

**Faculdade de Saúde Pública da Universidade de  
São Paulo**

**VIGILÂNCIA PARA FEBRE DO NILO OCIDENTAL  
(FNO) EM AVES DE SUBSISTÊNCIA LOCALIZADAS  
EM SÍTIO DE AVES MIGRATÓRIAS DO COMPLEXO  
ESTUARINO - LAGUNAR DE ILHA COMPRIDA E  
IGUAPE/SP**

**Sílvia Tranquilli Orlandi**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado Profissional Entomologia em Saúde  
Pública da Faculdade de Saúde Pública da  
USP para obtenção do título de Mestre  
Ciências.

**Área de Concentração:**

Entomologia em Saúde Pública

**Orientador:**

Prof. Dr. Adriano Pinter dos Santos

**Coorientador:**

Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto

**São Paulo**

**2023**

**VIGILÂNCIA PARA FEBRE DO NILO OCIDENTAL  
(FNO) EM AVES DE SUBSISTÊNCIA LOCALIZADAS  
EM SÍTIO DE AVES MIGRATÓRIAS DO COMPLEXO  
ESTUARINO - LAGUNAR DE ILHA COMPRIDA E  
IGUAPE/SP**

**Sílvia Tranquilli Orlandi**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP para obtenção do título de Mestre Ciências.

**Área de Concentração:**

Entomologia em Saúde Pública

**Orientador:**

Prof. Dr. Adriano Pinter dos Santos

**Coorientador:**

Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto

**São Paulo**

**2023**

Catálogo da Publicação Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a) Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Tranquilli Orlandi, Silvia

Vigilância para Febre do Nilo Ocidental (FNO) em aves de subsistência localizadas em sítio de aves migratórias do Complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape/SP /Silvia Tranquilli Orlandi; orientador Adriano Pinter dos Santos; coorientador Francisco Chiaravalloti Neto. – São Paulo, 2023.

138 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Revisão de literatura sobre a Febre do Nilo Ocidental, no Brasil e no mundo, considerando a importância da doença como zoonose, em saúde pública, na sanidade animal e meio ambiente, balizadas pelo conceito "OneHealth". . 2. Pesquisa de circulação viral, pela prova de RT-PCR, em aves sentinelas de fundo de quintal localizados no sítio de aves migratórias denominado como Complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape, Estado de São Paulo. 3. Descrição do 1º caso de FNO em um equino em propriedade localizada no município de São Paulo/SP, no ano de 2019.. I. Pinter dos Santos, Adriano , orient. II. Chiaravalloti Neto, Francisco, coorient. III. Título.

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.

Nome: ORLANDI, Sílvia Tranquilli

Título: Vigilância para Febre do Nilo Ocidental (FNO) em aves de subsistência localizadas em sítios de aves migratórias do Complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape/SP.

Dissertação apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Adriano Pinter dos Santos

Instituição: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – FSP/USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dr. Luciano Lagatta

Instituição: Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo – CDA/SP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Erica Azevedo Costa

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e à minha mãe (*in memoriam*) pelos anos de convivência, investimento em minha formação e saudade eterna.

Às minhas duas sobrinhas, Rebeca pela amizade e carinho, e Catarina pela inteligência, serenidade e suporte oferecidos, que foram cruciais para a conclusão deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, meus irmãos Fábio e Cynthia, meu amigo e cunhado Kennedy, meus pais que não estão mais entre nós e à todos que emanam pensamentos positivos nos desejando o melhor, sempre.

Às Professora Dra Denise Pimentel Bergamaschi da Faculdade de Saúde Pública da USP, pelos ensinamentos técnicos, sabedoria, e colaboração para que este trabalho pudesse ser concretizado.

À colega do mestrado Raquel Emile da Silva pelos anos de convivência e amizade.

Aos colegas de trabalho que ofereceram apoio durante toda a caminhada até que chegássemos à este momento.

Ao Med. Veterinário, Dr. Luciano Lagatta, da CDA, pela oportunidade que me concedeu de poder realizar um trabalho técnico-profissional, pelas opiniões assertivas e pela mão estendida nos momentos mais críticos desta jornada.

À Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, que permitiu minha participação no mestrado da FSP/USP, acreditando que o investimento na educação e a valorização aos profissionais servidores públicos, contribuem para a excelência no atendimento e prestação de serviços à sociedade.

Ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pelo processamento e análise das amostras coletadas para a realização do presente estudo.

À Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo pela oportunidade de partilhar o convívio com intelectuais de alto nível e vasto saber

“Grandes espíritos sempre encontraram violenta oposição de mentes medíocres. A mente medíocre é incapaz de compreender o homem que se recusa a se curvar cegamente aos preconceitos convencionais e escolhe expressar suas opiniões com coragem e honestidade”.

Albert Einstein

## RESUMO

**ORLANDI, S.T. Vigilância para Febre do Nilo Ocidental em aves de subsistência localizadas em sítio de aves migratórias do complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape/SP. 2023. 138 fls. Dissertação de Mestrado em Entomologia em Saúde Pública - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.**

A Febre do Nilo Ocidental (FNO), é uma arbovirose emergente, zoonótica, causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (VNO), arbovírus da família Flaviviridae, do gênero Flavivírus, com ampla distribuição mundial. Vírus foi isolado pela primeira vez em 1937, em uma paciente febril, na província de West Nile, em Uganda, e documentado em 1951 em Israel, havendo registros de ocorrência em aves, equinos e no homem. Nas Américas, o primeiro surto ocorreu em 1999 na cidade de Nova York (EUA), com mortalidade de milhares de aves silvestres e 121 pessoas, um marco histórico para a doença e na construção das bases de vigilância do vírus. A doença se espalhou pelas Américas, com a primeira evidência na América do Sul, em equinos na Colômbia, em 2005. No Brasil, o primeiro registro ocorreu no Mato Grosso do Sul em equinos, no ano de 2010, e o primeiro caso humano em 2014, no Piauí, sendo comprovada a circulação viral em aves silvestres, galinhas e equinos nos últimos dez anos. A transmissão ocorre pela picada do mosquito infectado do Gênero Culex, mantendo um ciclo enzoótico de transmissão mosquito-ave silvestre-mosquito, sendo que as aves silvestres são hospedeiros primários, e destacam - se na disseminação viral entre as Américas, através de deslocamentos migratórios, sem haver elucidação dos mecanismos de dispersão. A infecção de galinhas, equinos e do homem é acidental, por apresentarem uma viremia rápida e curta, tornando – os elos finais da cadeia de transmissão ou sentinelas, para a doença. A FNO é aguda, subclínica ou com quadro febril, que pode ocasionar síndrome neurológica grave em até 10% dos casos, com recuperação ou óbito em 1% dos casos, não havendo tratamento ou vacina disponível no Brasil. A FNO é de Notificação Obrigatória - IN nº 50/2013 - MAPA. Características inerentes à galinhas, de suscetibilidade à infecção, resistência à doença e alta sensibilidade à testes de



detecção viral, tornam esta espécie um modelo de sentinela para o VNO, em sítios migratórios, aonde coexistem aves silvestres, culicídeos e criações de fundo de quintal que ficam vulneráveis à infecção, demonstrando a importância da vigilância para a FNO no Brasil. O presente estudo teve como objetivos a revisão de literatura sobre a FNO e o estudo de circulação viral em aves de fundo de quintal de 17 propriedades do entorno do sítio de aves migratórias do complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape/SP, com colheita de amostras de sangue em 113 galinhas, para a detecção do VNO e outros flavivírus pela técnica RT-PCR. Não houve a detecção de atividade viral nas amostras analisadas. Contudo, as ações de vigilância para o VNO e o monitoramento contínuo dos sítios migratórios de aves devem ser rotineiros, para evitar a introdução e disseminação da doença, destacando – se as notificações de sinais clínicos neurológicos ou mortalidade em aves.

Palavras-chave: Aves migratórias. Febre do Nilo Ocidental. Galinhas sentinelas. Sítio migratório. Vírus do Nilo Ocidental. WNF.

## ABSTRACT

**ORLANDI, S.T. Surveillance for West Nile Fever in backyard chickens located in a migratory bird site of the estuarine-lagoon complex of Ilha Comprida and Iguape/SP. 2023. 138 p. Master's Dissertation in Public Health Entomology - School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, 2023.**

West Nile Fever (WNF) is an emerging zoonotic arbovirus caused by the West Nile Virus (WNV), a flavivirus of the Flaviviridae family with worldwide distribution. The virus was first isolated in 1937 from a febrile patient in the West Nile province of Uganda and documented in 1951 in Israel. WNV has been reported to occur in birds, horses, and humans. The first outbreak in the Americas occurred in 1999 in New York City, with thousands of wild birds dying and 121 human deaths. The disease has since spread throughout the Americas, with the first evidence in South America occurring in horses in Colombia in 2005. In Brazil, the first WNV record occurred in horses in Mato Grosso do Sul in 2010, and the first human case was reported in 2014 in Piauí. WNV circulation has been confirmed in wild birds, chickens, and horses in the past ten years. The virus is transmitted by infected *Culex* mosquitoes, maintaining an enzootic cycle of mosquito-wild bird-mosquito transmission. Wild birds are the primary hosts and play a significant role in viral dissemination across the Americas through migratory movements, with no elucidation of the dispersal mechanisms. Chickens, horses, and humans are accidental hosts due to their rapid and short viremia, making them the final links in the transmission chain or sentinels for the disease. WNF is acute or subclinical, with fever that can lead to severe neurological syndromes in up to 10% of cases, with recovery or death in 1% of cases. There is no treatment or vaccine available for WNF in Brazil. WNF is a mandatory reportable disease according to IN n° 50/2013 - MAPA. The susceptibility of chickens to infection, resistance to disease, and high sensitivity to viral detection tests make this species a sentinel model for WNV in migratory sites where wild birds, culicids, and backyard farming coexist and are vulnerable to infection. Therefore, continuous surveillance for WNF in Brazil is crucial. This study aimed to review the literature on WNF and to investigate viral circulation in backyard chickens in 17

properties around the migratory bird site of the estuarine-lagoon complex of Ilha Comprida and Iguape/SP, with blood samples collected from 113 chickens for WNV and other flavivirus detection by RT-PCR. No viral activity was detected in the analyzed samples. However, surveillance for WNV and continuous monitoring of migratory bird sites should be routine to prevent the introduction and spread of the disease, with notifications of clinical neurological signs or mortality in birds.

Keywords: Migratory birds. West Nile Fever. Sentinel chickens. Migratory site. West Nile Virus. WNF.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Provável rota temporal e dispersão do vírus a partir da primeira ocorrência na Província de West Nile em Uganda (África) em 1937, Ásia Ocidental, Oriente Médio e Europa.....	21
Figura 2: Rotas migratórias intercontinentais.....	29
Figura 3: Principais rotas de aves migratórias no Brasil.....	30
Figura 4: Estrutura do Vírus do Nilo Ocidental.....	32
Figura 5: Esquema da patogênese do vírus do Nilo Ocidental (WNV) em humanos.....	34
Figura 6: Esquema da organização do genoma do Vírus do Nilo Ocidental (VNO).....	36
Figura 7: Ciclo reprodutivo do <i>Culex spp.</i> .....	41
Figura 8: Quatro estágios do ciclo de vida do <i>Culex spp.</i> (Ovo, Larva, Pupa, Adulto).....	41
Figura 9: Dispersão mundial do gênero <i>Culex</i> .....	42
Figura 10: Áreas de importância para aves migratórias no Brasil.....	60
Figura 11: Áreas Importantes para Aves Migratórias (áreas regulares de rota, pouso, descanso, alimentação e reprodução) no estado de São Paulo .....	82
Figura 12: Localização das propriedades com criações de aves domésticas de subsistência participantes do estudo em Iguape e Ilha Comprida, Estado de São Paulo, Brasil.....	85
Figura 13: Local da propriedade foco.....	115
Figura 14: Propriedade Foco .....	115
Figura 15: Acúmulo de lixo e “cama” das cocheiras, com presença de equino, nas imediações do foco .....	116
Figura 16: Equino na área perifocal .....	116
Figura 17: Equino na propriedade foco.....	117
Figura 18: Aves sentinelas na propriedade foco .....	118
Figura 19: Aves sentinelas na área perifocal.....	118
Figura 20: Comunicado oficial de foco de FNO no município de São Paulo, emitido pela OIE em 27 de agosto de 2019 .....	119
Figura 21: Coleta de amostras dos equinos do foco .....	120
Figura 22: Amostras de sangue coletadas.....	120
Figura 23: Comunicado da OIE de encerramento de caso de FNO no município de São Paulo em 20 de janeiro de 2020 .....	123

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	15
1.1.	FEBRE DO NILO OCIDENTAL (FNO) .....	18
1.2.	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	19
1.3.	HISTÓRICO E OCORRÊNCIA .....	19
1.4.	FATORES E ÁREAS DE RISCO PARA FEBRE DO NILO OCIDENTAL.....	22
1.5.	SÍTIO DE AVES MIGRATÓRIAS.....	24
1.6.	ROTAS INTERCONTINENTAIS DE AVES MIGRATÓRIAS .....	28
1.7.	ROTAS DE AVES MIGRATÓRIAS NO BRASIL .....	29
1.8.	VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL (vNO).....	30
1.8.1	Grupos Filogenéticos .....	32
1.9.	CICLO DE VIDA E PATOGÊNESE DO VÍRUS DO NILO OCIDENTAL .....	33
1.10.	REPLICAÇÃO VIRAL .....	35
1.11.	VETOR VIRAL .....	36
1.11.1	<i>Culex spp.</i> .....	37
1.11.2	Competência Vetorial dos Culicídeos.....	39
1.11.3	Outros Vetores .....	42
1.12.	RESISTÊNCIA E SENSIBILIDADE DO vNO AO AMBIENTE, AGENTES QUÍMICOS E FÍSICOS .....	43
1.13.	INFECÇÃO INICIAL E AMPLIFICAÇÃO VIRAL.....	44
1.14.	A DOENÇA FEBRE DO NILO OCIDENTAL .....	44
1.14.1	A Doença nas Aves .....	45
1.14.2	A Doença nos Equinos .....	48
1.14.3	A Doença em Humanos .....	50
1.15.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	53
1.15.1	Diagnóstico Indireto .....	54
1.15.2	Diagnóstico Direto.....	55
1.16.	EPIDEMIOLOGIA DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL .....	56
1.16.1	Papel das Aves Migratórias na Disseminação do Vírus do Nilo Ocidental .....	58
1.16.2	Papel dos Culicídeos ( <i>Culex spp</i> ) na Disseminação do Vírus do Nilo Ocidental .....	63
1.16.3	Transmissão do Vírus do Nilo Ocidental .....	64
1.16.4	Hospedeiros do Vírus do Nilo Ocidental .....	67
1.16.5	Hospedeiros Acidentais ou Terminais .....	69
1.17.	TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA .....	70
1.18.	VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA .....	72
1.18.1	Vigilância para o Vírus do Nilo Ocidental no Brasil .....	74

1.18.2	Vigilância em Animais Sentinelas.....	76
2.	OBJETIVOS.....	79
2.1	OBJETIVO GERAL.....	79
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	80
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
3.1	METODOLOGIA.....	80
3.2	COMITE DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS.....	81
3.3	DELIMITAÇÃO DA PESQUISA.....	81
3.4	LEVANTAMENTO DE DADOS.....	82
3.5	CÁLCULO AMOSTRAL.....	83
3.6	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	83
4.	RESULTADOS.....	84
5.	DISCUSSÃO.....	88
6.	CONCLUSÕES.....	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8.	APÊNDICE.....	111
8.1	CASO DE FEBRE DO NILO OCIDENTAL EM UM EQUINO NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO EM 2019. DESCRIÇÃO E INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	111
9.	ANEXOS.....	125
9.1	APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	125
9.2	CESSÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	126
9.3	FICHA DE CADASTRO DE ESTABELECIMENTOS AVÍCOLAS DE SUBSISTÊNCIA OU DE “FUNDO DE QUINTAL”.....	128
9.4	FORMULÁRIO DE COLHEITA E ENVIO DE MATERIAL AO LABORATÓRIO PARA VIGILÂNCIA ATIVA EM AVES - PNSA.....	130
9.5	RESULTADOS DA PESQUISA DE VÍRUS DO NILO OCIDENTAL E PESQUISA DO GÊNERO FLAVIVÍRUS EM AMOSTRAS DE AVES DE SUBSISTÊNCIA, POR BIOLOGIA MOLECULAR (IAL/SP)....	132
9.6	RESULTADO LABORATORIAL DOS EQUINOS CONTACTANTES, NEGATIVO PARA FNO.....	137

## 1. INTRODUÇÃO

A Febre do Nilo Ocidental (FNO) é uma doença zoonótica causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (vNO), em inglês *West Nile Virus* (WNV), um arbovírus do gênero *Flavivirus*, transmitido pela picada de mosquitos hematófagos e tem nas aves silvestres seu principal reservatório, sendo disseminado entre os continentes às custas da migração que ocorre, eventualmente, do hemisfério norte para o hemisfério sul nos diferentes continentes. As aves silvestres, em especial as das ordens passeriformes, charadriiformes e falconiformes, são as que apresentam as espécies de maior susceptibilidade à infecção pelo vNO, desempenhando importante papel na epidemiologia da doença, pois são consideradas como reservatórios naturais e amplificadores do vNO (FELIPPE, 2016; LONG, 2018; COSTA et al., 2020).

A maioria das espécies de aves são resistentes e não desenvolvem a doença, permanecendo parte delas como reservatórios do vNO. Espécies da ordem dos Galliformes, como galinhas e os perus, ocasionalmente podem ser infectados pelo vNO, sem a manifestação de sinais clínicos, sendo amplamente utilizadas na vigilância epidemiológica como animais sentinelas. O vNO também pode infectar humanos, equinos, primatas e outros mamíferos. O homem e os equídeos são considerados hospedeiros acidentais e terminais, uma vez que a contaminação do vírus se dá por curto período de tempo e em níveis insuficientes para infectar mosquitos, encerrando o ciclo de transmissão (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; MS, 2005; MARTÍN-ACEBES e SAIZ, 2012; WOA, 2022).

No homem, a doença pode ser assintomática ou apresentar sintomas distintos, de acordo com cada pessoa e com o nível de gravidade da doença. Alguns indivíduos infectados podem desenvolver doença neurológica severa (meningite, encefalite ou poliomielite). A encefalite é o quadro mais comum entre as manifestações cerebrais. Em menos de 1% das pessoas infectadas, o vírus causa uma infecção neurológica grave, incluindo inflamação do cérebro (encefalite) e das membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal (meningite), demonstrando o papel relevante no contexto da “Saúde Única” (BRASIL, 2022).

