMARAES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Protocolo de extração de RNA total de *Arachis* spp. e avaliação do efeito de contaminantes por meio de análises espectrofotométricas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 121 – EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2015.

MOUREAU, G.; TEMMAM, S.; GONZALEZ, J. P.; CHARREL, R. N.; GRARD, D.; LAMBALLERIE, X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 467–477, 2007.

MURGUE, B.; MURRI, S.; TRIKI, H.; DEUBEL, V.; ZELLER, H. G. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 117-126, 2001.

MURRAY, K.; WALKER, C.; HERRINGTON, E.; LEWIS, J. A.; MCCORMICK, J.; BEASLEY, D. W. C.; TESH, R. B.; FISHER-HOCH, S. Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 1, p. 2– 4, 2010.

MURRAY, K. O.; WALKER, C.; GOULD, E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 6, p. 807– 817, 2011.

NASH, D.; MOSTASHARI, F.; FINE, A.; MILLER, J.; O'LEARY, D.; MURRAY, K.; HUANG, A.; ROSENBERG, A.; GREENBERG, A.; SHERMAN, M.; WONG, S.; LAYTON, M. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 24, p. 1807-14, 2001. DOI: 10.1056/NEJM200106143442401.

NETO, J. P. N.; REIS, L. A. M.; FREITAS, M. N. O.; NASCIMENTO, B. L. S.; CHAGAS, L. L.; COSTA, H. H. M.; RODRIGUES, J. C. P.; BRAGA, C. M.; SILVA, E. V. P.; SILVA, S. P.; MARTINS, L. C. First Isolation and Genome Sequence Analysis of West Nile Virus in Mosquitoes in Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 4, p. 237, 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8040237.

NIJDAM, P. **Establishment of an immunohistochemical method to detect West Nile virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues**. 2010. 39 f. (Research internship Master). Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, 2010.

NORRIS, D. E. Mosquito-borne diseases as a consequence of land use change. **EcoHealth**, v.1, n.1, p. 19-24, 2004. DOI: 10.1007/s10393-004-0008-7

O'BRIEN, V. A.; METEYER, C. U.; REISEN, W. K.; IP, H. S.; BROWN, C. R. Prevalence and pathology of West Nile virus in naturally infected house sparrows, western Nebraska, 2008. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 937-944, 2010. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0515.

OIE. World Organization for animal health. **One Health**. 2017. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>>

OIE. World Organization for Animal Health. **West Nile Fever**. In: OIE Terrestrial Manual, 2018.

OMETTO, T. L. **Monitoramento do vírus do Oeste do Nilo no Brasil**, 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) – USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo.

OMETTO, T. L.; DURIGON, E. L.; ARAUJO, J.; APRELON, R.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; MELO, R. M.; LEVI, J. E.; AZEVEDO-JUNIOR, S. M.; PETRY, M. V.; SIMÃO-NETO, I.; SERAFINI, P.; VILLALOBOS, E.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; NAVA, A. F. D.; NARDI, M. S.; HURTADO, R.; RODRIGUES, R.; SHERER, A. L.; SHERER, J. F. M.; GERALDI, M. P.; SEIXAS, M. M. M.; PETERKA, C.; BANDEIRA, D. S.; PRADEL, J.; VACHIERY, N.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; LANCIOTTI, R.; LEFRANÇOIS, T. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723-730, 2013.

OSORIO, J. E.; CIUODERIS, K. A.; LOPERA, J. G.; PIEDRAHITA, L. D.; MURPHY, D.; LEVASSEUR, J.; CARRILLO, L.; OCAMPO, M. C.; HOFMEISTER, E. Characterization of West Nile viruses isolated from captive American Flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellin, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 565-572, 2012. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0655.

ORICO, L. D.; FERNANDES, L. N.; MELO, M. A.; ZWARG, T.; LEVI, J. E.; MARRELLI, M. T. A survey of flaviviruses in birds in green areas of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 494-497, 2016. DOI: doi:10.1590/0037-8682-0426-2015.

OWEN, J.; MOORE, F.; PANELLA, N.; EDWARDS, E.; BRU, R.; HUGHES, M.; KOMAR, N. Migrating Birds as Dispersal Vehicles for West Nile Virus. **EcoHealth Journal Consortium**, 2006. DOI: 10.1007/s10393-006-0025-9.

PAHO (Pan American Health Organization). WHO (World Health Organization) – regional office for Americas. **West Nile Virus: Detection and Laboratory Diagnosis**. 2016.

PALMIERI, C.; FRANCA, M.; UZAL, F.; ANDERSON, M.; BARR, B.; WOODS, L.; MOORE, J.; WOOLCOCK, P.; SHIVAPRASAD, H. L. Pathology and

Immunohistochemical Findings of West Nile Virus Infection in Psittaciformes
Veterinary Pathology, v. 48, n. 5, p. 975-984, 2011. DOI:
10.1177/0300985810391112.

PANAFTOSA (Centro Pan-Americano de Febre Aftosa). OPAS (Organização Pan Americana de Saúde). Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico. **Cooperação Técnica MAPA/OPAS-PANAFTOSA para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2010. 218 p. (Série de Manuais Técnicos, 13)

PANELLA, N. A.; KERST, A. J.; LANCIOTTI, R. S.; BRYANT, P.; WOLF, B.; KOMAR, N. Comparative West Nile virus detection in organs of naturally infected American Crows (*Corvus brachyrhynchos*). **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 754-755, 2001. DOI: 10.3201/eid0704.010430.

PAPA, A.; DANIS, K.; ATHANASIADOU, A.; DELIANIDOU, M.; PANAGIOTOPOULOS, T. Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1857-1860, 2011. DOI: 10.1002/jmv.22190.

PAPA, A.; ANASTASIADOU, A.; DELIANIDOU, M. West Nile virus IgM and IgG antibodies three years post- infection. **Hippokratia**, v. 19, n. 1, p. 34–36, 2015.

PARANÁ (Estado). Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Coordenação do Programa Estadual de Sanidade dos Equídeos e equipe GSA. **NOTA TÉCNICA GSA 01/2021**. 2021.

PATEL, P.; LANDT, O.; KAISER, M.; FAYE, O.; KOPPE, T.; LASS, U.; SALL, A. A.; NIEDRIG, M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, n. 10, p. 58, 2013. DOI: 10.1186/1743-422X-10-58.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M. A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L. T.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; NOGUEIRA, M. F.; SILVA, E. E.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAYR, H. G. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

PRINCE, H. E.; TOBLER, L. H.; LAPE-NIXON, M.; FOSTER, G. A.; STRAMER, S. L.; BUSCH, M. P. Development and persistence of West Nile virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4316–4320, 2005.

RAPPOLE JH, DERRICKSON SR, HUBÁLEK Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, p. 319-328, 2000. DOI: 10.3201/eid0604.000401.

READ, R. W.; RODRIGUEZ, D. B.; SUMMERS, B. A. West Nile virus encephalitis in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 219–222, 2005.

REED, K. D.; MEECE, J. K.; HENKEL, J. S.; SHUKLA, S. K. Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. **Clinical Medical & Research**, v. 1, n. 1, p. 5-12, 2003. DOI: 10.3121/cmr.1.1.5

REIS, L. A. M.; SILVA, E. V. P. D.; DIAS, D. D.; FREITAS, M. N. O.; CALDEIRA, R. D.; ARAÚJO, P. A. D. S.; SILVA, F. S. D.; ROSA-JUNIOR, J. W.; BRANDÃO, R. C. F.; NASCIMENTO, B. L. S. D.; MARTINS, L. C.; NETO, J. P. N. Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* from Brazil for West Nile virus. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 4, p. 217, 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8040217.

REISEN, W. K. Epidemiology. In: MARCONDES, C. B. **Arthropod borne diseases**, Switzerland, Springer, 2017, cap. 2, p. 7-34.

RIDPATH, J. F.; BAUERMANN, F. V.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria, Ed. da UFSM, 2017, 3 ed., cap. 23, p. 675-705.

ROEHRIG, J. T. West Nile virus in the United States— A Historical Perspective. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3088–3108, 2013.

ROBLES-FERNÁNDEZ, Á. L.; SANTIAGO-ALARCON, D.; LIRA-NORIEGA, A. Wildlife susceptibility to infectious diseases at global scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, n. 119, p. 1–12, 2022.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Londres: CSHL Press, 2001. 1448 p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”. **Guia de vigilância epidemiológica**. 1. ed. São Paulo: CVE, 2012. 656 p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Defesa Agropecuária. Centro de Defesa Sanitária Animal. **NOTA TÉCNICA CEDESA N. 01/2019**. Assunto: Ocorrência de Febre do Nilo Ocidental em Equino do Estado de São Paulo. 2019.

SEINO, K. K.; LONG, M. T.; GIBBS, E. P.; BOWEN, R. A.; BEACHBOARD, S. E.; HUMPHREY, P. P.; DIXON, M. A.; BOURGEOIS, M. A. Comparative efficacies of three commercially available vaccines against West Nile Virus (WNV) in a short-duration challenge trial involving an equine WNV encephalitis model. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1465-1471, 2007. DOI: 10.1128/CVI.00249-07.

SEJVAR, J. J. West nile virus: an historical overview. **Ochsner Journal**, v. 5, n. 3, p. 6-10, 2003.

SHI, P. Y.; KAUFFMAN, E. B.; REN, P.; FELTON, A.; TAI, J. H.; DUPUIS II, A. P.; JONES, S. A.; NGO, K. A.; NICHOLAS, D. C.; MAFFEI, J.; EBEL, G. D.; BERNARD, K. A.; KRAMER, L. D. High-throughput detection of West Nile vírus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1264-71, 2001.