A Saúde Única, ou “*One Health*” em inglês, representa uma visão integrada, que considera a indissociabilidade entre saúde humana, saúde animal e saúde ambiental. O conceito foi proposto por organizações internacionais, como a

Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em uma iniciativa chamada “Um Mundo, Uma Saúde”, reconhecendo que existe um vínculo muito estreito entre o ambiente, as doenças em animais e a saúde humana (WHO et al., 2019), e as condições ecológicas na América do Sul, incluindo o Brasil, são propícias para a introdução e manutenção do vNO em ambientes silvestres, com exposição ocasional de animais domésticos e seres humanos, como já ocorrido na Europa e América do Norte (FELIPPE, 2016).

Muitas comunidades realizam a avicultura de subsistência ou de fundo de quintal, com criação de “galinhas caipiras”, situada em comunidades rurais ou periféricas de grandes cidades, caracterizada pela criação extensiva, pequeno número de aves, com manejo sanitário e nutricional deficitários, baixa produtividade e emprego de mão de obra familiar. Contudo, a despeito do formato não tecnificado que resulta em pequena produtividade, este tipo de criação é de grande importância no tocante à segurança alimentar, pois garante o acesso destas famílias à proteína animal de qualidade (CONAN et al., 2012; Galvão Júnior et al., 2009 apud FEITOSA JÚNIOR et al., 2022).

O Brasil possui condições favoráveis para estabelecimento e propagação de arboviroses zoonóticas como a FNO, pois a globalização permite a translocação de patógenos em grande velocidade (CASTRO-JORGE et al., 2019), pelas condições climáticas e territoriais que favorecem a proliferação e atuação dos vetores, e pela presença de vetores competentes e aves susceptíveis como reservatórios, além do quarto rebanho equídeo do mundo, importante espécie sentinela para a detecção precoce da doença e prevenção de ocorrência na população (SILVA et al., 2021).

Portanto, o monitoramento contínuo dos plantéis avícolas, em criações industriais ou de fundo de quintal, para prevenir a introdução e disseminação de enfermidades exóticas, bem como para o controle e erradicação de enfermidades pré-existentes é fundamental, devendo ser realizada a vigilância das criações como ferramenta efetiva na identificação e atuação em focos para controle de doenças como a FNO, aumentando a sensibilidade na detecção precoce da doença (Fouchier et al., 2003 apud FEITOSA JÚNIOR et al., 2022).

A partir de 2009, vários estudos apontaram evidências sorológicas sobre a circulação do VNO no Brasil, com resultados positivos para o VNO em equinos e aves domésticas (sentinelas), bem como o primeiro diagnóstico de doença humana



no Brasil em 2014 no Piauí, casos confirmados da doença em equinos e aves a partir de 2018, com isolamento viral de equinos no Espírito Santo em 2018, demonstram a necessidade de maior conhecimento sobre aspectos da doença e a intensificação de Vigilância para a FNO em áreas consideradas de risco para sua introdução no país, como Sítios Migratórios. Embora a diversidade genômica e dinâmica de transmissão não estejam completamente elucidadas, justificando a necessidade de uma vigilância robusta sobre a circulação e infecção de diferentes espécies, que garanta a rastreabilidade da dispersão do patógeno pelo país (FRITSCH et al., 2022).

De acordo com a Instrução Normativa MAPA nº 50/2013 (BRASIL, 2013), as doenças erradicadas ou nunca registradas e que ocorram pela primeira vez no país como a Febre do Nilo Ocidental (para múltiplas espécies) demandam notificação imediata ao Serviço Veterinário Oficial, no prazo máximo de 24 (vinte e quatro) horas de seu conhecimento, complementarmente, a Portaria MS nº 204/2016 que define a Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, que inclui a Febre do Nilo Ocidental, em consonância com a Portaria MS nº 782/2017 que define a relação das epizootias de notificação compulsória e suas diretrizes para notificação em todo o território nacional, com a inclusão da Febre do Nilo Ocidental na lista das doenças (ou agravo em animais) de notificação compulsória imediata, com base na vigilância animal.

Desta forma, torna-se necessária a vigilância de aves silvestres, limícolas e sentinelas, como galinhas de fundo de quintal que residem no entorno dos sítios migratórios, para detecção precoce de circulação viral do VNO, e instituição de ações de profilaxia e controle à doença, reunindo esforços coletivos dos Serviços de Saúde, Meio ambiente e da Agricultura, para ações conjuntas pautadas no conceito de Saúde única ou “One Health”. Entre as áreas de concentração de aves migratórias no Estado de São Paulo, e que merece atenção, destaca-se o complexo Estuarino-Lagunar de Ilha Comprida e Iguape, localizado no litoral sul do Estado de São Paulo.

O presente estudo objetivou a realização de vigilância epidemiológica para o vNO em aves sentinelas, galinhas de fundo de quintal, localizados no sítio de aves migratórias do Complexo Estuarino-Lagunar de Ilha Comprida e Iguape/SP, com avaliação da circulação do vNO por meio de provas moleculares (RT-PCR), em

virtude da possibilidade de dispersão viral por estas aves como contactantes diretos ou indiretos através dos vetores culicídeos, envolvendo coleções avícolas nativas silvestres e domésticas, mamíferos domésticos e o homem, aumento o risco da introdução e circulação viral nestes locais, sítios de aves migratórias.

O sucesso das ações de resposta às emergências, para o controle e erradicação de focos, está condicionado à agilidade na detecção dos casos. Portanto, a implantação de um sistema de vigilância eficiente é necessária para alicerçar as análises de risco e as estratégias de prevenção e de controle de doenças em animais (BRASIL, 2022).

### 1.1. FEBRE DO NILO OCIDENTAL (FNO)

A Febre do Nilo Ocidental (FNO) é uma doença causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (vNO) (em inglês West Nile virus – WNV), um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, RNA vírus de fita simples, envelopado, composto por três gêneros, que integram o complexo antigênico encefálico japonês que inclui a Encefalite de St. Louis (SLEV) (Américas do Norte e Sul), Encefalite Japonesa (JEV) (Ásia), Encefalite do Vale do Murray (Austrália) e o vírus Kunjin (Austrália), classificado em nove linhagens (L1 - L9), sendo as linhagens 1 e 2 as mais relacionadas à surtos de encefalites em humanos e equinos e hoje considerado um dos flavivírus mais amplamente distribuídos em todo o mundo causando surtos de FNO humanas e animais em todos os continentes, exceto na Antártica (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004; FELIPPE, 2016; COSTA et al., 2020; GANZENBERG et al., 2022).

Os arbovírus apresentam complexas relações ecológicas, cujos cenários variam de paisagens naturais, antropogênicas à áreas urbanizadas, dificultando o entendimento e a previsão do processo de propagação dos mesmos (PETRY et al., 2006). Arbovírus foi o termo introduzido em 1942, derivado da expressão em língua inglesa “arthropod borne virus” que designa um grupo de vírus que permanecem em ciclos da natureza com multiplicação em vetores artrópodes hematófagos e transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados, em sua maioria zoonóticos por serem transmitidos de animais para humanos, sendo conhecidas 100 espécies que

infectam humanos e 40 espécies que infectam animais domésticos (Karabatsos, 1985 apud CHALHOUB, 2017; SERRANO et al., 2021).

## 1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O vNO tem uma ampla distribuição geográfica que inclui partes da Europa, Ásia, África, Austrália e Américas do Norte, Central e do Sul. Acredita-se que as aves migratórias sejam as principais responsáveis pela dispersão do vírus, incluindo a reintrodução do vírus de áreas endêmicas em regiões que sofrem surtos esporádicos. O vNO é mantido em um ciclo de transmissão mosquito-ave-mosquito, enquanto humanos e cavalos são considerados hospedeiros acidentais/terminais (BURKE e MONATH, 2001).

O vNO foi reconhecido como um patógeno humano na África durante a primeira metade do século XX. Nas décadas seguintes, foi um dos arbovírus mais difundidos em mosquitos do gênero *Culex*, pássaros e humanos, com distribuição em algumas regiões da África, no Oriente Médio, na Europa Mediterrânea, na Índia, regiões da Ásia e na Austrália, infectando humanos em todas estas localidades, porém, com doença subclínica ou leve (FLORES e WEIBLEN, 2009; WOA, 2022).

## 1.3 HISTÓRICO E OCORRÊNCIA

O vNO foi identificado pela 1ª vez em 1937, no sangue de uma paciente febril, que participava de um estudo de malária na região do Nilo Ocidental na província de West Nile, em Uganda, na África, de onde deriva o nome da doença e do agente (Smithburn et al., 1940 apud PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008; BRASIL, 2005a). Uma pesquisa paleopatológica sugeriu que a infecção humana pelo vNO possa datar de 323 A.C., e teria sido responsável pela causa *mortis* do rei da Macedônia, Alexandre "O grande" (Marr e Calisher, 2003, apud PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

A partir da década de 1940, o vNO se tornou um dos arbovírus mais difundidos entre vetores mosquitos, pássaros e humanos, com distribuição na África, no Oriente Médio, na Europa Mediterrânea, na Índia, na Ásia e na Austrália, localidades com infecções em princípio humanas, com quadros leves ou subclínicos. Contudo, a

partir dos anos 1950 aos 1970, surtos humanos com maior grau de severidade ocorreram em Israel (1951-1954 e em 1957) e na África do Sul (1974) (HAYES et al., 2005a).

Na década de 50, (1951-1954, 1957), verificou-se a primeira epidemia pelo VNO em seres humanos em Israel, causando meningoencefalite grave, e na África do Sul em 1974, a maior epidemia causada por este agente até então. (HAYES et al., 2005a; VAN DER MEULEN et al., 2005). Apesar da ocorrência destas epidemias, a encefalite humana pelo VNO começou a ocorrer com maior frequência somente a partir de 1996 quando foram registrados surtos na França, Grécia, Israel, Itália, América do Norte, Romênia, Rússia e Tunísia (WOAH, 2022).

Os primeiros estudos sorológicos indicando a infecção pelo vNO em equinos foram realizados em 1956 no Egito e em Israel em 1960, sendo os primeiros casos clínicos da FNO nesta espécie, relatados no Egito no início da década de 1960, quando surtos de doença similar, com quadro neurológico e febril foram descritos no Oriente Médio, no Norte da África e na Europa (HAYES et al., 2005a, 2005b; FLORES E WEIBLEN, 2009).

A partir da década de 1990, as ocorrências de casos graves da FNO em seres humanos e em diversas espécies animais aumentaram, com registros também em regiões que até então não haviam notificado a presença do agente, com epizootias associadas ao VNO em eqüinos no Marrocos (1996 e 2003), na Itália (1998), em Israel (2000) e na França (2000, 2003, 2004), além da constatação da circulação viral em partes de outros países da Europa, Ásia, África e Oceania (HAYES et al., 2005a, 2005b; FLORES E WEIBLEN, 2009). Desde 1998, o VNO tem ocasionado surtos de encefalite em equinos na Argentina, Canadá, França, Israel, Itália, Marrocos, Espanha e Estados Unidos da América (WOAH, 2022).

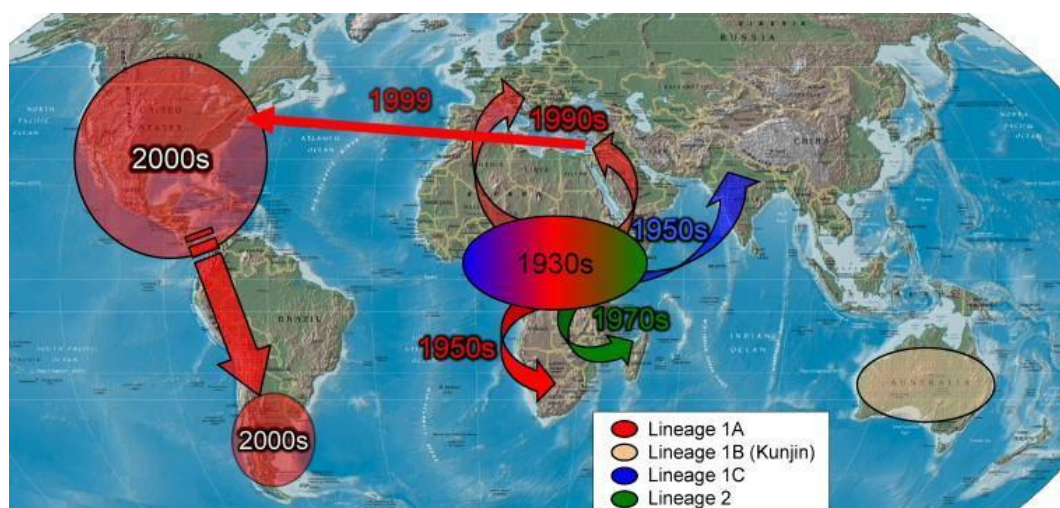
Contudo, o VNO atraiu pouca atenção como causa de doença febril e encefalite até sua introdução na cidade de Nova York em 1999, possivelmente por aves importadas pelo Zoológico do Bronx, em Nova York, quando causou mortalidade de aves de vida livre e do Zoológico, e infectou 67 de pessoas, levando 21 a óbito. A partir deste marco histórico, o vírus se disseminou rapidamente para praticamente todos os Estados norte-americanos, quando foram registradas infecções em mais de 27 mil pessoas com 1100 mortes, casos em 25.000 eqüinos e mortalidade de milhares de aves, com redução da população de algumas espécies silvestres como

o Corvo Americano (*Corvus brachyrhynchos*), acometimento de aves domésticas, mamíferos silvestres e domésticos (FLORES E WEIBLEN, 2009).

Simultaneamente à disseminação da FNO pelo oeste dos EUA, a infecção avançou para o norte do país atingindo o Canadá e também na direção sul, ocasionando surtos da doença no México, América Central, Caribe e América do Sul, resultando na maior epidemia de doença neuroinvasiva pelo VNO relatada nas Américas, sendo que de 1999 a 2004, mais de 7.000 casos de FNO foram relatados somente nos Estados Unidos (KOMAR, 2003; HAYES et al., 2005a; FLORES E WEIBLEN, 2009).

Até a primeira década dos anos 2000, o vírus foi detectado por técnicas sorológicas e/ou virológicas em várias espécies de aves e mamíferos, silvestres e domésticos nas Américas (FLORES E WEIBLEN, 2009). Na América do Sul, o VNO foi isolado pela primeira vez na Argentina em equinos em 2006 e em 2008 de flamingos em cativeiro na Colômbia (DIAZ et al., 2008; MARTINS, 2019). No Brasil há evidências de circulação do vírus da FNO a partir de 2009, com ocorrências nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Piauí, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e São Paulo, sendo estas informações detalhadas a seguir (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; BRASIL, 2018a; ADAPAR, 2021; MEIRELES et al., 2022,).

Figura 1: Provável rota temporal e dispersão do vírus a partir da primeira ocorrência na Província de West Nile em Uganda (África) em 1937, Ásia Ocidental, Oriente Médio e Europa



Fonte: WEAVER e REISEN (2009)

A análise genética de isolados de VNO distinguiu as cepas em várias linhagens. Os isolados da linhagem 1 são encontrados no norte e centro da África, Oriente Médio, Europa, Índia, Austrália (vírus Kunjin) e em América do Norte e

Central, Colômbia e Argentina na América do Sul. As cepas da linhagem 2 são endêmicas na África central e meridional e em Madagascar, com co-circulação de ambas as linhagens de vírus na África central. A circulação de cepas da linhagem 2 foi relatada na Áustria, Grécia, Hungria, Itália, Romênia e Rússia. Cepas de vírus de linhagem 1 ou linhagem 2 podem estar implicadas em doenças humanas ou animais (WOAH, 2022).

#### 1.4 FATORES E ÁREAS DE RISCO PARA FEBRE DO NILO OCIDENTAL

O conjunto de fatores como a presença de aves migratórias, alta densidade populacional equina e condições ambientais e climáticas favoráveis à proliferação dos vetores culicídeos, podem resultar em epidemias de encefalomielite pelo VNO. Estudos demonstraram que focos de FNO têm ocorrido principalmente em ecossistemas úmidos, como deltas de rios e planícies inundáveis, localidades com altas temperaturas e atividades agricultáveis (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

O Brasil apresenta dimensões continentais com extensas fronteiras com países como a Colômbia, Venezuela e Argentina (que apresentam ocorrência da circulação viral), facilitando a entrada do vírus; o clima tropical e equatorial, com elevada umidade e médias térmicas acima de 18°C durante todo o ano que contribui para a reprodução e manutenção de elevada densidade populacional de artrópodes vetores como o *Culex spp*; a diversidade de aves residentes ou de hábitos migratórios, como eventuais hospedeiros vertebrados amplificadores e uma expressiva equinocultura, espécie importante como sentinela à FNO. Todos estes fatores associados criam localidades propícias à introdução e manutenção do VNO em ciclo enzoótico já descrito, tornando – se áreas de risco para a doença.

Regiões como a Amazônia e o Pantanal brasileiro, que apresentam estas condições ecológicas, ocupam grande área do território nacional e configuram ambientes propícios a circulação de arbovírus, são exemplos de áreas de risco (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

O Pantanal vem sendo impactado desde a década de 90 pela conversão da vegetação natural em campos agrícolas e pastagens de gado, com alteração e

perda de habitats naturais e redução da biodiversidade, através também do desmatamento da vegetação de cerrado, onde os principais rios do Pantanal nascem; todos estes fatores associado podem impactar diretamente na concentração de hospedeiros vetores e vertebrados, afetando a dinâmica de transmissão de arbovírus na região, com aumento do risco de surtos de doenças transmitidas por vetores como a FNO (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014).

Estudo de LORENZ et al. (2022), confirmaram as associações entre o aumento da incidência de FNO com temperaturas mais altas e menor precipitação de chuvas, visto que temperaturas maiores aumentam a fecundidade e a ingestão de sangue por mosquitos *Culex* que transmitem o VNO, reduzindo seu tempo de desenvolvimento. Uma grande população de mosquitos vetores associada a um comportamento hematofágico ornitofílico em espécies de reservatório, aumenta a probabilidade da detecção do VNO em regiões nas quais estas variáveis estejam presentes.

A presença de aves migratórias e culicídeos na área urbana e de matas sinalizam para o risco de introdução e transmissão do VNO e o conhecimento das espécies de mosquitos existentes nestes ambientes propicia subsídios para a vigilância destas enfermidades. De acordo com estudo desenvolvido por DIBO et al. (2011) sobre a presença de culicídeos em São José do Rio Preto/SP e risco de ocorrência de FNO, a grande abundância de *Culex quinquefasciatus* detectados na área urbana, colocariam o município sob risco de ocorrência de arboviroses, com destaque para a transmissão do VNO.