SICONELLI, M. J. L.; JORGE, D. M. M.; CASTRO-JORGE, L. A.; FONSECA-JÚNIOR, A. A.; NASCIMENTO, M. L.; FLORIANO, V. G.; SOUZA, F. R.; QUEIROZ-JÚNIOR, E. M.; CAMARGOS, M. F.; COSTA, E. D. L.; CARVALHO, A. A. B.; FONSECA, B. A. L. Evidence for current circulation of an ancient West Nile virus strain (NY99) in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1-5, 2021. DOI: 10.1590/0037-8682-0687-2020.

SIQUEIRA, R. F.; HANSEN, V. S.; MARTINS, M. F. M.; LEAL, M. L. R.; BONDAN, E. F. Infecção pelo vírus da Febre do Nilo Ocidental em equinos no Estado de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 50, n. 1, p. 737, 2022. DOI: 10.22456/1679-9216.117796

SMITHBURN, K.; HUGHES, T. P.; BURKE, A. W.; PAUL, J. H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1-20, n. 4, p. 471–492, 1940.

STEINMAN, A.; BANET-NOACH, C.; TAL, S.; LEVI, O.; SIMANOV, L.; PERK, S.; MALKINSON, M.; Shpigel, N. West Nile virus infection in crocodiles. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 887-889, 2003.

STEELE, K. E.; LINN, M. J.; SCHOEPP, R. J.; KOMAR, N.; GEISBERT, T. W.; MANDUCA, R. M.; CALLE, P. P.; RAPHAEL, B. L.; CLIPPINGER, T. L.; LARSEN, T.; SMITH, J.; LANCIOTTI, R. S.; PANELLA, N. A.; MCNAMARA, T. S. Pathology of a fatal West Nile virus infection in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 208–224, 2000.

SILVA, J. R.; MEDEIROS, L. C.; REIS, V. P.; CHÁVEZ, J. H.; MUNHOZ, T. D.; BORGES, G. P.; SOARES, O. A. B.; CAMPOS, C. H. C.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D.; SILVA, M. L. C. R.; FARIA, J. L. M.; SILVA, E. E.; FIGUEIREDO, L. T. M. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921-923, 2013.

SILVA, A. S. G.; MATOS, A. C. D.; CUNHA, M. A. C. R.; REHFELD, I. S.; GALINARI, G. C. F.; MARCELINO, S. A. C.; SARAIVA, L. H. G.; MARTINS, N. R. S.; MARANHÃO, R. P. A.; LOBATO, Z. I. P.; PIEREZAN, F.; GUEDES, M. I. M. C.; COSTA, E. A. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, p. 445–453., 2019. DOI: 10.1111/tbed.13043.

PATROCA-DA-SILVA, S.; MEDEIROS, D. B. A.; RIBEIRO-CRUZ, A. C.; MARQUES-FRANÇA, A. F.; DINIZ-NUNES, B. T.; RODRIGUES, D. S. G.; PINTO-DA-SILVA, E. V.; ALMADA, G. L.; CASSEB, L. M. N.; CUNHA, M. A. C. R.; SANTOS, M. G. D. P.; DILCHER, M.; BRITTO, S. G.; ROMANO, A. P. M.; CHIANG, J. O.; MARTINS, L. C. Co-infection of Peruvian horse sickness virus and West Nile virus associated with neurological diseases in horses from Brazil. **Heliyon**, v. 8, n. 12, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12097.

TAIEB, L.; LUDWIG, A.; OGDEN, N. H.; LINDSAY, R. L.; IRANPOUR, M.; GAGNON, C. A.; BICOUT, D. J. Bird Species Involved in West Nile Virus Epidemiological Cycle in Southern Québec. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 12, p. 4517, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17124517.

TOCANTINS (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Laboratório Central do Estado do Tocantins (LACEN-TO). **Manual de coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas**. 2019. 104 p.

TOPLU, N.; OGUZOGLU, T. C; URAL, K.; ALBAYRAK, H.; OZAN, E.; ERTURK, A.; EPIKMEN, E. T. West Nile Virus Infection in Horses: Detection by Immunohistochemistry, In Situ Hybridization, and ELISA. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1073-1076, 2015.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-time PCR handbook**. 2016. Disponível em: https://www.ffclrp.usp.br/divulgacao/emu/real_time/manuais/Apostila%20qPCR-Handbook.pdf

TREVEJO, R. T.; EIDSON, M. West Nile virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 9, p. 1302-1309, 2008. DOI: 10.2460/javma.232.9.1302.

TURELL, M. J.; DOHM, D. J.; SARDELIS, M. R.; OGUINN, M. L.; ANDREADIS, T. G.; BLOW, J. A. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 1, p. 57-62, 2005.

VASCONCELOS, P. F. C.; COSTA, Z. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; LUNA, E.; RODRIGUES, S. G.; BARROS, V. L. R. S.; DIAS, J. P.; MONTEIRO, H. A. O.; OLIVA, O. F. P.; VASCONCELOS, H. B.; OLIVEIRA, R. C.; SOUSA, M. R. S.; BARBOSA DA SILVA, J.; CRUZ, A. C. R.; MARTINS, E. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. An epidemic of jungle Yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. **Journal of Medical Virology**, v. 65, p. 598-604, 2001. DOI: 10.3201/eid0703.010338.

VIEIRA, M. A.; ROMANO, A. P.; BORBA, A. S.; SILVA, E. V.; CHIANG, J. O.; EULÁLIO, K. D.; AZEVEDO, R. S.; RODRIGUES, S. G.; ALMEIDA-NETO, W. S.; VASCONCELOS, P. F. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377-379, 2015.

ZANONI, F.; ALFIERI, C.; MORONI, G.; PASSERINI, P.; REGALIA, A.; MENEGHINI, M.; MESSA, P. Delayed Diagnosis of West Nile Virus Infection in a Kidney Transplant Patient Due to Inaccuracies in Commonly Available Diagnostic Tests. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 1, n. 1, 2018.

WARD, M. P.; SCHUERMAN, J. A.; HIGHFIELD, L. D.; MURRAY, K. O. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3-4, p. 255-259, 2006. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.07.016.

WILLIAMS, J. H.; VAN NIEKERK, S.; HUMAN, S.; VAN WILPE, E.; VENTER, M. Pathology of fatal lineage 1 and 2 West Nile virus infections in horses in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 85, n. 1, p. 1-13, 2014. DOI: 10.4102/jsava.v85i1.1105.

WEBER, M. N.; MOSENA, A. C. S.; BAUMBACH, L. F.; DA SILVA, M. S.; CANOVA, R.; DOS SANTOS, D. R. L.; BUDASZEWSKI, R. D. F.; DE OLIVEIRA, L. V.; SOANE, M. M.; SARAIVA, N. B.; BELLUCCO, F. T.; MAZUREK, B. A.; DIEHL, G. N.; GIL, L. H. V. G.; BORBA, M. R.; CORBELLINI, L. G.; CANAL, C. W. Correction to: Serologic evidence of West Nile virus and Saint Louis encephalitis virus in horses from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 1055, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00504-4. Erratum for: **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 1021-1027, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **West Nile virus (Fact-sheets)**. 2017. <Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>>

ANEXOS

ANEXO A – Ofício CAF nº 060/2019 em que o GAPPPS/FESIMA aprovou o suporte financeiro para o estabelecimento das atividades do projeto.



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças
FESIMA
CONSELHO ADMINISTRATIVO DO FESIMA**

Número de Referência: CAF n.º: 060/2019

Interessado: Centro de Pesquisa em Virologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Assunto: Projeto "Avaliação da circulação do vírus da Febre do Nilo Ocidental no estado de São Paulo estudando aves e equídeos como população sentinela".

São Paulo, 05 de novembro de 2019.

Ilmo. Senhor

Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Departamento de Clínica Médica – Faculdade Medicina de Ribeirão Preto - USP

O Conselho Administrativo do Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças – CAF FESIMA – em sua 92ª reunião ordinária realizada em 30 de outubro de 2019, diante da solicitação SES-PRC-2019/03831, avaliou a matéria em epígrafe e considerando o mérito da proposta, deliberou:

- **Aprovar o Projeto – período: outubro/2019 a abril/2024- com o pagamento de etapas nos limites apresentados e os recursos para insumos conforme tabelas a seguir:**

Nível	Seg. a Sex. ≥ 2h a ≤ 4h		Seg. a Sex. > 4h		Sáb./Dom./Feriado		Total
	Servidor	Não servidor	Servidor	Não servidor	Servidor	Não servidor	
Elementar							
Intermediário							
Superior							
Total							

ANO	PERÍODO	VALOR
2019	03 meses	
2020	12 meses	
2021	12 meses	
2022	12 meses	
2023	12 meses	
TOTAL		

OBS.: Os relatórios com as respectivas planilhas a serem encaminhadas, posteriormente, para pagamento deverão respeitar o número de etapas para cada nível profissional e o período definido.

MARIA FELÍCIA BARBOSA
Secretária do Conselho Administrativo
CAF/FESIMA/SESSP

CAF/FESIMA / SESSP

Av. Dr. Arnaldo, 351, 1º andar | CEP 01246-000 | São Paulo, SP | Fone: (11) 3066-8827.