A alta proliferação e abundância do *Culex quinquefasciatus* ao longo do ano na área urbana no município relaciona - se com as condições ecológicas presentes como criadouros formados pelas margens de córregos e esgotos a céu aberto, alta densidade populacional humana como fonte de alimento e grande quantidade de domicílios que servem de abrigo ao mosquito, além da presença de aves também como fonte alimentar por ser o vetor antropo e ornitofílico (DIBO et al., 2011). Esta constatação torna – se preocupante visto que além de incomodidade pelas picadas, o *Culex quinquefasciatus* é vetor eficiente na transferência do VNO em laboratório e na natureza, de aves para humanos e equinos, de acordo com estudo de competência vetorial realizado na Califórnia (GODDARD et al., 2002).

Deve ser dada atenção neste contexto, para a ocorrência de aves migratórias em centros urbanos do país, como a andorinha (*Hirundo rústica*), comum nos

habitats de brejos, banhados, lagos e áreas antropizadas, o falcão (*Falco peregrinus*), e o gavião (*Buteo swainsoni*), aves que migram para a América latina, e que poderiam carrear em seu organismo o VNO. Além das migratórias, que podem habitar virtualmente todos os ecossistemas, sejam eles de matriz florestal ou campestre, lacustres, costeiros ou marinhos (SOMENZARI et al., 2018), o pardal (*Passer domesticus*) de áreas antropizadas, encontrado no Estado de São Paulo como residente, poderia desempenhar o papel de hospedeiro amplificador do VNO. Concluiu – se pelo exposto, que essas condições conjuntamente favoreceriam a circulação viral do VNO (DIBO et al., 2011).

Portanto, são consideradas áreas de risco para circulação do VNO, regiões com temperaturas mais elevadas, alta pluviosidade, (que possibilitam a reprodução e alta concentração do *Culex*), abundância do *Culex quinquefasciatus*, presença de aves migratórias, limícolas e aves residentes como o pardal, presença de sentinelas como equinos e galinhas e adensamento humano próximo às áreas de proliferação do vetor, como o Pantanal do Mato Grosso, a região Amazônica, o litoral brasileiro e a maioria dos municípios nos quais estas condições estejam presentes.

## 1.5 SÍTIO DE AVES MIGRATÓRIAS

Migração é o fenômeno que engloba diversos tipos de movimentos realizados pelas aves, desde invasões esporádicas, “irruptive migration”, até viagens regulares e sazonais de longa distância (ICMBIO, 2016), envolvendo o deslocamento de populações e não de indivíduos (ICMBIO, 2016), com ida e volta para sítios de reprodução e alimentação (ICMBIO, 2016). As condições desfavoráveis de poucos recursos relacionados à alimentação e áreas de reprodução (nidificação), estimulam os deslocamentos para áreas nas quais os recursos são abundantes (ICMBIO, 2016), podendo também estar relacionados à busca por água e diminuição de competição ente os indivíduos ou espécies. (ICMBIO, 2016). Em suma, a migração é uma resposta das populações silvestres a uma condição sazonal de baixa disponibilidade de recurso para outra onde o recurso é farto.

Uma espécie é classificada como migratória quando pelo menos parte de sua população realiza movimentos cíclicos e sazonais com alta fidelidade aos seus sítios de reprodução (ICMBIO, 2019). Espécies migratórias apresentam necessidades



especiais para sobreviver tendo em vista a necessidade de conservação de habitat e recursos alimentares em áreas distintas, separadas por milhares de quilômetros entre os sítios de reprodução e de invernada, bem como a necessidade de preservação de áreas de descanso e alimentação entre essas duas regiões.

O Brasil é o segundo país do mundo em diversidade de aves, com 1.919 espécies, sendo que 198 espécies atendem aos critérios que definem a migração; destas, 50% se reproduzem no país, e as demais foram consideradas migratórias (ICMBIO, 2019), com sítios de reprodução em outros países como na região circumpolar relacionada à América do Norte e Groenlândia (aves setentrionais), ou em áreas no sul da América do Sul e Antártida (meridionais) e a oeste, na região andina. Essas aves deixam suas áreas reprodutivas quando as condições se apresentam desfavoráveis, partindo em busca de locais que com maior disponibilidade de alimento e habitat para continuação de processos biológicos como as mudas de penas, para depois retornarem às suas áreas de origem completando assim seu ciclo biológico (ICMBIO, 2019).

O Relatório de áreas de concentração de aves migratórias no Brasil, realizado pelo ICMBio (2022), relacionou as áreas com sensibilidade de espécies migratórias e as áreas de agregação com expressivo número de indivíduos, para definir o mapa de áreas de concentração de aves migratórias, que ocupa 737.000 km<sup>2</sup> ou, 8% da superfície do Brasil, dividido em 57 áreas de agregação, em 19 estados, além de ilhas oceânicas, sendo a maioria das regiões, de ocorrência de espécies migratórias limícolas e costeiro-oceânicas. Entre os padrões detectados no estudo realizado, observou – se um adensamento de espécies nas regiões Sul e Sudeste pela importância das áreas nessas regiões para as espécies de aves migratórias, e a ocorrência destas aves em grande parte na faixa litorânea, justificada pela abundância de registros ao longo de toda rota Atlântica no país.

Aves limícolas podem ser vistas em pequenos bandos em qualquer lugar da costa brasileira, em pequenas porções de habitat que oferecem condições para obtenção de alimento, áreas frequentadas pelas espécies em migração que podem ter que se deslocar milhares de quilômetros entre um ponto de alimentação e outro. Sem esses pontos de parada, os indivíduos não conseguirão completar seu ciclo anual de deslocamento, e a raridade desses locais contribui para aglutinar centenas a milhares de aves migratórias, de uma ou várias espécies (ICMBIO, 2022).

De acordo com o Relatório ICMBIO, 2022 e o Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil, ICMBIO, 2019, as áreas de agregação de indivíduos de aves migratórias por região no país, são as seguintes:

**a.** Região Nordeste: Alagoas: Pontal do Peba e ilha do Cabeço; Bahia: Mangue Seco, Baía de Todos os Santos e Cacha-Prego, Baía de Camamu; Barra Velha e ilha Coroa Vermelha, Corumbau, Ponta do Curral; Ceará: Ilha Grande, Região do Banco dos Cajuais; Maranhão: Reentrâncias Maranhenses, Baixada Maranhense, Praias de Raposo e Panaquatira; Paraíba: Ilha da Restinga; Pernambuco: Parque dos Manguezais, Ilha da Coroa do Avião; Rio Grande do Norte: Foz do rio Apodi-Mossoró e salinas de Areia Branca, Complexo Litorâneo da Bacia Potiguar, Lagoa de Guaraíras, Foz do rio Cunhaú; Sergipe: Estuário do rio Sergipe e praia de Atalaia, Praias e manguezais do estuário do rio Vaza-Barris, Complexo estuarino dos rios Piauí, Fundo e Real;

**b.** Região Norte: Amapá: Praia do Goiabal, Praias do Parque Nacional do Cabo Orange; Amazonas: Lagos e igarapés da Reserva Extrativista Catuá-Ipixuna, Lagos e igarapés da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçu – Purus, Rio Solimões e afluentes na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Ilhas do Cumaru e do Papagaio; Pará: Reentrâncias Paraenses; Tocantins: Parque Estadual do Cantão;

**c.** Região Sudeste: Espírito Santo: Ilhas dos municípios de Vila Velha, Guarapari e Marataízes, Foz do rio Doce; Rio de Janeiro: Região de Quissamã; São Paulo: Várzea e foz do rio Embu-Mirim (bacias dos rios Embu-Mirim e Guarapiranga), manguezais da baixada Santista (mangues entre Cubatão, Praia Grande e a região da barra do canal de Bertioga), Arquipélago de Alcatrazes e Ilhas costeiras do litoral paulista (arquipélago de Alcatrazes e Ilhabela, Ilhas costeiras de Castilho, Lajes de Santos e da Conceição e o ilhote das Gaivotas), Castilho em Cananéia, Iguape e Ilha Comprida, Ilha da Figueira (divisa estado do Paraná);

**d.** Região Centro-Oeste: Mato Grosso: Chapada dos Guimarães, Rio Cuiabá-Sesc Pantanal, Estação Ecológica Taiamã e região;

e. Região Sul: Paraná: Parque Municipal Barigui, Parque Regional do Iguazu e adjacências, Parque Nacional Marinho das Ilhas dos Currais, ilha da Figueira e ilhas Itacolomis, Nordeste dos Campos Gerais, Trecho inferior do rio Ivaí; Rio Grande do Sul: Banhado do Maçarico, Estuário da laguna dos Patos, Reserva Biológica do Mato Grande e extremo sul do canal São Gonçalo, Banhado do Taim, Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Praias do Litoral Médio, Banhado Capão da Areia, Margem oeste da lagoa Mirim; Santa Catarina: Municípios de Bocaina do Sul, Painel e Urupema, Coxilha Rica e Estância do Meio, Ilhas marinhas costeiras da Deserta (Reserva Biológica Arvoredo), Moleques do Sul (Parque Estadual do Tabuleiro) e Ilhas Itacolomis, Foz do rio Tijucas, Praias entre a foz do rio Urussanga e a Foz do rio Araranguá;

f. Zona Pelágica: Ilhas oceânicas: arquipélagos de Fernando de Noronha (PE) e de Abrolhos (BA), Atol das Rocas (RN) e Ilhas de Trindade e Martim Vaz (ES).

No estado de São Paulo, o complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape (ou complexo do Lagamar), é formado pelos municípios de Ilha Comprida e Iguape, está localizado no litoral sul do Estado de São Paulo, distante 209 km da capital paulista, com 3.400Km<sup>2</sup> de área terrestre e 2.450 Km<sup>2</sup> de área marinha, composto por ilhas, ilhotes, lajes, e costões, vegetação composta por restingas, mangues, brejos, dunas, praias e matas da planície atlântica, fauna residente (aves silvestres, sinantrópicas e domésticas) e aves migrantes dos hemisférios norte e sul, que compõem um complexo ecossistema, com pontos de internada utilizados por espécies migratórias para descanso e alimentação, e que propiciam o encontro destas com as aves nativas (domésticas e ou silvestres), favorecendo a disseminação de agentes infecciosos para o plantel avícola nacional. (VALENTE et al., 2011; DEFESA AGRO, 2021; ICMBIO, 2022).

O município de Ilha Comprida é considerado uma das regiões mais importantes para as espécies migratórias da família Charadriidae e Scolopacidae no sudeste brasileiro, por suas características atrativas para a alimentação, descanso e restabelecimento de aves neárticas durante os deslocamentos migratórios: faixa litorânea com 70 km de extensão composta por substrato arenoso, amplitude das marés e a proximidade com mangues e planícies intermareais (VALENTE et al.,

2011). As regiões de Cananéia e Ilhas Costeiras, Ilha do Cardoso e Ilha Comprida são reconhecidas pelo Departamento de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) como sítio de aves migratórias no Estado de São Paulo, conforme o Informativo PNSA Nº 4 – DSA/MAPA (BRASIL, 2010), que reporta o reconhecimento de vinte sítios de aves migratórias em dez estados brasileiros incluindo São Paulo.

## 1.6 ROTAS INTERCONTINENTAIS DE AVES MIGRATÓRIAS

Em acordo com o Relatório de Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil (ICMBIO, 2022), 92 (42%) das 216 espécies migratórias se reproduzem no país, enquanto que os ciclos reprodutivos das outras 124 espécies não ocorrem no Brasil, mas na América do Norte, no sul da América do Sul, na Antártida e na região dos Andes, sendo denominadas visitantes de verão e visitantes de inverno: aves oriundas do hemisfério norte (América do Norte, Groenlândia, Antártida), vêm ao Brasil durante a primavera e verão; já espécies austrais se deslocam para sítios de internada localizados nos estados da região Sul e Sudeste do país durante o outono e inverno, quando os chamados visitantes de verão iniciam seu retorno às respectivas origens. Estas espécies são observadas em todas as estações do ano no Brasil (SOMENZARI et al., 2018; ICMBIO, 2019), e que apresenta as seguintes definições:

**a.** Espécies migrantes neárticas: são as espécies que se reproduzem na América do Norte, desde o Ártico até o México – visitantes de verão e passam o período de internada na América do Sul;

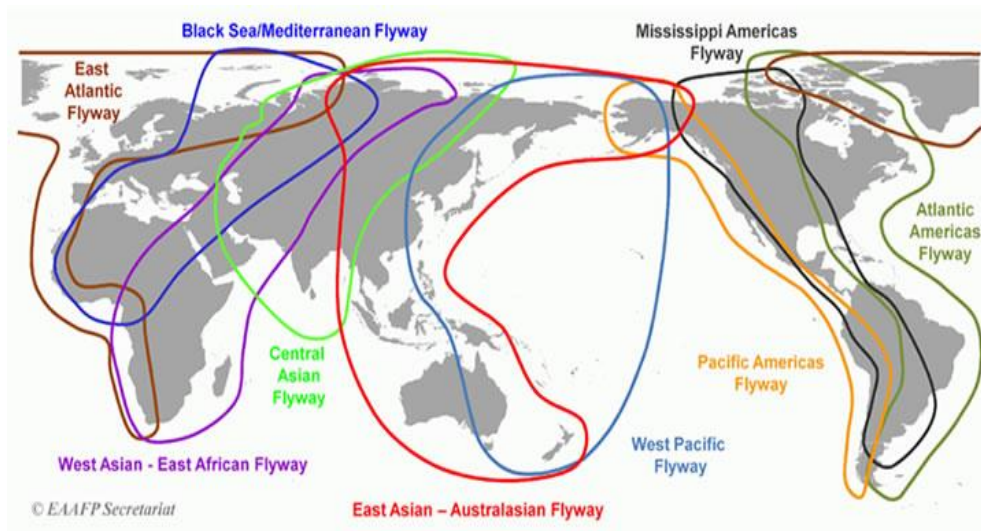
**b.** Aves migrantes neotropicais-austrais: espécies encontradas em fase reprodutiva na região temperada da América do Sul, que migram para o norte do continente durante o inverno austral – visitantes de inverno.

As principais rotas de aves migratórias neárticas nas Américas, os visitantes de verão, foram reconhecidas devido ao trabalho realizado de anilhamento, soltura e recaptura de aves e uso de geolocalizadores, embora passeriformes não

apresentem rotas definidas por migrarem em amplas e distintas áreas, (Relatório de Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil (ICMBIO, 2022). As rotas intercontinentais entre as Américas, utilizadas durante a migração das aves migratórias neárticas, são as seguintes:

- a. Origem na Costa Leste do Canadá e Estados Unidos: atravessam o Atlântico, (vôos ininterruptos, ou paradas em ilhas do Caribe), Golfo do México, Ilhas do Mar das Antilhas, América do Sul pela costa da Colômbia, Venezuela e Guianas, e rotas diversas no Brasil;
- b. Origem no interior do Canadá e Estados Unidos: migram pelo interior do Canadá e Estados Unidos, atravessam os países da América Central, pela costa atlântica ou pela costa pacífica (ICMBIO, 2019).

Figura 2: Rotas migratórias intercontinentais



Fonte: EAAFP, 2019

## 1.7 ROTAS DE AVES MIGRATÓRIAS NO BRASIL

Segundo o Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil, publicado pelo ICMBIO, 2019, no Brasil são conhecidas cinco rotas principais que se comunicam com as rotas intercontinentais, utilizadas por aves migratórias neárticas, as quais podem acessar o país por uma ou mais rotas, inclusive com a utilização de rotas distintas na chegada e na partida: (1) Rota

Atlântica, que se estende ao longo de toda costa brasileira, do Amapá até o Rio Grande do Sul; (2) Rota Nordeste, que é uma divisão da Rota Atlântica, início na Baía de São Marcos no Maranhão e no Delta do Parnaíba (Maranhão/Piauí), segue pelo interior do Nordeste até a costa da Bahia; (3) Rota Brasil Central, é uma outra divisão da Rota Atlântica com início na foz do rio Amazonas e arquipélago de Marajó, segue pelos rios Tocantins e Araguaia, passa pelo Brasil Central e termina no vale do rio Paraná em São Paulo; (4) Rota Amazônia Central/Pantanal, as aves chegam pelos rios Negro, Branco e Trombetas, passam por Manaus e Santarém, seguem pelo vale dos rios Madeira e Tapajós até o Pantanal e (5) Rota Amazônia Ocidental ou Rota Cisandina, entrada no Brasil pelos vales dos rios Japurá, Içá, Purus, Juruá e Guaporé, até o Pantanal.

Figura 3: Principais rotas de aves migratórias no Brasil



Fonte: ICMBIO, 2016

## 1.8 VÍRUS DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL (vNO)

Os flavivírus pertencentes à encefalite japonesa, incluindo o VNO, vírus da Febre amarela e da Dengue foram classificados em oito sorocomplexos antigênicos com base em características de neutralização cruzada com antissoros gerados entre

diferentes vírus, e estão associados à maior incidência de doença em humanos e animais (WESTAWAY et al., 1985).

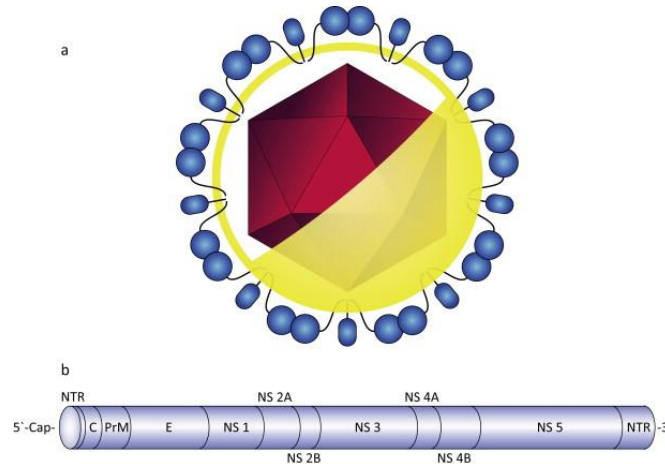
O vNO que forma vírions envelopados (cujo envelope lipídico deriva da célula hospedeira e contém as glicoproteínas M e E), tem forma esférica, apresentando um capsídeo icosaédrico composto por múltiplas cópias da proteína básica C, de 30 a 35 nm, englobando o genoma composto por uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11.000 nucleotídeos sendo a largura do vírus envelopado de 45 a 50 nm (Figura aeb) (PETERSEN e ROEHRIG, 2001; FLORES e WEIBLEN, 2009; ANGENVOORT et al., 2013; CASTRO-JORGE, 2019; BYAS e EBEL, 2020).