E-mail: mfbarbosa@saude.sp.gov.br

ANEXO B – Parecer favorável da Comissão Científica do Instituto Pasteur sobre a colaboração no projeto do Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Controle de Doenças
INSTITUTO PASTEUR



Parecer da Comissão Científica do Instituto Pasteur

Registro na CCIP: IP 06/2019.

Título do projeto: Avaliação da circulação do vírus da febre do Nilo ocidental no estado de São Paulo estudando aves e equídeos como população sentinela.

Tipo de Projeto: Projeto de Pesquisa/ Colaboração

Pesquisador responsável interno: Dr. Enio Mori

Coordenador (a): Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca –FMRP/USP

Baseado na análise de parecerista externo e aprovação do Comitê de ética no uso de animais do Instituto Pasteur (protocolo 08.2019), a CCIP confere parecer **favorável** a execução do referido projeto científico.

Ressaltamos, que os relatórios científicos deverão ser encaminhados anualmente, à CCIP, a partir desta data, visando o acompanhamento do desenvolvimento do projeto e permitindo a atualização das informações da produção científica do Instituto Pasteur.

São Paulo, 16 de julho de 2019.

Atenciosamente,

Dra. Sandriana dos Ramos Silva
Coordenadora CCIP
Instituto Pasteur

ANEXO C – Ofício de celebração da parceria entre o Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico de São Paulo e o Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP.



LRE 29/2019

Ilmo. Dr.
Benedito Antônio Lopes da Fonseca
Professor Associado
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

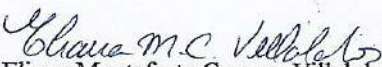
São Paulo, 1 de agosto de 2019


Prezado Doutor,

Encaminhamos o presente ofício para celebrarmos a parceria entre o **Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico de São Paulo (LRE-IB/SP)** e o **Laboratório de Virologia Molecular – Centro de Pesquisa em Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (LVM/CPV-FMRP/USP)**, para o desenvolvimento do projeto de doutorado do aluno de pós-graduação, Márcio Júnio Lima Siconelli. O projeto **AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQUÍDEOS COMO POPULAÇÃO SENTINELA**, que será realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), trata de um estudo epidemiológico acerca dessa arbovirose emergente, que pode ser fatal para os seres humanos e animais. Para a identificação viral será feito o isolamento, biologia molecular, avaliação anatomo-patológica e imunohistoquímica.

Assim, para registro, ficou acordado que o LRE-IB/SP fornecerá amostras de sistema nervoso central de equídeos que forem encaminhadas para rotina de diagnóstico de raiva, junto à ficha epidemiológica referente à amostra.

Atenciosamente,


Eliana Monteforte Cassaro Villalobos
Méd. Veterinária – Pesq. Científico VI
Laboratório de Raiva e Encefalites
CPSA-IB


Maria do Carmo Custódio S. H. Lara
Méd. Veterinária – Pesq. Científico VI
Laboratório de Raiva e Encefalites
CPSA-IB

ANEXO D – Ofício para a celebração da parceria entre o Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ/Unesp e o Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP.



Universidade de São Paulo
Centro de Pesquisa em Virologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Médica



Ribeirão Preto, 12 de setembro de 2019.

Ilmo. Dr.

Benedito Donizete Menozzi

Assistente de Suporte Acadêmico III

Serviço de Diagnóstico de Zoonoses – Dep. de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp

Botucatu/SP

Prezado Doutor,

Encaminho o presente ofício para celebrarmos a parceria entre o **Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (SDZ – DHVSP) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ/Unesp)** e o **Laboratório de Virologia Molecular – Centro de Pesquisa em Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (LVM/CPV-FMRP/USP)**, para o desenvolvimento do projeto de doutorado do aluno de pós-graduação, Márcio Junio Lima Siconelli, conforme já acordado em conversa prévia. Assim, para registro, ficou acordado que o SDZ – DHVSP fornecerá amostras do sistema nervoso central de equídeos que forem encaminhados para a rotina de diagnóstico de raiva, junto à ficha de evolução clínico-patológica do animal que tiver originado a amostra. A forma como o material será acondicionado e/ou encaminhado será acordado entre os pesquisadores, de forma a garantir a qualidade das amostras para a realização adequada dos testes. O projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQUÍDEOS COMO POPULAÇÃO SENTINÉLA**”, que será realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), trata de um estudo epidemiológico acerca dessa arbovirose emergente, que pode ser fatal tanto para os seres humanos, quanto para os animais. O diagnóstico será feito pelo isolamento viral, biologia molecular, avaliação anátomo-patológica e imunohistoquímica. Além disso, será feita a avaliação do histórico e evolução clínica, e o mapeamento dos casos positivos em todo o Estado de São Paulo.