Dentro das células hospedeiras o RNA genômico dos flavivírus codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C) responsável pela estrutura da partícula viral; pré-Membrana/membrana (prM/M - a primeira compõe a estrutura dos virions imaturos, sendo a proteína M gerada a partir da clivagem da prM, previamente à extrusão viral da célula hospedeira), envolvida na estrutura de superfície e na infectividade do vírus; e envelope (E), a proteína estrutural mais importante do vírion, a hemaglutinina viral, intermedeia as interações iniciais com os receptores celulares durante a penetração nas células hospedeiras (FLORES E WEIBLEN, 2009) sendo responsável pela ligação vírus-célula hospedeira e indução de resposta imune através da liberação de anticorpos neutralizantes do vírus (PETERSEN e ROEHRIG, 2001) no terço 5' do genoma, responsáveis pela replicação intracelular, virulência e patogenicidade do vírus e sete proteínas não estruturais NS (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) nos dois terços restantes do genoma, responsáveis pela replicação intracelular, virulência e patogenicidade do vírus (BYAS e EBEL, 2020). Estes são flanqueados por regiões não traduzidas 5' e 3' envolvidas na transcrição e tradução (HEINZ et al., 2000; PETERSEN e ROEHRIG, 2001; ANGENVOORT et al., 2013).

As proteínas estruturais do vírus estão envolvidas na encapsidação do RNA (Capsídeo C) atuando como andaimes e estruturas físicas para interações que facilitam a endocitose mediada por receptor e a fusão do envelope (pré-membrana prM/M) e proteínas do envelope (E). Todas as sete proteínas não estruturais estão envolvidas em diferentes funções associadas à síntese de RNA, como RNA polimerase dependente de RNA emetiltransferase (NS5), bem como funções de helicase e protease (NS3). Tanto as proteínas estruturais quanto as não estruturais

são traduzidas como uma grande poliproteína que é clivada nas respectivas proteínas virais pelas proteases do hospedeiro e do vírus (ANGENVOORT et al., 2013).

Figura 4: Estrutura do Vírus do Nilo Ocidental



Fonte: Adaptado de ANGENVOORT et al. (2013)

### 1.8.1 Grupos Filogenéticos

Os vírus do Nilo Ocidental podem ser designados em pelo menos quatro grupos filogenéticos ou linhagens com base em análises de sequências. A linhagem 1 é subdividida nos clados 1a (África, Oriente Médio, Ásia, Europa, América do Norte), 1b (vírus Kunjin da Austrália) e 1c (vírus da Índia) (HAYES et al, 2005a; MAY et al., 2011). Os vírus da linhagem 2 circulam na África Subsaariana e em Madagascar, e como as cepas de linhagem 1, foram associados a surtos humanos e equinos na Hungria, Romênia, Rússia, Grécia, Itália e África do Sul (ANGENVOORT et al., 2013).

Inicialmente, os vírus da linhagem 1 foram considerados mais virulentos do que os vírus da linhagem 2; no entanto, foi demonstrado que ambas as linhagens podem causar doenças neuroinvasivas em humanos e animais (HAYES et al, 2005a; BYAS e EBEL, 2020). O vírus da linhagem 3 (Rabensburg) é representado por dois isolados da República Tcheca e se replica mal em hospedeiros vertebrados, enquanto a linhagem 4 é composta de isolados de carrapatos da Rússia; ambos incapazes de provocar doenças em humanos ou equinos (ANGENVOORT et al., 2013).



## 1.9 CICLO DE VIDA E PATOGÊNESE DO VÍRUS DO NILO OCIDENTAL

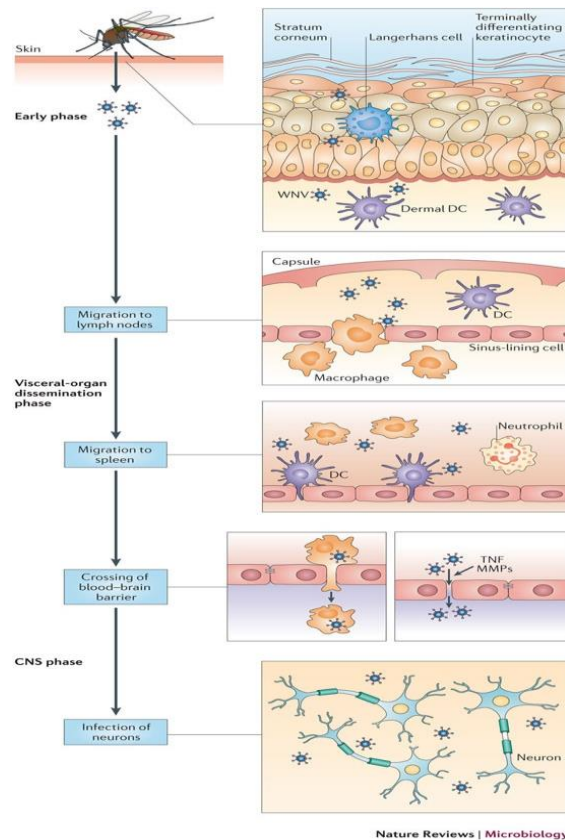
Modelos animais experimentais de infecção pelo vNO, incluindo camundongos, hamsters e primatas não humanos, forneceram informações sobre a patogênese do vírus em seres humanos. Especialmente estudos em camundongos possibilitaram a identificação de fatores genéticos virais e do hospedeiro que controlam a replicação e o resultado da infecção (SAMUEL e DIAMOND, 2006).

Estudos em cobaias identificaram três fases distintas da patogênese do vNO: fase inicial infecção inicial e disseminação, fase de disseminação do órgão visceral - amplificação viral periférica e fase do sistema nervoso central (SNC) representada pela neuroinvasão que emulam as fases da patogênese que ocorrem em um ser humano após a infecção pelo vNO através da picada de um vetor culicídeo (SAMUEL e DIAMOND, 2006).

Após uma picada subcutânea de um mosquito, acredita - se que o vNO se replique nos queratinócitos e nas células dendríticas dérmicas (DCs) residentes na pele e nas células de Langerhans (o RNA vírus pode persistir na pele por até 4 meses após a inoculação em camundongos e 1 mês em aves). As células dendríticas dérmicas infectadas migram para o linfonodo de drenagem regional e espalham o vírus dentro deste linfonodo (viremia primária). A replicação dentro do linfonodo de drenagem leva à viremia e subsequente infecção de órgãos periféricos, incluindo tecidos permissivos como o baço e tecidos não permissivos como rins e fígado.

No dia 4, a replicação viral atinge o pico no baço e no soro (viremia secundária); entre o dia 6 e o dia 8 após a infecção, o VNO é eliminado dos órgãos periféricos e é detectado no cérebro e na medula espinhal, devido ao fato de o vírus atravessar a barreira hematoencefálica, pelo aumento da permeabilidade das células endoteliais através da secreção do fator de necrose tumoral (FNT), pela quebra das junções das células endoteliais através da ação das metaloproteinases da matriz (MMPs), ou através de um mecanismo de 'Cavalo de Tróia', pelo qual o vírus é transportado para o sistema nervoso central (SNC) por células imunes infectadas (SUTHAR et al., 2013).

Figura 5: Esquema da patogênese do vírus do Nilo Ocidental (WNV) em humanos



Fonte: Adaptado de SUTHAR et al., (2013)

Dependendo da viremia secundária, o vírus pode acometer o Sistema Nervoso Central causando desordens neurológicas em virtude de sua proliferação em neurônios e células da glia, em núcleos profundos e na massa cinzenta do cérebro, tronco encefálico e medula espinhal, citotoxicidade do sistema imune em resposta às células infectadas, inflamação perivascular difusa e formação de nódulo microglial, sendo que a destruição colateral de células nervosas pode contribuir para desenvolvimento de paralisia (HAYES et al., 2005a; PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

O neurotropismo viral impulsiona grande parte das pesquisas, mas a doença pode acometer outros órgãos em hospedeiros vertebrados como tecido renal que é um dos sítios replicativo do vNO, sendo que o RNA vírico já foi detectado em amostra de urina humana. Além do sistema urinário, existem relatos de infecção com acometimento do sistema digestivo e manifestações hemorrágicas (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2008), em células do baço, fígado, coração, linfonodos e pulmão dependendo da espécie hospedeira (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

## 1.10 REPLICAÇÃO VIRAL

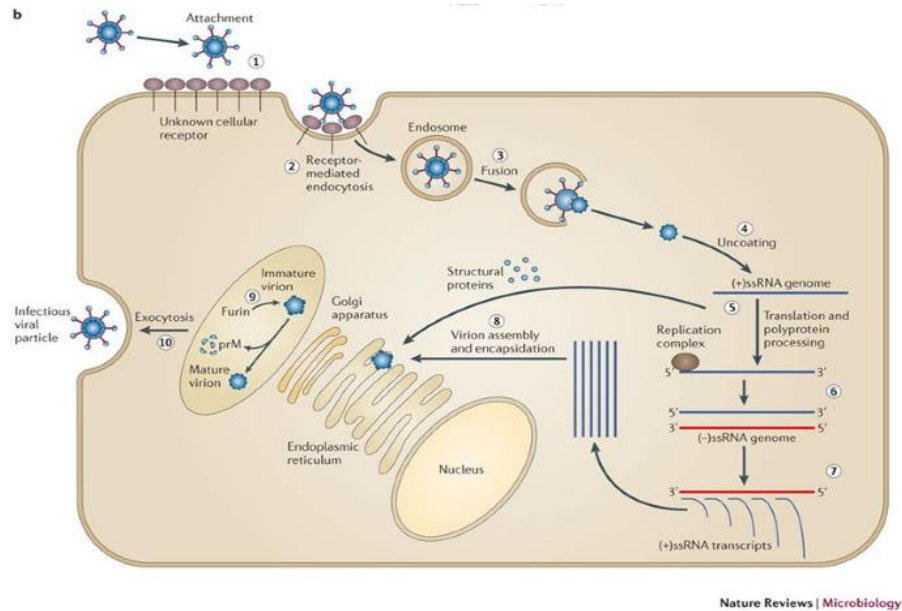
O ciclo de vida de replicação do VNO (Figura b) começa com a ligação a um receptor de superfície celular desconhecido, endocitose, fusão com a membrana endossomal e entrega do genoma de RNA infeccioso no citoplasma (BRINTON, 2002). O genoma é traduzido como uma única poliproteína, e a subsequente clivagem dessa poliproteína por proteases virais e do hospedeiro codifica três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) já descritas acima (FLORES E WEIBLEN, 2009; SUTHAR et al., 2013). As proteínas estruturais formam o vírion que encapsida o RNA viral, e as proteínas não estruturais formam o complexo de replicação necessário para a síntese do RNA viral de sentido negativo e positivo. Após a montagem do virion e transporte através da via secretora do hospedeiro, a partícula viral madura é liberada de uma célula infectada por exocitose (SUTHAR et al., 2013).

O vNO infecta uma ampla variedade de células-alvo. A entrada do virion é iniciada após a proteína do envelope, E, envolver um receptor celular desconhecido (etapa 1), seguido por endocitose mediada por receptor do vírus (etapa 2). O ambiente de baixo pH dentro da vesícula endossomal desencadeia a fusão viral com a membrana endossomal (etapa 3), levando ao desrevestimento do vírion e liberação do genoma de RNA de fita simples de sentido positivo viral ((+)ssRNA) no citoplasma (etapa 4). O (+)ssRNA viral é traduzido em uma única poliproteína no RE e clivado em proteínas maduras pela proteína serina protease viral não estrutural 2B–3B (NS2B–NS3) e proteases celulares (etapa 5). As proteínas NS, incluindo a polimerase de RNA dependente de RNA viral NS5, formam o complexo de replicação para a síntese de intermediários ssRNA de sentido negativo completo (-)ssRNA (etapa 6).

Estes servem como modelos para a síntese de (+)ssRNAs completos (etapa 7). A proteína do capsídeo viral, C, é responsável pela encapsidação do RNA genômico viral, com a montagem ocorrendo nas membranas rugosas do RE (etapa 8). Virions imaturos são transportados através da via secretora do hospedeiro, resultando em glicosilação da proteína E viral e clivagem da proteína prM mediada pela furina da célula hospedeira para a proteína de membrana madura, M (etapa

9). Virions maduros são transportados para a membrana plasmática e liberados por exocitose (etapa 10) (BRINTON, 2002; SUTHAR et al., 2013).

Figura 6: Esquema da organização do genoma do Vírus do Nilo Ocidental (VNO)



Fonte: Adaptado de SUTHAR et al., 2013

## 1.11 VETOR VIRAL

Vetor é um inseto ou qualquer portador vivo que transporta um agente infeccioso de um indivíduo infectado para um indivíduo suscetível ou seus alimentos ou arredores imediatos. O organismo pode ou não passar por um ciclo de desenvolvimento dentro do vetor (WOAH, 2022). Os vetores biológicos são artrópodes que através da hematofagia, transmitem agentes patogênicos aos hospedeiros suscetíveis, pois carregam em seu organismo o patógeno que se ali se multiplica, e é transmitido ao próximo hospedeiro, garantindo a circulação do agente infeccioso (BRASIL, 2011). A identificação como vetor para determinada espécie de artrópode deve atender aos seguintes critérios: isolamento repetido de vírus em mosquitos capturados à campo, competência vetorial comprovada em estudos de laboratório e capacidade vetora à campo, considerando-se ainda a correta identificação entomológica, não contaminação dos pools de mosquitos capturados e presença de vetores que se infectam mas são incompetentes na transmissão viral pela picada (TURELL et al., 2001).

As mudanças climáticas têm sido determinantes para o aumento do número de surtos de FNO observados em todo o mundo nos últimos anos, pois temperaturas mais altas influenciam a competência do vetor, acelerando a replicação viral no mosquito (período de incubação extrínseco), prolongando a estação reprodutiva e provocando um aumento nas taxas de crescimento populacional do vetor, que encurtam o intervalo entre repastos sanguíneos e aumentam a eficiência da transmissão viral às aves (COSTA et al, 2020 ; FLORES e WEIBLEN, 2009).

### 1.11.1 *Culex spp*

Os mosquitos culicídeos, em especial as espécies ornitofílicas do gênero *Culex*, são apontados como os potenciais vetores do Vírus do Nilo Ocidental (HUBÁLEK e HALOUZKA, 1999). A família *Culicidae* está dividida em duas subfamílias, *Anophelinae* e *Culicinae*. Dentro de *Culicinae* são reconhecidas as tribos *Aedeomyiini*, *Aedini*, *Culicini*, *Culisetini*, *Ficalbiini*, *Hodgesiini*, *Mansoniini*, *Orthopodomyiini*, *Sabethini* e *Uranotaeniini* (HARBACH e KITCHING, 1998).

O VNO foi isolado em 43 espécies de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Coquillettidia*, *Anopheles* e *Mansonia* (fato que pode ser explicado pelo comportamento oportunista dos quatro últimos gêneros quanto à hematofagia); contudo espécies do gênero *Culex* foram as envolvidas com maior frequência (KOMAR et al., 2005; DIBO et al., 2011).

Foram identificados como principais vetores do VNO os seguintes mosquitos, por região ou país: na Europa o *Culex pipiens*, *Culex modesto*, e *Coquillettidia richiardii*, na África e Oriente Médio, o *Culex univittatus* e *Culex antenatus* embora o *Culex poicilipes*, *Culex neavei*, *Culex decens*, o *Aedes albocephalus* e *Mimomyia spp.* possam desempenhar papel relevante em áreas específicas; na Índia, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus* (HUBÁLEK e HALOUZKA, 1999) e espécies do gênero *Culex* complexo vishnui (ZELLER e SCHUFFENECKER, 2004); na Austrália o *Culex anelirostris* é vetor do vírus Kunjin (Hall et al., 2002 apud HAYES et al., 2005)

Na América do Norte, a presença do vírus da FNO foi descrita em 59 espécies de mosquitos; contudo, apenas dez espécies foram consideradas vetores (KOMAR et al., 2003; BLACKMORE et al., 2001), sendo o *Culex pipiens* a espécie inicialmente identificada na transmissão do vírus na região norte (nos surtos de 1999) e o *Culex*

*quinquefasciatus* na região sul dos Estados Unidos, aonde existem aves migratórias que se deslocam para a América do Sul no inverno, espalhando o VNO (DIBO et al., 2011).

No período compreendido entre 2001 e 2004, após grandes surtos e epidemia da FNO em Nova York e Nova Jersey (EUA), a análise de mais de 300.000 culicídeos detectou a presença de RNA viral através do RT-PCR em 363 grupos identificados com os gêneros *Psorophora*, *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus* e *Culex* (Pauvolid-Corrêa et al, 2008; White, 2001). Contudo, os vetores de maior relevância no ciclo de transmissão são culicídeos do gênero *Culex* (Pauvolid-Corrêa, 2008). Foram identificados como aptos à transmissão viral, e positivos para o VNO, os seguintes mosquitos do gênero *Culex*: *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis* (importante nos ecossistemas rurais) (NATAL e UENO, 2004) e *Culex pipiens* (predominante nas áreas urbanas) (NATAL e UENO, 2004), sendo que *Culex salinarius*, *Culex nigripalpus*, *Culex restuans* e *Culex pipiens* foram identificados como importantes vetores com maior número de pools positivos para o VNO no início dos surtos em 1999 (BLACKMORE et al., 2001; TURELL et al., 2001). Outros culicídeos como *Culex erythrothorax*, espécies dos gêneros *Ochlerotatus* e *Culiceta* seriam “vetores-ponte” no ciclo de transmissão da doença na América (TURELL et al., 2001).

O *Culex spp.* é um inseto, pertence ao gênero *Culex*, espécie de mosquito vetor mais disseminada no Brasil, ocorrendo por todo o território nacional. A fêmea é hematófaga, com elevada fecundidade, alto índice reprodutivo e curto ciclo biológico (> 10 gerações anuais), sendo os adultos alados, enquanto as fases imaturas (larvas) são aquáticas e necessitam de água parada com alta grande concentração de matéria orgânica para se desenvolver; por esta razão, a proliferação excessiva em determinada região indica poluição dos corpos-d’água (BRASIL, 2016).

O ataque ao homem pelo *Culex quinquefasciatus*, principal vetor do agente causador da filariose e possível vetor do Vírus do Nilo Ocidental, ocorre à noite, preferencialmente durante o repouso. Utiliza as residências humanas como abrigo, mas apresenta estímulo para a hematofagia somente no crepúsculo vespertino e à noite (BRASIL, 2016).

Algumas espécies do gênero *Culex* são vetores ornitofílicos, aptos à transmissão viral, por se infectarem através do repasto sanguíneo de aves amplificadoras (COSTA et al., 2020), sendo que *Culex pipiens* e *Culex tarsalis* estão entre as principais espécies envolvidas no ciclo de transmissão da doença nos Estados

Unidos, por conseguirem permanecer em atividade à baixas temperaturas, mantendo a transmissão viral mesmo no inverno (BRASIL, 2019).

O *Culex quinquefasciatus* e o *Aedes albopictus*, encontram – se amplamente distribuídos, apontados como potenciais vetores e importante fator de risco para a transmissão do vNO no Brasil, pois a infecção produz níveis de viremia altos o suficiente para transmitir o vírus, pela prática da antropofilia e ornitofilia durante o repasto sanguíneo (BRASIL, 2005a), pela escassez de dados e registros no país referentes à infecção de outros vetores, e por dados abundantes da transmissão do vírus da FNO por estes culicídeos em países das Américas, nos quais a doença tem ocorrido e tem sido documentada (BRASIL, 2011; CASTRO-JORGE et al., 2019).

#### 1.11.2 Competência Vetorial dos Culicídeos

Após o repasto sanguíneo realizado por um mosquito em hospedeiro infectado com o VNO, o vírus deve ser capaz de superar as barreiras de infecção e fuga do intestino médio do vetor, barreira de infecção e fuga da glândula salivar. A capacidade de superar essas barreiras determina a competência vetorial do mosquito que pode variar ao longo do tempo e depende de fatores ambientais e genéticos, bem como de sua interação (CIOTA e KRAMER; 2013).

A intensidade da transmissão do VNO é determinada pela quantidade de mosquitos competentes e pela prevalência de infecção, medida como a taxa mínima de infecção (MIR), não havendo um valor definido para determinar uma epidemia de FNO, sendo 0,3 %, a MIR para todos os vetores do gênero *Culex* na epidemia de Nova York em 1999 (KOMAR et al., 2003). De acordo com HAYES et al. (2005b), o *Culex quinquefasciatus* e o *Culex nigripalpus*, impulsionam a transmissão do VNO na natureza de forma geral.

Estudos realizados com *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex tarsalis*, demonstraram a transmissão vertical do VNO nas fêmeas destas espécies aos seus ovos, além disso, o vírus foi isolado de mosquitos fêmeas em hibernação, indicando a permanência de partículas virais infectantes no vetor durante o inverno e re-emergência sazonal do vírus e do ciclo de transmissão nos períodos mais quentes, como a primavera, mecanismo conhecido como “Overwintering” (HAYES et al., 2005b; PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA; 2008). A transmissão transovariana do vírus foi demonstrada ainda no *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes aegypti* e *Ae.*

*albopictus*, embora em baixas taxas, além de transmissão experimental bem sucedida nas espécies *Culiseta longiareolata*, *Culex bitaeniorhynchus*, e *Aedes albopictus*; tal característica poderia colaborar com a manutenção do vírus na natureza, tal qual ocorreu no surto de Nova York, tornando – o enzoótico, o que nem sempre ocorre (Hurbult, 1956 apud HUBALÉK e HALOUZKA, 1999; PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

Estudos experimentais demonstraram que 74 a 100% de *Culex tarsalis* foram infectados com o VNO após realizarem repasto sanguíneo em amostras de sangue com concentrações virais de  $10^7$  UFP/ml, em oposição ao percentual de 0 a 36% de mosquitos infectados após repasto com sangue contendo  $10^{4.9}$  UFP/ml (GODDARD et al., 2002).

De acordo com estudo realizado na Califórnia por GODDARD et al. (2002), o *Culex quinquefasciatus* apresenta competência vetorial em laboratório e na natureza, podendo infectar humanos e cavalos com o VNO após repasto sanguíneo em aves por suas características ornito e antropofílicas (GODDARD et al., 2002). Este fato, associado às características de transmissão observadas na América do Norte, e somado às condições ambientais e climáticas e à ampla dispersão do vetor em todo o Brasil, validam o *Culex quinquefasciatus* como potencial vetor da FNO no país e reforçam a necessidade de atenção dada à este culicídeo (BRASIL, 2011).

O *Culex quinquefasciatus* foi descrito por Say em 1823, (anteriormente conhecido como *C. fatigans* e *C. pipiens*); é um mosquito pertencente à ordem *Diptera*, família *Culicidae* com desenvolvimento completo em quatro estágios: ovo, larva em quatro estados, pupa e adulto.

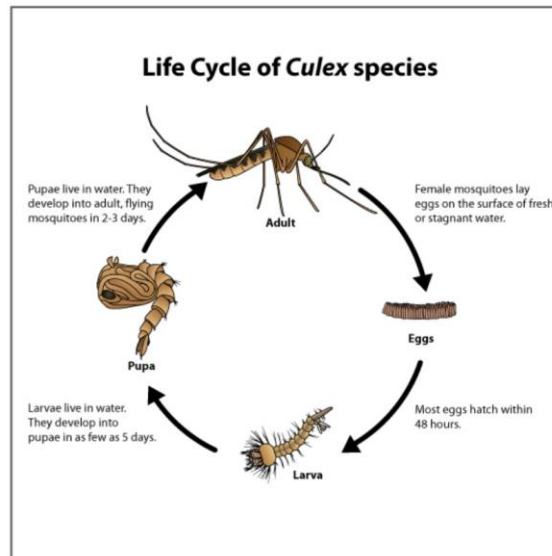
O ciclo reprodutivo completo do ovo à forma adulta do *Culex* ocorre entre 7 a 10 dias. A fêmea adulta apresenta sobrevida média de dois meses; faz o repasto sanguíneo em aves, mamíferos e no homem, para a nutrição dos ovos; após alguns dias da hematofagia, procura fontes d'água para oviposição, depositando os ovos em águas paradas, poluídas, em forma de jangada, que flutuam sobre a superfície. Quando está inativa, permanece em abrigos peridomiciliares e dentro dos domicílios, em locais úmidos e escuros (valas, cochos, piscinas, poças, córregos), em margens de córregos e rios, onde há vegetação marginal (BRASIL, 2011).

As larvas não utilizam oxigênio da água, pois respiram o ar atmosférico da superfície e portanto, águas poluídas não são um fator limitante para a reprodução da espécie. Eclodem dos ovos e permanecem na água, são muito ativas, se



alimentam de matéria orgânica. A pupa vive na água, não possuem partes bucais externas e não se alimenta durante esta fase (BRASIL, 2011).

Figura 7: Ciclo reprodutivo do *Culex spp.*



Fonte: Adaptado de CDC, 2022

Figura 8: Quatro estágios do ciclo de vida do *Culex spp.* (Ovo, Larva, Pupa, Adulto)



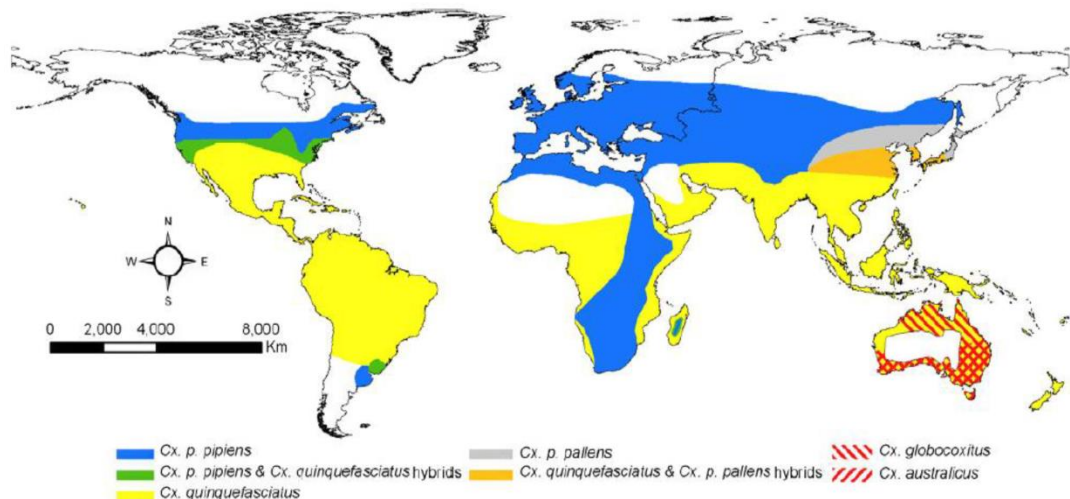
Fonte: Adaptado de CDC, 2023

O *Culex quinquefasciatus* está adaptado ao convívio com o homem, especialmente em ambientes urbanos deteriorados, provocando incômodo à população que vive próxima aos criadouros, através de picadas, podendo causar

dermatites alérgicas, transmissão das Filariose, e das encefalites entre as quais a Encefalite de Saint Louis e potencialmente o VNO (BRASIL, 2011).

Além do *Culex quinquefasciatus*, atenção deve ser dada ao mosquito *Ochlerotatus scapularis* que apresenta hábitos antropofílicos, mas realiza repasto sanguíneo também em equinos (Forattini et al., 1989 apud NATAL E UENO, 2004); e ao *Aedes albopictus* que apresenta ampla dispersão no território nacional e abundância no período de chuvas, apresentando competência vetorial para a transmissão de diversos arbovirus, entre eles a Febre Amarela e o VNO, atuando como vetor-ponte na natureza (NATAL e UENO, 2004; DIBO et al., 2011).

Figura 9: Dispersão mundial do gênero *Culex*



Fonte: Adaptado de CIOTA; KRAMER, 2013

### 1.11.3 Outros Vetores

Artrópodes hematófagos como carrapatos (moles e duros) podem ser infectados pelo VNO, mas apresentam baixa competência vetorial na transmissão do vírus. Estudos experimentais demonstraram que carrapatos moles *Argas arboreus* foram capazes de transmitir o VNO para galinhas e *Ornithodoros savignyi*, *O. maritimus*, *O. erraticus* e *O. moubata* infectaram camundongos com o vírus. Em relação aos carrapatos duros, *Ixodes scapularis*, *I. ricinus*, *Dermacentor variabilis* e *D. andersoni*, foram infectados experimentalmente com o VNO, mas não apresentaram competência vetorial para transmissão viral em picadas subsequentes (LAWRIE et al., 2004). Ocasionalmente, foram relatados isolamentos de vírus do

*Rhipicephalus sanguineus*, *R. rossicus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leachii* (Hurlbut, 1956 apud HUBÁLEK e HALOUZKA, 1999).

## 1.12 RESISTÊNCIA E SENSIBILIDADE DO VNO AO AMBIENTE, AGENTES QUÍMICOS E FÍSICOS

Os flavivírus apresentam em sua composição 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidratos e 17% de lipídios. Sua densidade é de 1,19 a 1,23 g / mL em gradiente de cloreto de cério e o coeficiente de sedimentação está entre 170 e 210S. São constituídos por um envelope lipoprotéico, e por esta razão flavivírus como o VNO são sensíveis aos solventes orgânicos, desinfetantes comuns e detergentes iônicos e não iônicos. Também são sensíveis aos raios ultravioleta e por isto não resistem muito tempo no ambiente, e ainda, são sensíveis à digestão proteolítica (BURKE e MONATH, 2001). Hipoclorito de sódio a 1% é utilizado para inativação de falvírus para materiais de pequeno porte e a autoclavação para carcaças de animais e materiais de maior volume (CTBIO, 2005).

O VNO acomete o SNC e provoca sinais clínicos neurológicos inespecíficos em mamíferos, podendo ser confundido com o vírus da Raiva quando do diagnóstico estritamente presuntivo. Por isto, em casos de contato direto com animais e carcaças de mamíferos apresentando síndrome neurológica, sem diagnóstico laboratorial e que foram à óbito ou eutanasiados para pesquisa de agente viral, a desinfecção química de instrumentais cirúrgicos, vestuários ou do ambiente onde foi realizada a necropsia, deverá ser executada com a utilização de produtos à base de hipoclorito a 2%, formol a 10%, glutaraldeído a 1-2%, ácido sulfúrico a 2%, fenol, ácido clorídrico a 5%, e creolina a 1%, entre outros.

Para a desinfecção de ambientes, as soluções de formalina entre 0,25% e 0,90% e de bicarbonato de sódio a 1% e 2% são indicadas para inativação do vírus rábico de forma rápida e eficiente, cuja perda da infecciosidade ocorre à temperatura de 80°C em 2 minutos e à luz solar, em 14 dias, a 30°C, pois o vírus da raiva, com transmissão direta, é pouco resistente aos agentes químicos (éter, clorofórmio, sais minerais, ácidos e álcalis fortes), aos agentes físicos (calor, luz ultravioleta) e às condições ambientais, como dessecação, luminosidade e temperatura excessiva (BRASIL, 2009).

### 1.13 INFECÇÃO INICIAL E AMPLIFICAÇÃO VIRAL

Durante o repasto, os mosquitos fêmeas sondam a pele em busca de sangue e se alimentam diretamente dos vasos ou do sangue extravasado, injetando saliva com partículas virais de até  $10^6$  UFP/ml no hospedeiro por picada (STYER et al., 2007). Além dos fatores virais que bloqueiam a resposta imune, a saliva do vetor contém moléculas que neutralizam a hemostasia, reduzem a inflamação e alteram a imunidade do hospedeiro, desregulando as respostas imunes locais, tais como alterações nos níveis de citocinas, levando à imunossupressão local e redução do recrutamento de neutrófilos, células dendríticas e células T para o sítio primário de infecção (SUTHAR et al., 2013). Após a infecção subcutânea ocorre a replicação do VNO em queratinócitos nas células dendríticas dérmicas (DCs) residentes na pele e nas células de Langerhans, dando continuidade ao ciclo de disseminação viral.

O processo inflamatório que leva à doença clínica é decorrente da capacidade do VNO de transposição da barreira hematoencefálica (BHE) e infecção do Sistema Nervoso Central (SNC) por via axonal. O vírus se replica em neurônios, astrócitos e microglia, fazendo com que mediadores imunes sejam liberados por essas células, o que culmina no aumento da permeabilidade da BHE, meningite, danos às células do SNC e, encefalite (HAYES et al., 2005b; MAXIMOVA et al., 2016).

### 1.14 A DOENÇA FEBRE DO NILO OCIDENTAL

Uma ampla variedade de vertebrados podem ser infectados pelo VNO e desenvolver doença, sendo as aves as de maior importância, especialmente as selvagens, pela alta e longa viremia que permite a transmissão do vírus para mosquitos vetores e as migrações de primavera que contribuem para a introdução do VNO em áreas até então não afetadas (VAN DER MEULEN, K. M. et al., 2006).

Embora uma vasta gama de mamíferos como esquilos, morcegos, felídeos, bovinos, ovinos, primatas não humanos e répteis possam ser infectados pelo VNO, apenas uma pequena parcela manifestará sinais clínicos neurológicos e adoecerá (CASTRO-JORGE et al., 2019), sendo que os bovinos, ovinos, suínos e cães, são considerados hospedeiros pouco eficientes pelos motivos descritos acima, o que

desencoraja seu uso como modelos experimentais para estudos genéticos de suscetibilidade e resistência ao vírus da FNO (BRASIL, 2019).

Já foram observados sinais clínicos em alpacas, uma foca, renas, primatas não humanos, veados, um urso polar, lobos e esquilos. Ao exame histopatológico esses animais apresentaram meningoencefalite na massa cinzenta do tronco encefálico e da medula espinhal, sendo que esquilos apresentam também miocardite, quadro similar ao descrito em aves (BYAS e EBEL, 2020).

Mamíferos domésticos também podem ser acometidos como ovinos e cães que apresentam convulsões, ataxia e achados *post mortem* de meningoencefalite e miocardite no caso dos canídeos; porém, cães não são considerados amplificadores virais (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008; BYAS e EBEL, 2020). Felinos domésticos experimentalmente infectados por via oral e parenteral apresentaram picos virêmicos suficientes para infectarem artrópodes em hematofagia, ainda que com baixa eficiência (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

Os jacarés podem desempenhar um papel ainda não elucidado na ecologia do VNO, como reservatórios, em áreas de alta densidade populacional destes répteis, considerando-se o perfil virêmico e as diversas formas de infecção da espécie, discutidas em tópico específico de sentinelas (KLENK et al., 2004).

Os sinais clínicos em jacarés, sobretudo em jovens, são neurológicos, incluindo natação desequilibrada, ataxia, tremores e inclinação da cabeça, e gastrointestinais com anorexia e aumento de volume abdominal, ocorrendo esporadicamente, lesões cutâneas proliferativas de 1 a 2 mm, conhecidas como “pix”, três semanas após as infecções. Os achados histopatológicos incluem necrose e inflamação de múltiplos órgãos (BYAS et al., 2022).

#### 1.14.1 A Doença nas Aves

O VNO foi detectado em mais de 150 espécies de aves selvagens e domésticas em todo o mundo. A suscetibilidade das aves à infecção pelo VNO tem influência genética, de acordo com a Ordem acometida, sendo que os Passeriformes são as mais suscetíveis com níveis mais altos de viremia e excreção viral em quantidade nos fluidos orais e nas fezes, com apresentação de sinais neurológicos graves e altas taxas de mortalidade, assim como a Ordem Charadriiformes e

Anseriformes (gansos domésticos) (KOMAR et al., 2003; AUSTIN et al., 2004; VAN DER MEULEN, K. M. et al., 2006).

Ainda, entre os Passeriformes, a família *Corvidae* contém o corvo americano (*Corvus brachyrhynchus*) e o gaio-azul (*Cyanocitta cristata*), que também têm demonstrado alta suscetibilidade à infecção e à doença pelo VNO (PHALEN et al., 2004); aves como psitacídeos apresentam baixa suscetibilidade e em geral são assintomáticos à doença (PHALEN et al., 2004).

Galliformes como galinhas e perús, podem apresentar infecção inaparente ou apresentarem sinais clínicos inespecíficos como depressão, letargia, penas eretas, anorexia, perda de peso rápida e sinais neurológicos como ataxia, paralisia, tremores, movimentos de pedalar, andar em círculos, torcicolo, nistagmo, convulsões, opistótono e morte (CASTRO-JORGE et al., 2019). Galináceos são pouco suscetíveis, apresentam baixa viremia com sinais clínicos leves ou indetectáveis e raros óbitos. Além da genética, a suscetibilidade pode estar associada à fatores como mutações e variantes genéticas distintas, que apresentam maior ou menor patogenicidade, e ainda a idade, visto que de acordo com estudo em galinhas, pintinhos infectados, de 1 a 11 dias, desenvolveram carga virêmica alta em comparação à aves com 3 semanas, com baixa viremia.