Ressaltando a importância desta pesquisa em relação à Saúde Pública e Saúde Animal e a importância dessa colaboração para o desenvolvimento do trabalho, agradecemos a cooperação e empenho na realização deste projeto.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca
Professor Associado do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP
Disciplina de Moléstias Infeciosas e Tropicais

ANEXO E – Ofício de celebração da parceria entre o Serviço de Patologia de Animais Selvagens da FCAV/Unesp e o Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, REPRODUÇÃO E SAÚDE ÚNICA



SERVIÇO DE PATOLOGIA DE ANIMAIS SELVAGENS – SEPAS

Ilmo. Dr.
Benedito Antonio Lopes da Fonseca
Professor Associado
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

Prezado Professor,

Em resposta ao contato prévio referente a cooperação científica, entre **Serviço de Patologia de Animais Selvagens**, do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (SEPAS/FCAV/Unesp) e o Laboratório de Virologia Molecular – Centro de Pesquisa em Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (LVM/CPV-FMRP/USP), somos favoráveis e de acordo.

Esta cooperação, de acordo com as informações do LVM/CPV-FMRP/USP tem objetivo de colaborar com o desenvolvimento do projeto de doutorado do aluno de pós-graduação, **Márcio Junio Lima Siconelli**. O projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQUIDEOS COMO POPULAÇÃO SENTINELA**”, será realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Trata de um estudo epidemiológico acerca dessa arbovirose emergente, que pode ser fatal, tanto para os seres humanos, quanto para os animais. Para a detecção viral serão utilizadas diversas técnicas, entre elas: o isolamento, biologia molecular, avaliação anátomo-patológica e imunohistoquímica. Além disso, serão avaliados os históricos clínicos, dados do animal quanto a sua origem, que será utilizado para o mapeamento dos casos em todo o Estado de São Paulo.

O **SEPAS/FCAV/Unesp**, sob minha coordenação e supervisão desde 1994, tem interesse de colaborar com a pesquisa supramencionada, disponibilizando dados e amostras de tecidos previamente selecionados de anfíbios, répteis, aves e mamíferos que forem recebidos para necropsia na rotina do **SEPAS/FCAV/Unesp**.

Atenciosamente,

Jaboticabal, 03 de junho de 2019


Prof. Responsável: Karin Werther
CRMV-SP: 6125

ANEXO F – Ofício de celebração da parceria entre o Bosque e Zoológico Municipal “Dr. Fábio de Sá Barreto” de Ribeirão Preto e o Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP.



Universidade de São Paulo
Centro de Pesquisa em Virologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Médica



Ribeirão Preto, 30 de julho de 2021.

Ilmo. Sr.
César Henrique Branco
Chefe da Seção do Parque Municipal “Morro do São Bento”
Secretaria Municipal de Meio Ambiente
Ribeirão Preto/SP

Prezado Dr. Branco,

Encaminho o presente ofício para solicitar a colaboração entre o **Bosque e Zoológico Municipal “Dr. Fábio de Sá Barreto”** e o **Laboratório de Virologia Molecular – Centro de Pesquisa em Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (LVM/CPV-FMRP/USP)**, para o desenvolvimento do projeto de doutorado do aluno de pós-graduação, Márcio Junio Lima Siconelli. O projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO: AVES E EQUÍDEOS COMO POPULAÇÃO SENTINELA**”, que será realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), trata de um estudo epidemiológico acerca dessa arbovirose emergente, que pode ser fatal tanto para os seres humanos, quanto para os animais. Para a detecção viral serão realizadas técnicas de biologia molecular, isolamento viral em cultivo celular, avaliação anátomo-patológica e imunohistoquímica. Além disso, será feita a avaliação do histórico de evolução clínica e o mapeamento dos casos positivos em todo o Estado de São Paulo.

Assim de forma a ampliar nossa a capacidade de detecção deste vírus solicitamos o fornecimento de amostras do sistema nervoso central, coração e baço de qualquer classe animal (como anfíbios, répteis, aves e mamíferos) que venha a óbito e seja necropsiado, juntamente com a ficha de evolução clínico-patológica do animal que tiver originado a amostra. O material poderá ser acondicionado, por um período curto e definido, em temperatura de -20°C e encaminhado ao LVM/CPV-FMRP/USP, de forma a garantir a qualidade das amostras para a realização adequada dos testes. O projeto está aprovado sob SISBIO nº 70580-3 e dispensado de compromissos com a CEUA.

Ressaltando a importância desta pesquisa em relação à saúde pública, saúde animal e conservação das espécies silvestres/selvagens e a importância da colaboração desta unidade de conservação para o desenvolvimento desse trabalho, agradecemos a cooperação na realização deste projeto.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca
Professor Associado do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP
Disciplina de Moléstias Infecciosas e Tropicais
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

De acordo
12/09/2022
César Henrique Branco
Chefe da Seção Parque Morro São Bento
Bosque Zoológico Fábio Barreto
Secretaria de Meio Ambiente

ANEXO G – Formulário para a solicitação da parceria entre o Instituto de Pesquisas Cananéia e o Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP.