Estudo desenvolvido por AUSTIN et al. (2004), analisou um surto de FNO em gansos domésticos no Canadá, que revelou que aves de 6 semanas foram mais severamente afetadas com mortalidade de 25%, em oposição aos gansos compreendidos na faixa etária entre 1 e 5 anos, que demonstraram somente soroconversão sem doença clínica, fato observado também em surto ocorrido em Israel com esta espécie (VAN DER MEULEN, K. M. et al., 2006).

A transmissão do VNO pode ser indireta vetorial (ciclo aves, mosquitos e hospedeiros terminais), e direta não vetorial, por excreções e secreções (oral e cloacal) entre aves, através de órgãos e tecidos infectados através da alimentação de aves carniceiras ou entre mamíferos, envolvendo também répteis como crocodilos. A transmissão vertical, de mosquitos fêmeas adultas para sua progênie, também é descrita. A circulação e transmissão viral por mecanismos não vetoriais, inclui também a transmissão para seres humanos por exposição percutânea (acidentes em laboratório, realização de necropsias), transmissão transplacentária, consumo de leite materno, transfusão de sangue e transplante de órgãos (BYAS e EBEL, 2020).

Os sinais clínicos da FNO em aves variam de uma morte súbita, a sinais inespecíficos, com distúrbio neurológico progressivo; em geral, a duração da doença é de 24 horas a 5 dias (KOMAR et al., 2003); aves submetidas a tratamento clínico suporte, podem sobreviver com sintomas por várias semanas (PHALEN et al., 2004; VAN DER MEULEN, K. M. et al., 2006).

Os sinais clínicos neurológicos incluem ataxia, tremores, andar em círculos, paralisia, cambalhotas, torcicolo, opistótono, incoordenação e convulsões (PHALEN et al., 2004; VAN DER MEULEN, K. M. et al., 2006; WOA, 2022, CASTRO-JORGE et al., 2019). Também podem ser observados sinais não neurológicos, como depressão, letargia, penas eriçadas, perda de peso e doença ocular, incluindo anisocoria.

Os achados da necropsia incluem hemorragia intraóssea e das meninges, congestão e hemorragia cerebral, do trato gastrointestinal, miocardite e necrose miocárdica (PHALEN et al., 2004). Regiões frequentemente afetadas do sistema nervoso incluem o tronco cerebral, medula espinhal, cerebelo e tálamo, com apresentação de meningoencefalite linfoplasmocitária, manguitos perivasculares, gliose, necrose neuronal e hemorragia (BYAS e EBEL, 2020). O tropismo renal é importante no quadro clínico de VNO em aves assim como em humanos; verificou-se que embora seja considerado primariamente um vírus neurotrópico, o VNO persiste nos rins das aves após infecção natural e experimental, o que pode implicar na patogênese da doença, e facilitar os esforços de detecção precoce de circulação viral, sendo que o grau de acometimento das aves pelo tropismo renal necessita de mais estudos para ser totalmente elucidado (BYAS e EBEL, 2020).

A infecção pelo VNO deve ser considerada em aves que apresentem sinais neurológicos durante os meses quentes do ano. A maioria das aves morre rapidamente antes da instituição de terapia de suporte com antiinflamatórios, e antivirais, que são em geral, infrutíferas (PHALEN et al., 2004). Como medidas profiláticas devem ser instituídas telagem de galpões e galinheiros, recolhimento das aves antes do crepúsculo, evitar o alojamento de aves próximo à coleções d'água e a utilização de vacinas, se disponíveis, tópicos que serão discutidos adiante, em seções específicas.

Devido à sua suscetibilidade à infecção, mas resistência à doença, as galinhas são usadas como sentinelas para monitorar a atividade do VNO (PHALEN et al., 2004).

### 1.14.2 A Doença nos Equinos

A infecção pelo VNO foi confirmada em 3991 cavalos em 41 estados dos Estados Unidos somente no ano de 2003, durante a epidemia de FNO naquele país (PHALEN e DAHLHAUSEN, 2004).

Várias raças e uma ampla distribuição etária têm sido observadas em equinos que apresentam a FNO; no entanto, a taxa de letalidade tem sido maior em animais mais velhos. O período de incubação do vírus em equinos varia entre 3 a 15 dias, com desenvolvimento de rápida viremia e baixa carga viral, quando os sinais clínicos neurológicos podem se manifestar em 10 a 20% dos infectados, sendo que a maioria, contudo, é assintomática. No caso de infecção clínica, 30% a 50% dos doentes não vacinados vão à óbito, por morte natural ou eutanásia, podendo haver recuperação com sequelas residuais como perda de peso, letargia, ataxia ou déficits de nervos cranianos em 10 a 20% dos sobreviventes (ANGENVOORT et al., 2013; WOA, 2022, CASTRO-JORGE, 2019; BYAS e EBEL, 2020).

A recuperação dos equinos com doença leve varia de dois a sete dias e é superior a 20 dias a vários meses para retorno à condição original, de animais que apresentem casos mais graves (ANGENVOORT et al., 2013).

Estudos demonstram que a neuroinvasão do VNO pode ocorrer através dos neurônios olfativos em decorrência da escassez de antígeno detectado em células endoteliais, quando da realização de necropsia e estudos histopatológicos (ANGENVOORT et al., 2013).

Os sinais clínicos de infecção pelo VNO incluem, além de febre, prostração, sonolência, cólica, debilidade, fraqueza, sudorese, claudicação, ataxia de membros, hiperestesia, tetraparesia, andar em círculos, déficits de nervos cranianos, fasciculações musculares, ranger de dentes, espasmos no focinho, paralisia facial e lingual, disfagia, opistótonos, decúbito lateral com pedalagem, convulsões e morte (VAN DER MEULEN, K. M. et al., 2006; WOA, 2022; CASTRO-JORGE, 2019; BYAS e EBEL, 2020).

As manifestações clínicas são insuficientes para confirmar o diagnóstico da FNO, uma vez que os sinais clínicos não nervosos da infecção sintomática são inespecíficos e similares aos de outras infecções por flavivírus; os sinais neurológicos por sua vez, também são similares para diversas doenças, devendo –



se então, proceder ao diagnóstico diferencial em quadros de síndrome neurológica, para Raiva, Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Mieloencefalite protozoária por *Sarcocystis neurona*, Herpesvírus equinos tipo 1 e intoxicações (BRASIL, 2009; COSTA et al., 2020).

Como não existem sinais clínicos patognomônicos de FNO em equinos a demonstração de anticorpos IgM pelo método ELISA é recomendada. O método RT-PCR funciona bem, mas como as infecções pelo VNO em cavalos coincidem apenas com uma fase virêmica curta, entre 1 e 4 dias, que desaparece com a ocorrência da doença clínica (BUNNING et al., 2002), somente os resultados positivos apresentam significado para o diagnóstico. Portanto, o diagnóstico de FNO em equinos é mais frequentemente alcançado pela demonstração de IgM antiviral durante os sinais clínicos ou pela demonstração de antígenos virais ou RNA no tecido nervoso coletado no *post-mortem* (ANGENVOORT et al., 2013). Os testes ELISA são geralmente utilizados para a demonstração de anticorpos específicos contra o VNO (IgM e IgG) e a presença de um alto nível de anticorpos IgM indica sorologicamente uma infecção recente (CASTILLO-OLIVARES e WOOD, 2004).

A presença de anticorpos IgG é detectada em equinos vacinados, como consequência de uma infecção subclínica anterior pelo VNO e ainda como resposta de reação cruzada com vários flavivírus. Para a detecção de anticorpos anti-VNO específicos, os soros devem ser executados em testes de neutralização comparativos com os vírus relevantes (ANGENVOORT et al., 2013).

As alterações histopatológicas em equinos incluem o acometimento da medula espinhal (semelhante à dos humanos), polioencefalomielite, manguitos perivasculares, nódulos gliais e neuronofagia, tanto no mesencéfalo quanto no rombencéfalo. Além destas alterações, pode ocorrer hemorragia renal, atrofia linfóide e miocardite (BYAS e EBEL, 2020).

O tratamento disponível para FNO em equinos é a terapia de suporte que inclui fluidoterapia contra a desidratação, uso de anti-inflamatórios e meios de minimizar/evitar a excitação dos animais (tampões de ouvido para reduzir estímulos acústicos, redução de luz), bem como acolchoamento do estábulo e extremidades. O uso de administração parenteral de anticorpos antivírus NO, licenciada nos EUA pode ser realizada, embora estudos de eficácia ainda sejam escassos (Kutzler et al., 2008; apud ANGENVOORT et al., 2013). Tratamento com antivirais (ribavirina e

interferon) pode ser substituído, porém sem comprovação de eficácia (ROBINSON e SPRAYBERRY, 2009).

Os equinos são altamente suscetíveis ao VNO, em similaridade ao ser humano, podendo desenvolver quadros de encefalite com o mesmo nível de gravidade e ir à óbito. O período de incubação varia entre 3 e 15 dias, com rápida viremia e baixa carga viral, quando os sinais clínicos de encefalite ou encefalomielite podem se manifestar em 10 a 40 % dos animais infectados, sendo que 80% dos acometidos apresentam infecção subclínica e manifestações brandas como febre transitória. Contudo, 40% dos animais doentes podem apresentar doença neuroinvasiva grave (BUNNING et al., 2002; HAYES et al., 2005b; STEJSKALOVA et al., 2019) com recuperação após 7 dias do início dos sinais clínicos ou evolução para óbito (BUNNING et al., 2002; WOA, 2022).

Os sintomas incluem febre, febre baixa, prostração, sonolência, cólica e sinais neurológicos tais como hiperestesia, espasmos de focinho, paralisia facial e lingual, debilidade, claudicação, ataxia, fasciculação muscular, ranger de dentes, andar em círculos, disfagia, incoordenação, tremores, fraqueza, contrações musculares, paralisia de membros, paralisia de nervos cranianos, sudorese, decúbito lateral, movimentos de pedalagem, opistótonos e convulsões (BUNNING et al., 2002; WARD et al., 2006; WOA, 2022; CASTRO-JORGE et al., 2019).

Surtos de FNO no Marrocos em 1996, Itália em 1998 e na França em 2000 acometeram somente equinos, não sendo observados casos de encefalite em aves e humanos. As cepas isoladas do surto de Israel de 1997 a 2000 e da epidemia na América do Norte a partir de 1999, no entanto, demonstraram - se patogênicas para as três espécies, repetindo-se a partir de então até os dias atuais.

### 1.14.3 A Doença em Humanos

A FNO é uma antropozoonose, doença transmitida dos animais ao homem; porém, a infecção pelo VNO em humanos é em geral subclínica, pois apenas 20% dos pacientes infectados desenvolvem sintomas após um período de incubação que varia de 3 a 15 dias. A maioria dos casos sintomáticos em humanos infectados apresenta uma doença febril aguda chamada Febre do Nilo Ocidental, caracterizada por um início abrupto de um quadro gripal inespecífico: febre alta com calafrios, astenia, cefaléia, dor retro-orbitária, artralgia, mal-estar, perda de apetite, fadiga,

náusea, vômito; podendo ocorrer linfadenopatia e erupção cutânea maculopapular nas mãos, pés e tronco (ZENAID et al., 2004; CASTRO-JORGE et al., 2019; BYAS e EBEL, 2020).

A FNO geralmente é uma doença leve com duração de apenas alguns dias, mas que pode persistir por semanas até um ano, causando doença debilitante, em aproximadamente 40% dos pacientes, que apresentam fadiga, dores musculares, cefaléia, distúrbios do movimento e dificuldades de memória e concentração (CASTRO-JORGE et al., 2019; BYAS e EBEL, 2020). A Doença Neuroinvasiva do Nilo Ocidental (DNNO) ocorre em menos de 1% das pessoas infectadas, com um período prodrômico febril de um a sete dias, que pode ser bifásico antes da manifestação no sistema nervoso central, e se manifesta através de meningite, encefalite e poliomielite. O processo inflamatório ocorre nas meninges do cérebro e da medula espinhal. (ZENAID et al., 2004; BYAS e EBEL, 2020).

Os sinais clínicos incluem tremores, ataxia cerebelar e parkinsonismo geral, podendo também ocorrer infecção das células dos neurônios motores inferiores e da medula espinhal, resultando em uma paralisia flácida aguda semelhante à Poliomielite, que causa tetraplegia e comprometimento respiratório (mielite) em casos graves. De forma mais rara, pode ser observada a síndrome de Guillain-Barré em associação com a infecção pelo VNO (CASTRO-JORGE et al., 2019; BYAS e EBEL, 2020). Uveíte e vasculite oclusiva ocular podem ocorrer (ZENAID et al., 2004).

Contudo a FNO não apresenta necessariamente um mau prognóstico, pois alguns pacientes com encefalopatia grave inicial e coma associado podem apresentar boa recuperação e sequelas mínimas. Estima-se que uma a cada mil infecções em humanos relaciona-se à encefalite fatal. Os pacientes hospitalizados apresentam uma taxa de mortalidade de 4% a 14%, sendo maior em imunossuprimidos, idosos, comatosos e submetidos à tratamento imunossupressor concomitante (ZENAID et al., 2004; CASTRO-JORGE et al., 2019). O prognóstico da doença é favorável em jovens, e reservado à mau, com infecção do parênquima cerebral, em adultos e idosos imunocomprometidos, com 50% dos pacientes hospitalizados apresentando sequelas neurológicas e 1/3 destes, recuperação neurológica completa (ZENAID et al., 2004).

A doença ocorre devido à capacidade do VNO de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e infectar o SNC por meio de disseminação por transporte

axonal, replicação em neurônios, astrócitos e microglia e liberação de mediadores imunes por essas células, resultando em aumento da permeabilidade da BHE, inflamação das meninges, danos às células do SNC e, conseqüentemente, doenças do SNC, como já descrito em tópico anterior (SUTHAR et al., 2013).

Os achados histológicos na Doença Neuroinvasiva do Nilo Ocidental são caracterizados por infiltrados linfocíticos perivasculares, nódulos microgliais, perda neuronal, neuronofagia, e necrose em casos graves. As regiões mais afetadas do SNC são o tronco encefálico (medula e ponte), núcleos profundos de substância cinzenta (gânglios da base e tálamo) e cerebelo. Na medula espinhal, os cornos anteriores (cornos ventrais) e as raízes nervosas espinhais estão envolvidas (BYAS e EBEL, 2020).

A infecção pelo VNO em humanos pode ser diagnosticada através da detecção de anticorpos IgM contra o vírus pelo ensaio imunoenzimático ELISA em soro ou LCR, coletado 5 ou 8 dias após o início dos sintomas, indicando infecção recente, (embora possa ocorrer reação cruzada) com validação por ensaio de neutralização, considerado o teste padrão-ouro (CASTRO-JORGE et al, 2019). A infecção pode ser confirmada pela detecção do antígeno viral através do teste RT-PCR e isolamento viral em tecidos ou ensaios imuno-histoquímicos de amostras de tecido cerebral para detectar antígenos em tecidos fixos no *post mortem* (CASTRO-JORGE et al., 2019). Na maioria dos casos não se consegue isolar o vírus no soro ou LCR, pois a viremia é baixa e pode ocorrer uma rápida depuração viral (ZENAID et al., 2004), sendo este tópico discutido em detalhes em capítulo posterior desta revisão.

A transmissão do VNO em humanos ocorre pela picada pelo mosquito culicídeo, e também por transfusão de sangue, transplante de órgãos aleitamento materno e transmissão transplacentária. (ZENAIDE et al., 2004; WOA, 2022; BRASIL, 2023). A infecção de pessoas sem comorbidades pelo VNO é geralmente subclínica ou em 20% dos casos, acompanhada por sinais clínicos leves, após um período de incubação que varia de 3 a 15 dias, caracterizada em geral como uma doença aguda autolimitante, semelhante à gripe, cujos sinais clínicos incluem hipo ou hipertermia, cefaléia, fadiga, mialgia, fotofobia, tremores, fraqueza e confusão (MOSTASHARI et al., 2001; KAISER e BARRETT, 2019).

Contudo, há ocorrência de meningoencefalite em menos de 1% dos infectados, síndrome semelhante à poliomielite ou paralisia flácida aguda, que pode ser fatal, sendo mais frequente em idosos e imunocomprometidos (FLORES e WEIBLEN,

2009; CASTRO-JORGE 2019, KAISER e BARRETT, 2019). De acordo com KAISER E BARRETT (2019), aproximadamente 10% dos casos de FNO serão fatais. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2023) foram relatados 26.683 casos de doença não neuroinvasiva pelo vNO e 25.849 casos de doença neuroinvasiva pelo VNO, resultando em 2.456 mortes no período compreendido entre 1999 e 2020. A partir de 2005, quando o vNO se tornou endêmico, foi relatada média de 409 casos/ano nos 3.108 condados dos Estados Unidos.

A maioria das infecções humanas ocorre pela transmissão natural através da picada de mosquitos infectados. Porém, a transmissão do vírus da FNO também pode ocorrer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, aleitamento materno e por manipulação inadequada de amostras de vírus em laboratório. Atualmente, não existem vacinas para imunoprofilaxia humana (WOAH, 2022; BRASIL, 2019).

### 1.15 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da FNO em aves e equinos pode ser feito através da detecção de anticorpos anti-VNO, da identificação do agente e isolamento do vírus. A sorologia pode ser feita pelos testes de Elisa em amostras de soro ou líquido; a identificação do agente por RT-PCR e nested-PCR e a confirmação do diagnóstico pode ser realizada pela detecção do vírus através de técnicas de imunohistoquímica - IHC utilizando amostras de tecido cerebral assim como isolamento do VNO pelo crescimento em culturas celulares suscetíveis (ZENAID et al., 2004). As amostras podem ser tecidos ou fluidos de animais doentes e ou que foram à óbito. A detecção de vírus em animais aparentemente saudáveis é de rendimento baixo; portanto, não deve ser considerada para programas de vigilância de rotina. Em carcaças de aves, mamíferos e répteis, os tropismos teciduais variam bastante. Os seres humanos têm poucos tecidos com partículas virais detectáveis ou RNA viral na necropsia como os equinos; em contrapartida, espécies de aves podem ter infecções com altas cargas virais em quase todos os tecidos (CDC, 2023).

### 1.15.1 Diagnóstico Indireto

O teste ELISA de competição é utilizado para detectar anticorpos anti – vNO em soros de todas as espécies, podendo algumas vezes detectar anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas como IgM e IgG. Usado para fins epidemiológicos e de vigilância, sendo considerado como método de triagem pois apresenta baixa especificidade, apresentando reação cruzada com anticorpos de outros flavivírus, como o Vírus da Encefalite de Saint Louis, Vírus Usutu e Vírus da Encefalite Japonesa. Portanto, uma amostra positiva obtida através deste teste, deverá ser submetida a um teste confirmatório com alta especificidade como Neutralização Viral por Microtitulação ou PRNT. Deve – se atentar para a utilização de vacinas contra FNO em equinos, pois em uma população imunizada, a testagem por ELISA de Competição ou Indireto, poderá apresentar resultado falso-positivo (Beaty et al., 1989 apud WOAAH, 2022; HAYES, 1989).

A Neutralização de Redução em Placa ou Teste de redução específica em placa de anticorpos neutralizantes – PRNT é o teste mais específico entre os testes sorológicos para o VNO, sendo aplicável para qualquer espécie animal, incluindo aves. Anticorpos neutralizantes detectados por este método indicam ocorrência de infecção prévia, em anos anteriores, ou vacinação. Por isto, sua utilização deve considerar o histórico vacinal do animal na interpretação dos resultados (WOAH, 2022).

Considerando-se somente a aplicação dos testes sorológicos ELISA IgG ou PRNT para diagnóstico de FNO, enfatiza - se que a coleta da 1ª amostra deverá ocorrer no início dos sinais clínicos, com coleta pareada de uma 2ª amostra, 14 dias após a 1ª (BRASIL, 2018).

O ELISA detecta anticorpos IgM específicos anti – VNO, em amostras de soro testadas, especialmente de equinos, quando ocorre infecção natural entre 7 a 10 dias até 1 a 2 meses pós-infecção, sendo que grande parte dos cavalos que desenvolvem encefalite pelo VNO, testam positivo a partir do início dos sinais clínicos. O Teste pode ser utilizado para aves ou outras espécies, desde que o anticorpo de captura específico da espécie esteja disponível (por exemplo, IgM anti-aviário) (BRASIL, 2018; WOAAH, 2022).

Resumidamente, os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária para identificação de anticorpos anti-VNO, a serem utilizados

por espécie animal são os testes de ELISA, Neutralização de Redução de Placa – PRNT e Neutralização Viral - VN para aves e o ensaio Imunoenzimático de Captura de IgM - ELISA de captura de IgM, Inibição da Hemaglutinação - HI, ELISA de competição IgG, Neutralização de Redução de Placa – PRNT e Teste de Neutralização Viral – VN para equinos.

A coloração imuno-histoquímica – IHC, de tecidos de aves como cérebro, coração, rim, baço, fígado, intestino e pulmão (fixados em formalina), é uma metodologia confiável para a identificação da infecção pelo VNO em aves positivas para a doença. Já amostras de tecidos cerebral e da medula espinhal de equinos apresentando encefalite viral pelo VNO, coletadas no *post mortem* e submetidas ao teste IHC, apresentam resultados falso-negativos, pois a infecção pelo VNO pode estar presente (WOAH, 2022).

#### 1.15.2 Diagnóstico Direto

Testes moleculares, como o RT-PCR (transcriptase reversa) e o nPCR (nested) são indicados para isolamento e identificação do agente da FNO. Teste rápido com alta sensibilidade que utiliza amostras de soro ou líquido de animais vivos, para a detecção do VNO, através da reação de cadeia de polimerase-transcriptase reversa em tempo real - RT-PCR, com base na detecção de quantidades inferiores a 0,1 Unidades Formadoras de Placa – UFP, empregando a amplificação de ácidos nucléicos baseados em seqüências de nucleotídeos para identificação da cepa em estudo, comparada às cepas de referência do VNO (LANCIOTTI e KERST, 2001; GANDELMAN-MARTON, et al., 2003;).

Segundo SILVA et al. (RECH e BARROS, 2015 apud, 2019), embora testes de PCR e isolamento viral para o VNO sejam desafiadores devido à baixa carga viral no SNC de equinos infectados, no estudo realizado por SILVA et al. (2019), todas as amostras dos equinos suspeitos de FNO, submetidas ao RT-PCR, foram positivas para o RNA do Flavivirus usando um RT-PCR genérico com confirmação de diagnóstico de FNO pelo ensaio de nested-PCR específico para o VNO. As amostras a serem testadas por RT-PCR para aves são constituídas por cérebro, rim, coração, fígado, baço e intestino; o exame é utilizado também para pools de insetos (STEELE et al., 2000; WOA, 2022).

A identificação do VNO nos hospedeiros invertebrados, como mosquitos, pode ser feita, pela técnica molecular de RT-PCR (que é capaz de detectar o RNA viral de um único mosquito infectado presente em um grupo de dezenas de espécies), através de captura e formação de pools de até cinquenta espécies ou menos, com base na espécie, sexo, localização, tipo de armadilha e data de coleta (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008; CDC, 2023).

O isolamento do vNO é realizado através do crescimento em culturas celulares suscetíveis (ZENAIID et al., 2004). como rim de coelho (RK-13), rim de macaco verde africano (células Vero), rim de hamster bebê (BHK-21) ou rim de suínos, além da possibilidade de isolamento primário em ovos embrionados de galinha e em linhagens celulares de *Aedes albopictus*, seguidas por passagens em células de mamíferos com resultado positivo quando se observa o efeito citopático celular (WOAH, 2022); contudo, esta técnica é restrita pois necessita de grande quantidade de amostra de tecido e tempo de isolamento de três a sete dias, dependendo da quantidade de vírus presente (PEALER et al., 2002).

Em equinos com encefalite que vão à obito, o isolamento é feito através da utilização de amostras de tecido cerebral (rombencéfalo) e medula espinhal (OSTLUND et al., 2001). Para aves as amostras são constituídas por cérebro, rim, coração, fígado, baço e intestino (WOAH, 2022).

O isolamento do vírus em cultura de células Vero também pode ser usado para detecção e confirmação de vírus em pools de mosquitos (LANCIOTTI e KERST, 2001), além dos ensaios de detecção de antígenos virais pela técnica ELISA que estão disponíveis em kits comerciais (KOMAR et al., 2003). A vigilância entomológica, embora valiosa, pode apresentar alto custo e dificuldade para detecção viral, pela necessidade de captura de grande quantidade de espécies a serem identificadas e processadas e caso os recursos disponíveis sejam limitados, o teste de mosquitos para fins de vigilância deverá ser limitado às espécies vetoras primárias (CDC, 2023).

## 1.16 EPIDEMIOLOGIA DA FEBRE DO NILO OCIDENTAL

A FNO é uma zoonose que acomete várias espécies de vertebrados, sendo que surtos com manifestações clínicas neurológicas graves são documentados



principalmente em corvídeos, equídeos e o homem e tem as aves migratórias implicadas na disseminação do vNO dos EUA para o México, Caribe e Américas Central e do Sul, desde o final da década de 1990 e pelo mundo em um movimento que acompanha os ciclos de migração periódicos de muitas espécies. Pode ocorrer também, pela importação de aves infectadas e pela introdução de mosquitos infectados, possibilitando a entrada da doença em países considerados como livres até então (LADEAU et al., 2007; FLORES & WEILBLLEN, 2009; BRASIL, 2018)

O padrão de disseminação do vírus dos EUA para o Norte da América do Sul entre 1999 e 2004, em tranpolim, é compatível com a disseminação por pássaros migratórios (LADEAU et al., 2007; FLORES E WEIBLEN, 2009); além disso, estudos soropidemiológicos têm monitorado a infecção nestas aves pelo mundo. Embora poucas espécies de aves norte-americanas migrem para a Argentina, sugere – se a introdução do vírus na América do Sul por aves da ordem **Chadriiforme** - aves costeiras limícolas e andorinhas-do-mar, que apresentam níveis altos e longos de viremia, infecções persistentes ocasionais na pele e realizam migrações de longas distâncias (KOMAR e CLARK, 2006).

Os exatos mecanismos de introdução do VNO nos EUA, em 1999, e sua disseminação ainda não foram totalmente elucidados, mas entre as hipóteses propostas estão: 1) introdução pela importação de aves ornamentais infectadas da África; 2) introdução por aves (gaivotas e marrecos) por meio de rotas migratórias naturais ou acidentais; 3) introdução por mosquitos infectados em navios ou aviões (REED et al., 2003). O papel de aves migratórias na disseminação do VNO ainda é uma incógnita, mas a rápida difusão do vírus nos EUA e, posteriormente, nas Américas, indica uma provável participação das mesmas, visto que a disseminação inicial nos EUA, na direção sul da costa leste coincidiu com a rota migratória de várias espécies de pássaros (REED et al., 2003; LADEAU et al., 2007).

Várias espécies selvagens desenvolvem altos níveis de viremia após a infecção pelo VNO e mantêm níveis virêmicos de pelo menos  $10^5$  UFP/ml de soro (nível mínimo estimado para infectar um mosquito durante a alimentação) por dias a semanas, tornando-se os principais hospedeiros reservatórios em regiões endêmicas e também sendo a fonte do vírus no início de epizootias fora de áreas endêmicas (BRINTON, 2002). Por isto, estas aves podem ser responsáveis pela reintrodução do VNO de áreas endêmicas para regiões que apresentem surtos esporádicos, em um movimento que acompanha os ciclos de migração periódicos de

muitas espécies. Pode ocorrer também, pela importação de aves previamente infectadas (caso do início do surto de Nova York em 1999), e introdução acidental de mosquitos infectados, possibilitando a entrada da doença em países considerados livres até então (FELIPPE, 2016).

As ordens Passeriformes, Charadriiformes e Falconiformes, apresentam espécies de aves suscetíveis à infecção pelo VNO, com papel fundamental no ciclo da doença como reservatórios / amplificadores virais, porquanto o vírus apresenta grande replicação no organismo, previamente ao adoecimento e morte das aves alguns dias após serem infectadas. Entre as aves que ocupam posição de destaque como amplificadores e com maior suscetibilidade à infecção estão o corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*) o gaio-azul (*Cyanocitta cristata*), e o pardal (*Passer domesticus*), que freqüentemente adoecem, sendo a doença fatal (COSTA et al., 2020).

O ganso doméstico (*Anser anser*) também vem sendo considerado espécie de risco e com potencial para o papel de reservatório do vírus, sendo envolvido em surtos com alta mortalidade (entre 20 e 60%) em até 24 horas. Ainda assim, a maioria das espécies de aves são resistentes e não desenvolvem a doença, permanecendo parte delas como reservatórios do vírus da FNO (WOAH, 2022). Galliformes podem se infectar sem apresentarem sinais clínicos sendo utilizadas na vigilância soropidemiológica como sentinelas (COSTA et al., 2020).

#### 1.16.1 Papel das Aves Migratórias na Disseminação do Vírus do Nilo Ocidental

De acordo com SOMENZARI et al. (2018), uma ave é classificada como migratória quando parte da população realiza movimentos cíclicos e sazonais sendo fiel aos seus sítios de reprodução. Das 1.919 espécies listadas para o Brasil 198 atendem à este critério, sendo que 64% são migratórias e 36% parcialmente migratórias, (quando uma parte da população permanece no mesmo local durante todo o ano). Das aves migratórias, 50% se reproduz no país e a demais possuem seus sítios de reprodução em outros países, nidificando na região circumpolar da América do Norte e Groenlândia (aves setentrionais), em áreas no sul da América do Sul e Antártida (meridionais) ou ainda a oeste, na região andina, divididas em visitantes de verão e visitantes de inverno. Por este motivo, o Brasil revela a

presença de espécies migratórias em todas as estações do ano. Na primavera e verão, o país recebe populações do hemisfério norte e quando estas iniciam seu retorno, as espécies austrais iniciam seu deslocamento invernando especialmente nos estados da região Sul e Sudeste (SOMENZARI et al., 2018).

A ampla maioria das aves marinhas migratórias que ocorrem no Brasil são oriundas das regiões Antártica e Subantártica, Patagônia, ilhas e costas do Atlântico Sul, Nova Zelândia e Austrália e uma parcela menor é composta pelas espécies austrais, provenientes da América do Norte, Europa e ilhas da Macronésia, sendo este conhecimento da origem das espécies importante pois a procedência das aves determina a sazonalidade de migrantes no litoral brasileiro e auxilia na composição de desenho amostral para inquéritos epidemiológicos diversos, fases de diagnóstico e monitoramento de doenças (ICMBIO, 2022).

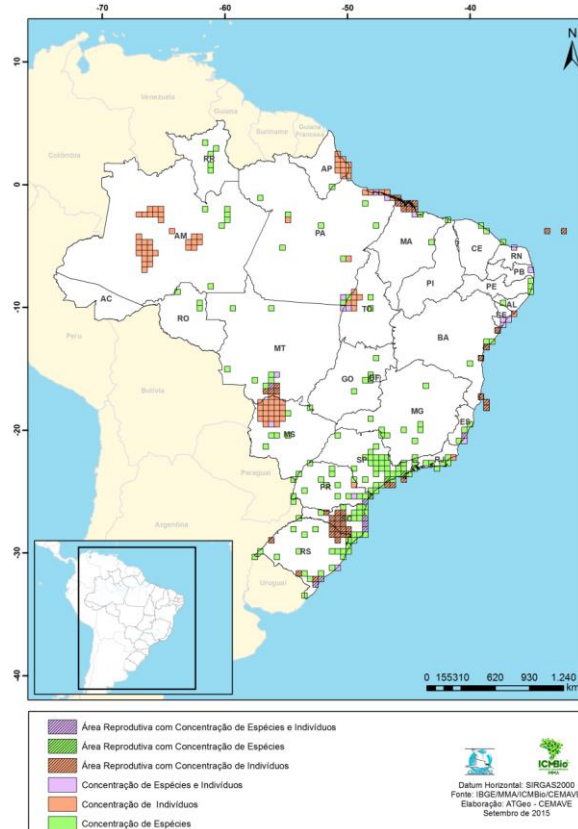
Mais de um terço das famílias de aves brasileiras possuem uma espécie migrante, sendo Tyrannidae, da família de passeriformes, quem possui maior número de espécies migratórias no país. As aves migratórias habitam todos os ecossistemas, campos, lagos, florestas, costas e ambientes marinhos (SOMENZARI et al., 2018).

Entre as principais espécies migrantes neárticas estão algumas da ordem Charadriiformes, aves limícolas (espécies que vivem em substratos lodosos, costeiros, sejam de água doce ou salgada), que ocorrem em rotas migratórias na região costeira, incluindo praias arenosas, planícies de maré, manguezais, estuários e lagoas, de Norte a Sul do país (ICMBIO, 2022). Estas aves compõem uma população distribuída mundialmente, com reprodução no Ártico, que se desloca anualmente, antes do início do outono boreal, para a América do Sul, ingressando no país pelo Oeste e pela fronteira sul, sendo a Rota Atlântica a rota migratória de maior importância. Concentram-se em áreas úmidas e ricas em alimento, no litoral do Rio Grande do Sul, e ao longo de parte dos litorais do Sudeste, Nordeste e Norte, para descanso, mudas de penas, alimentação, e reposição de energia gasta na migração, para se prepararem para o voo de retorno, permanecendo no Brasil de setembro a maio (ICMBIO, 2016; ICMBIO, 2019; ICMBIO 2022).

No entanto, parte das aves limícolas não migra pela costa, mas pelo interior do continente; utilizam a Amazônia brasileira como porta de entrada, seguem os grandes rios, passando pelo Brasil Central seguindo até o sul do país ou até a Terra do Fogo (ICMBio, 2016). Além destas, outros Charadriiformes como espécies de

Trinta-réis (*Sterna hirundo* e *Sterna dougalli*) realizam longas migrações para a costa do Brasil no inverno boreal (ICMBIO, 2019).

Figura 10: Áreas de importância para aves migratórias no Brasil.



Fonte: Adaptado de Relatório ICMBio, 2016

Espécies não migratórias de ocorrência na América do Norte como o corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*), o grackle comum (*Quiscalus quiscula*), o gaião-azul (*Cyanocitta cristata*), o tentilhão doméstico (*Carpodacus mexicanus*) e espécies migratórias da ordem Charadriiforme como a gaivota-de-bico-manchado (*Larus delawarensis*), estão entre as aves com alta susceptibilidade ao VNO, apresentando alta carga viral e taxas de mortalidades significativas (STEELE et al., 2000; KOMAR et al., 2003).

Segundo KOMAR (2003), as aves migratórias de ocorrência no Brasil são hospedeiros eficientes na transmissão do VNO; entre elas destacam - se o francelho-americano (*Falco sparverius*), envolvido no surto de FNO nos EUA, o bufo-orelhudo (*Bubo virginianus*) e o borrelho-de-dupla-coleira (*Charadrius vociferus*), todos com alto índice de competência como reservatório amplificador viral. O pardal doméstico (*Passer domesticus*), embora não seja espécie migratória, também é

hospedeiro altamente competente na transmissão viral, comum no Brasil e em outros países, (KOMAR, 2003).

Segundo dados levantados junto à Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, entre os anos de 2015 e 2020 houve colheita de amostras biológicas de 372 aves silvestres de vida livre localizadas no sítio de aves migratórias denominado de complexo estuarino-lagunar de Iguape - Cananéia - Ilha Comprida, sendo os principais integrantes na amostra: 21% de *Thalasseus maximus*; 16% de *Sternas sp.*; 11% de *Coragyps atratus*; 11% de *Charadrius semipalmatus*; 9% de *Calidris melanotos*; 8% de *Haematopus palliatus*; 8% de *Vanellus chilensis*; 7% de *Larus dominicanus*; 5% de *Egretta thula*, 4% de outras aves. As amostras foram submetidas a análise laboratorial pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, cujos resultados foram negativos para Influenza Aviária, Doença de Newcastle, Laringotraqueíte Infecciosa e Doença do Oeste do Nilo (LAGATTA, 2021).

As aves migratórias são importantes na introdução e reintrodução do VNO em novas áreas periodicamente (WOAH, 2022). A literatura descreve o papel do movimento de aves migratórias infectadas na disseminação do VNO na América do Norte e Caribe, bem como sua participação em surtos na Europa e Israel. Uma vez que o vírus é introduzido em uma área, o mesmo se torna enzoótico com ressurgimento sazonal na Europa e nos Estados Unidos, podendo envolver aves migratórias e vírus invernantes presentes em mosquitos. O vírus invernante sobrevive na população de mosquitos porque fêmeas infectadas podem transmiti-lo aos seus ovos, garantindo a sobrevivência do vírus durante o inverno. Em países do hemisfério norte, é esperado que o pico de mortalidade em aves ocorra do meio do verão ao início do outono e que os casos humanos e em equinos atinjam o pico em algumas semanas após o início da mortalidade das aves. Em contrapartida, nos países tropicais, o ciclo infeccioso pode perdurar o ano inteiro podendo contribuir para a manutenção do vírus com o retorno das aves migratórias para o país de origem na primavera.