PMP-BS
PROJETO DE MONITORAMENTO
DE PRAIAS – BACIA DE SANTOS

Pedido de Uso de Dados para Trabalhos Técnico-Científicos

Título Provisório:

“AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO: AVES E EQUÍDEOS COMO POPULAÇÃO SENTINELA”

Tipo:

Resumo Congresso

Artigo Científico

Trabalho de Conclusão de Curso:

Graduação

Mestrado

Doutorado

Acadêmico (a): Márcio Júnio Lima Siconelli

Orientador (a): Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP)

Previsão de Término (para trabalhos de conclusão): Dezembro de 2024

Instituição do PMP-BS vinculada (listar todas as envolvidas): Instituto de Pesquisas Cananéia (IPEC)

Breve descrição dos objetivos do trabalho:

Coletar SNC de aves e outros animais selvagens que vieram à óbito sem causa aparente; Avaliar a presença do material genético do WNV por meio da RT-qPCR e/ou nested PCR; Realizar o diagnóstico diferencial para outras encefalomyelites virais (EEEV, WEEV e VEEV); Realizar o isolamento viral em cultivo celular das amostras positivas pela RT-qPCR e/ou nested PCR; Sequenciar e caracterizar o vírus detectado nas amostras positivas/isolado; Avaliar macro e microscopicamente as lesões teciduais pela coloração H&E e nos casos sugestivos, realizar a IHQ; Avaliar a ficha clínica/histórico dos animais e os achados *post-mortem* dos animais positivos, relacionando-os com possível infecção viral; georreferenciar e caracterizar a origem dos positivos; Na detecção do WNV ou outra encefalomyelite viral notificar as Secretarias de Saúde (SES), de Abastecimento e Agricultura (SAA) e de Infraestrutura e Meio Ambiente (SIMA) do Estado de São Paulo para que sejam tomadas as medidas cabíveis para o controle/monitoramento desses vírus;

Nome e instituição do responsável pelo pedido:

Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Data: 22/05/2020

Dr. Benedito A.L. Fonseca
Infectologia Clínica
CRM - SP 57276

ATENÇÃO: após a finalização do trabalho, mas antes da publicação ou envio para congressos ou defesas, a versão final do mesmo deve ser enviada para nova aprovação.

Reservado para a Coordenação do PMP-BS Fase 1

Data de recebimento: ____/____/____

Parecer: De acordo () Desfavorável () – motivo: _____

Assinatura: _____

Reservado para a fiscalização da PETROBRAS

Data de recebimento: ____/____/____

Parecer: De acordo () Desfavorável () – motivo: _____

Assinatura: _____

ANEXO H – Parecer favorável à colaboração do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – Minas Gerais com o Laboratório de Virologia Molecular da FMRP/USP para a caracterização de amostras positivas para o vírus da febre do Nilo Ocidental.

4/7/2020

SEI/MAPA - 10210776 - Despacho



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUARIA
DEPARTAMENTO DE SAUDE ANIMAL E INSUMOS PECUARIO S
DIVISAO DE SANIDADE DOS EQUIDEOS

DESPACHO

Processo nº 21181.000092/2020-79

Interessado: FACULDADE DE MEDICINA RIBEIRÃO PRETO USP

À CAT,

Trata o presente processo da solicitação do compartilhamento de amostras do sistema nervoso central dos equídeos que foram diagnosticados como positivo para vírus da Febre do Nilo Ocidental (FNO) por meio de ensaios realizados no LFDA-MG. Tal solicitação partiu do Laboratório de Virologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Registramos que esta divisão sempre apoiará investigações adicionais ou complementares aos diagnósticos laboratoriais oficiais principalmente às referentes à área da biologia e/ou diagnóstico molecular. Dessa forma, o parecer é favorável ao envio do material solicitado, ressaltando que fragmentos de amostras de contra prova devem ser mantidas no acervo do LFDA-MG para testes e ensaios adicionais que se façam ou que se fizerem necessários.

Seguimos à disposição!



Documento assinado eletronicamente por **ELIANA DEA LARA COSTA, Chefe da Divisão de Sanidade dos Equídeos**, em 24/03/2020, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **10210776** e o código CRC **97053AA7**.