Há décadas, existem indícios de que as aves migratórias sejam os principais hospedeiros introdutores do VNO em novas regiões, reforçados pelas seguintes ocorrências: surtos do VNO em regiões temperadas durante o final do verão ou início do outono, coincidindo com a chegada de centenas de aves migratórias e abundância de vetores; surtos em humanos e em equinos ocorrendo entre

indivíduos que vivem em áreas úmidas, onde altas concentrações de pássaros entram em contato com mosquitos ornitofílicos (HUBÁLEK e HALOUZKA, 1999); os principais vetores nos quais foi possível o isolamento viral são mosquitos ornitofílicos; anticorpos anti-VNO continuam sendo encontrados no sangue de muitas espécies de aves migratórias na Eurásia e Américas (RAPPOLE et al., 2000).

Durante o surto de FNO ocorrido em 1999 na cidade de Nova York, 62 casos humanos foram confirmados; destes, 70% ocorreram dentro de um raio de 10 km centrado no bairro do Queens, local no qual ocorreu simultaneamente, uma mortalidade de milhares de pássaros silvestres, principalmente de corvos americanos. (*Corvus brachyrhynchos*) (RAPPOLE et al., 2000). Coincidentemente, no mesmo período, houve alta mortalidade de pássaros da coleção do Zoológico do Bronx (Nova York), (flamingos chilenos, corvos-marinhos, Águias-careca, Pêgas-de-bico-preto, patos, faisões imperiais e corujas nevadas), a 8 km do epicentro da epidemia humana, em decorrência do VNO (STEELE et al., 2000).

A ocorrência justaposta espacial e temporal de infecções aviárias e humanas pelo VNO no surto iniciado em 1999 e nos anos subsequentes, levantou fortes suspeitas da comunidade científica de que as aves agiriam como hospedeiros introdutórios, infectando mosquitos ornitofílicos, que por sua vez infectariam hospedeiros amplificadores e hospedeiros acidentais como os humanos (HUBÁLEK e HALOUZKA, 1999).

O fato dos surtos em humanos terem ocorrido em áreas urbanas próximas as zonas úmidas, onde se concentravam aves migratórias, mosquitos ornitofílicos e pessoas sustentam a teoria de que pássaros de zoológicos, de estimação, domésticos ou selvagens foram os responsáveis pela entrada do vírus no Novo Mundo (América do Norte), sendo as hipóteses propostas as seguintes:

1. Introdução da doença em coleções de zoológicos (Zoo do Bronx no bairro do Bronx e Queens Wildlife Center no bairro do Queens, em Nova York), pela importação legal ou ilegal de aves ornamentais exóticas infectadas da África e / ou a entrada de mosquitos infectados via portos ou aeroportos por Nova York ser uma capital internacional e a emergência do vírus ter ocorrido nas proximidades de um grande aeroporto, sendo esta teoria a mais plausível (REED et al., 2003; PETERSON et al., 2003; PETRY et al., 2006);

2. O vírus poderia também ter chegado primeiro na América Tropical e depois ter sido levado para a América do Norte (PETERSON et al., 2003);
3. Introdução por aves limícolas, gaivotas e marrecos, por meio de rotas migratórias naturais ou acidentais (deslocadas por tempestades); de acordo com PETRY et al. (2006), embora esta hipótese seja aceita, é controversa, pela improbabilidade de ocorrência de uma infecção aguda em aves que realizem migrações de longa distância, especialmente no caso de espécies sem histórico de adaptação ao VNO.

Outros estudos apontam que a rápida difusão do vírus nos EUA e, posteriormente, em todo o continente americano (na direção sul, para o México, América Central e Caribe, e América do Sul), coincidiu com as diversas rotas migratórias que cruzam o território, apontando para uma provável participação das aves migrantes, apoiados por estudos epidemiológicos de monitoramento da infecção nestas aves nas regiões envolvidas (REED et al., 2003; LADEAU et al., 2007); segundo RAPPOLE et al. (2000), várias espécies de aves migrantes que passam por Nova York e se reúnem em bandos nos pântanos, alcançam o sudeste dos Estados Unidos, México e América Central, ilhas do Caribe e América do Sul, durante a migração para o sul para locais de inverno e quase toda a América do Norte durante sua migração para o norte para os locais de reprodução, auxiliando no espalhamento do vírus.

#### 1.16.2 Papel dos Culicídeos (*Culex spp*) na Disseminação do Vírus do Nilo Ocidental

De acordo com o Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus* (BRASIL, 2011), existe a possibilidade de dispersão do vNO para todo o território nacional, em virtude da capacidade vetorial, da proliferação e dispersão do *Culex quinquefasciatus*, considerado um potencial vetor desse arbovírus, (além de espécies dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Ochlerotatus*, *Mansonia* e *Coquillettidia*), associadas ao crescimento desordenado do espaço urbano, falta de infraestrutura, e acúmulo de coleções hídricas estagnadas, com presença de matéria orgânica (esgoto, resíduos),

próximas às moradias, que atuam como criadouros de mosquitos, em áreas urbanas ou rurais, além da presença de pássaros residentes ou migratórios (BRASIL, 2011).

As fêmeas do mosquito *Culex spp.* adquirem o vNO enquanto se alimentam em aves virêmicas infectadas. O vírus se replica nas células epiteliais do intestino médio do mosquito e se espalha através da hemolinfa para as glândulas salivares e outros órgãos (GIRARD et al., 2004), sendo que a barreira existente no intestino médio do vetor é determinante para sua competência vetorial pois atua como uma barreira física e imunológica através da produção de peptídeos antimicrobianos e de uma matriz peritrófica composta de quitina, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos, que juntos limitam a replicação viral e consequente disseminação dentro do inseto (SUTHAR et al., 2013).

O vNO se liga à proteína lectina do tipo C secretada na hemolinfa do vetor, facilitando assim sua entrada e a invasão de diferentes tecidos do mosquito por meio da interação com uma proteína de superfície do mesmo (SUTHAR et al., 2013). A partir da infecção pelo vNO, programas de imunidade específicos de invertebrados são acionados para restringir a infecção, tais como vias de sinalização imune inata mediadas por proteínas Toll, imunodeficiência (IMD), JAK-STAT (transdutor de sinal de Janus quinase e ativador da transcrição) e peptídeos antimicrobianos (ARJONA et al., 2011). Além disso, os mosquitos carregam *Wolbachia spp.*, que são espécies bacterianas simbióticas que inibem a replicação do vNO no inseto porque em resposta à infecção pelo vírus, as bactérias ativam a via Toll e a produção de peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas e cecropinas, que inibem a replicação do flavivírus (GLASER e MEOLA, 2010).

### 1.16.3 Transmissão do Vírus do Nilo Ocidental

A infecção natural já foi demonstrada em mais de 200 espécies de aves silvestres e domésticas em todo o mundo, e em 110 espécies de aves silvestres nos EUA, (KOMAR, 2003; HAYES et al., 2005a; LADEAU et al., 2007), as quais demonstram expressiva variabilidade de susceptibilidade à infecção e potenciais distintos de transmissão (FLORES E WEIBLEN, 2009). As aves silvestres são consideradas os principais reservatórios naturais do vírus da Febre do Nilo Ocidental em decorrência da alta viremia na espécie, com duração de um a quatro dias após a infecção (Felippe, 2016). Dois ciclos de transmissão do vNO são aceitos:



1. Ciclo mantido por mosquitos ornitofílicos que transferem o agente entre aves e infectam outros hospedeiros, sem a participação de hospedeiros terminais como equinos e humanos (NATAL e UENO, 2004);
2. Ciclo mantido por “vetores - ponte” que infectam mamíferos sentinelas como equinos e o homem, a partir do repasto em aves infectadas, pois se alimentam de aves e mamíferos (NATAL e UENO, 2004).

Como exemplo dos diferentes ciclos possíveis, na Europa, foram identificados nos surtos do início dos anos 2000, dois ciclos: o ciclo rural – silvestre, predominante, que envolve vetores ornitofílicos e aves de localidades pantanosas, e o ciclo urbano envolvendo aves sinantrópicas ou domésticas, e “vetores - ponte”, oportunistas com hábitos hematofágicos ornitofílicos e antropofílicos como ocorrido nos surtos em Bucareste (Romênia), em 1996 e 1997 (HUBÁLEK e HALOUZKA, 1999).

O vírus da mantém um ciclo enzoótico de transmissão “mosquito–ave–mosquito”. O mosquito do gênero *Culex* se infecta ao realizar o repasto sanguíneo em aves silvestres previamente infectadas pelo vNO (hospedeiros); a partir da infecção, o vírus se replica no intestino e glândula salivar do mosquito (reservatório natural do vírus), que infecta outras aves silvestres e ocasionalmente aves domésticas (galinhas e gansos) ao inocular saliva durante novo repasto sanguíneo, fechando o ciclo (LONG, 2018).

Embora o vNO utilize hospedeiros aviários e mosquitos do gênero *Culex* para transmissão na natureza, pode haver infecção tangencial em humanos e mamíferos domésticos ou silvestres, hospedeiros terminais (“becos sem saída”) para a disseminação da doença e não participam do ciclo natural de transmissão do vírus, devido aos baixos níveis virêmicos que desenvolvem (KOMAR, 2003; HAYES et al., 2005a; ANGENVOORT et al, 2013).

Aves silvestres de diferentes espécies, servem de reservatórios e amplificadores do agente na natureza, tendo a infecção natural sido demonstrada em mais de 200 espécies silvestres e domésticas em todo o mundo (KOMAR, 2003; HAYES et al., 2005a; VAN DER MEULEN et al., 2005), que apresentam graus diferentes no potencial de transmissão e suscetibilidade à infecção. Os corvos e

gralhas possuem um papel epidemiologicamente importante, pois são muito susceptíveis ao agente, desenvolvem altos níveis de viremia (LADEAU et al., 2007; KOMAR, 2003; KOMAR et al., 2003), apresentam alta morbidade e mortalidade, assumindo também importante papel de sentinelas naturais da infecção (KOMAR, 2003).

Os passeriformes (pássaros canoros, rabos-de-palha e pardais), Charadriiformes (aves limícolas), corujas e falcões também desenvolvem níveis de viremia suficientes para infectar uma grande parcela dos mosquitos que realizam o repasto sangüíneo (KOMAR et al., 2003), em contrapartida, pombos, pica-paus, e aves domésticas como galinhas, gansos, marrecos e patos não desenvolvem altos títulos de vírus no sangue, e por isto, não desenvolvem o papel de reservatórios e amplificadores virais (KOMAR, 2003; KOMAR et al., 2003).

A persistência viral, presença contínua de vírus infeccioso em hospedeiros vertebrados além do estágio virêmico agudo, vem sendo registrada em diversos arbovírus e pode implicar na manutenção e reativação dos ciclos de transmissão do VNO na natureza. Devido à ocorrência de longos períodos de inatividade dos mosquitos em regiões de climas frios e invernos prolongados, há uma interrupção no ciclo de transmissão contínua do vírus pelo vetor; por esta razão a natureza pode desencadear estratégias de hibernação para a manutenção da transmissão viral, que incluem hibernação de mosquitos fêmeas, adultos, infectados, transmissão transovariana de fêmeas para seus descendentes e reintrodução do VNO pela movimentação de vetores infecciosos e migração de hospedeiros amplificadores vertebrados de regiões climáticas mais quentes. Hospedeiros vertebrados persistentemente infectados ainda não foram diretamente ligados a uma estratégia de hibernação para qualquer arbovírus (NEMETH et al., 2009).

A ocorrência da transmissão oral do VNO para hospedeiros reservatórios como aves predatórias pela ingestão de tecidos infectados de outras aves, mamíferos e répteis, seria outro mecanismo de persistência viral em períodos de inatividade do vetor (KOMAR et al, 2003; NEMETH et al., 2009).

Estudo desenvolvido por KOMAR et al. (2003), demonstrou que certas espécies de aves podem ser infectadas oralmente pelo VNO, após a ingestão de animais mortos e mosquitos, infectados naturalmente, tal qual ocorreu em corvos americanos que ingeriram camundongos infectados pelo VNO (cepa 1999 NY), (mas não em galinhas), pois os perfis de virêmicos observados pela infecção oral foram

idênticos aos derivados da infecção transmitida por mosquitos, sem contudo, ser definida a importância deste tipo de infecção em aves, mas que poderá contribuir para a vigilância epidemiológica da mortalidade de aves quando comparada com a vigilância de mosquitos infectados ou outros sistemas de vigilância.

Além da circulação horizontal entre aves e mosquitos, existem relatos da transmissão direta do VNO e sua manutenção na ausência de vetor, através da detecção do material genético – RNA, como demonstrado em estudos de carcaças e fezes em poleiros de corvos infectados, durante o inverno, quando a transmissão vetorial é improvável; provável transmissão direta em águias-carecas alimentadas com carcaças de aves aquáticas infectadas pelo VNO, consideradas a fonte mais provável de infecção (HINTON et al., 2015; BYAS e EBEL, 2020). Estudo experimental com gansos domésticos (*Anser domesticus*) demonstraram a possível transmissão direta não vetorial e infecção pelo VNO desta espécie, através da eliminação do vírus pela cloaca e cavidade oral servindo como as fontes mais prováveis de transmissão viral, sugerindo a transmissão horizontal direta do VNO em criações comerciais, que pode ser potencializada pela ocorrência de canibalismo e deplumagem de gansos doentes (BANET-NOACH et al., 2003). A transmissão direta poderia resultar em infecção crônica garantindo a transmissão do vírus em períodos mais frios, tal qual demonstrado em estudo com pardais domésticos infectados pelo VNO até 43 dias após sua inoculação (BYAS e EBEL, 2020).

A transmissão para humanos e eqüinos depende da abundância e dos padrões de alimentação dos mosquitos e dos padrões ecológicos locais e de exposição destes hospedeiros a insetos hematófagos (HAYES et al., 2005a; FLORES e WEIBLEN, 2009).

#### 1.16.4 Hospedeiros do Vírus do Nilo Ocidental

Embora numerosas espécies possam ser infectadas e experimentar patologia e doença, as aves estão bem estabelecidas como as espécies primárias que desenvolvem os altos títulos virais necessários para infectar mosquitos e contribuir para a perpetuação do vírus (BYAS e EBEL, 2020).

Algumas espécies de aves das Ordens Passeriformes como o corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*), o gaio azul (*Cyanocitta cristata*) e o pardal (*Passer domesticus*), dos Charadriiformes (aves limícolas como a batuíra, maçarico, vira-

pedra, gaivota), Falconiformes (falcão, águia, abutre) e Strigiformes (corujas) são importantes como reservatórios e na amplificação do vírus da FNO por apresentarem alta e extensa viremia; contudo, em alguns passeriformes como o pardal (*Passer domesticus*) a taxa de mortalidade pode chegar até 40%, de acordo com novos estudos sobre o ciclo de transmissão do VNO envolvendo o *Culex pipiens* e esta espécie (HAYES et al, 2005 a; Brasil-MS, 2016; CASTRO-JORGE et al., 2019). Outras aves também podem ser afetadas pelo VNO como os Phoenicopteriformes (flamingo) Struthioniformes (ema, avestruz), Pelecaniformes (pelicano, biguá), Columbiformes (pombo), e Sphenisciformes (pinguim) (WOAH, 2022).

Estudo desenvolvido por KOMAR et al. (2003), expôs 25 espécies de aves à picada do mosquito vetor infectante, para avaliação da dinâmica de transmissão do VNO. Através do monitoramento dos títulos de viremia, da evolução clínica, presença do vírus em secreções oral e cloacal, soroconversão, persistência do vírus nos órgãos e a suscetibilidade à transmissão oral e de contato, concluiu – se que os passeriformes e charadriiformes foram mais competentes como reservatórios do que outras espécies testadas, sendo que dentre os passeriformes destacaram – se o Gaio-azul (*Cyanocitta cristata*), Gralha-comum (*Quiscalus quiscula*), Pintassilgo (*Carpodacus mexicanus*), Corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*) e o Pardal doméstico (*Passer domesticus*).

Os gansos, apresentam alta susceptibilidade ao VNO podendo ser considerados potenciais reservatórios, a partir da observação de surtos ocorridos em Israel entre 1997 e 2000 (mortalidade de 40% especialmente em animais de 3 a 8 semanas), com alta morbidade e mortalidade em criações de gansos domésticos (50-75%) e por estudos experimentais que indicam que estes animais ao serem infectados desenvolvem rápida viremia com duração de até 7 dias, suficiente para resultar na infecção de mosquitos, além de detecção viral na orofaringe três a quatro dias após a infecção (PHALEN e DAHLHAUSEN, 2004).

Modelos animais experimentais têm sido usados para permitir a investigação direta da ecologia do vírus, demonstrando que espécies incluindo coelhos, esquilos, raposas, morcegos, cães, gatos, veados, renas, ovelhas, alpacas, jacarés e focas têm o potencial de infectar mosquitos durante períodos intensos de atividade viral (WOAH, 2022), indicando que existe a possibilidade de contribuições de diversas espécies, além das aves, para a manutenção do VNO no ambiente, sendo que uma

ampla gama de vertebrados pode ser infectada e desenvolver doença clínica, demonstrando que o VNO apresenta um generalismo ecológico único entre os arbovírus, que favorece o aprendizado sobre a patogênese viral em todos os táxons (BYAS e EBEL, 2020).

Mamíferos domésticos demonstraram ser suscetíveis em maior ou menor grau à FNO, sendo ovinos, bovinos, suínos e cães infectados experimentalmente, considerados hospedeiros pouco eficientes, assintomáticos ou com sintomas brandos de infecção, desencorajando o uso como modelos experimentais para estudos genéticos de suscetibilidade e resistência ao vírus da FNO (BRASIL, 2019).

#### 1.16.5 Hospedeiros Acidentais ou Terminais

Equídeos, canídeos, felídeos, bovinos e aves domésticas e humanos são descritos como hospedeiros terminais ou acidentais em função da infecção ocasional por mosquitos oportunistas “ponte” (*Aedes vexans* e *Ochlerotatus spp.*, entre outros), positivos para o vírus da FNO, que realizam repasto tanto em aves como