Referência: Processo nº 21181.000092/2020-79

SEI nº 10210776

ANEXO I – Autorização de expedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO/MMA) para coleta de material biológico de animais silvestres.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70580-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:32:16	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Márcio Junio Lima Siconelli	CPF: 371.804.318-18
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQ	
Nome da Instituição: FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP	CNPJ: 63.025.530/0026-62

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Geoprocessamento	01/2020	12/2024
2	Coleta/Obtenção das amostras	09/2019	09/2024
3	Processamento/diagnósticos das amostras	01/2020	01/2024
4	Análise dos dados	01/2020	12/2024

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Médico/Orientador/Pesquisador/Chefe - FMRP/USP	071.022.718-32	Brasileira
2	karin werther	Médica Veterinária/Colaboradora - FCAV/Unesp	532.920.309-00	Brasileira
3	Adolorata Aparecida Bianco Carvalho	Médica Veterinária/Coorientadora/Pesquisadora - FCAV/Unesp	981.689.838-15	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0705800120190722

Página 1/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70580-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:32:16	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Márcio Junio Lima Siconelli	CPF: 371.804.318-18
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQ	
Nome da Instituição: FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP	CNPJ: 63.025.530/0026-62

Observações e ressalvas

6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Outras ressalvas

1	O volume de sangue coletado não deve ultrapassar o equivalente a 1% da massa corporal da ave. Em coletas consecutivas, não deve ultrapassar 2% a cada 14 dias. Não deve ser utilizada punção cardíaca para obtenção da amostra.	CEMAVE Cabedelo-PB
---	---	--------------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP	Ribeirão Preto-SP	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
2	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp	Jaboticabal-SP	Cerrado	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Psittaciformes	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Galliformes	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Piciformes	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Falconiformes	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Anseriformes	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cathartiformes	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cariamiformes	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Suliformes	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Strigiformes	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Felidae	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Primates	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Rodentia	-
13	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Procyonidae	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0705800120190722

Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70580-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:32:16	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Márcio Junio Lima Siconelli	CPF: 371.804.318-18
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQ	
Nome da Instituição: FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP	CNPJ: 63.025.530/0026-62

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
14	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Canidae	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Suidae	-
16	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Xenarthra	-
17	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Crocodylia	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Squamata	-
19	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Anura	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Caudata	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Rheiformes	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Podicipediformes	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Charadriiformes	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Apodiformes	-
25	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Marsupialia	-
26	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ciconiiformes	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mustelidae	-
28	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Passeriformes	-
29	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Columbiformes	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue, Secreção
2	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(Secreções)
3	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Urina, Outras amostras biológicas(Secreções)
4	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Urina, Secreção
5	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Urina, Outras amostras biológicas(Secreções)

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0705800120190722

Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70580-1	Data da Emissão: 22/07/2019 11:32:16	Data da Revalidação*: 22/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Márcio Junio Lima Siconelli	CPF: 371.804.318-18
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL NO ESTADO DE SÃO PAULO ESTUDANDO AVES E EQ	
Nome da Instituição: FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP	CNPJ: 63.025.530/0026-62

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
6	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Secreção, Outras amostras biológicas(Secreções)
7	Amostras biológicas (Xenarthra)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Urina, Secreção

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0705800120190722

Página 4/5

ANEXO J – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP/USP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



DECLARAÇÃO

Declaramos que o Projeto de Pesquisa intitulado “*Avaliação da circulação do vírus da Febre do Nilo Ocidental no Estado de São Paulo. Estudando aves e equídeos como população sentinela*” sob a responsabilidade do **Professor Doutor Benedito Antonio Lopes da Fonseca**, vinculado ao Departamento de Clínica Médica — Divisão de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, coletará amostras biológicas *post mortem* de animais para investigação e detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental.

Em consonância com a RESOLUÇÃO NORMATIVA N 30, DE 2 DE FEVEREIRO DE 2016 do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL — CONCEA, item 6.1.10 “*Quando cadáveres, partes deles ou amostras biológicas forem usadas em atividades de ensino ou de pesquisa científica os responsáveis pela atividade devem: (...) b. Quando o material não for oriundo de uma atividade de ensino ou de pesquisa científica, por exemplo: i) cadáveres de animais atropelados em rodovias; ii) sobras de amostras biológicas colhidas a bem do tratamento de animais que deles necessitavam; iii) cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo; iv) cadáveres ou partes deles oriundos de animais mortos por serviços de vigilância sanitária; v) cadáveres ou partes deles obtidos em estabelecimentos comerciais como mercados ou feiras livres ou; vi) sobras de amostras biológicas colhidas pelos serviços de vigilância sanitária - Manter documentação que evidencie a origem do material de forma inequívoca (...)*”.

Ressaltando-se que na eventualidade de animais vivos apresentarem sintomatologia de acometimento de sistema neurológica, os mesmos serão encaminhados para o Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Veterinárias de Jaboticabal — UNESP, cabendo ao Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP apenas as análises das amostras *post mortem*. Finalmente, por não satisfazer à condição de estudo experimental envolvendo “*procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas*” (CONCEA - Lei nº 11.794 de 08/10/2008, Art. 3º - Inciso III), declaramos que NÃO COMPETE à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP emitir parecer acerca dos aspectos éticos relacionados a projetos de pesquisa dessa natureza.

Ribeirão Preto, 14 de agosto de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzzum Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP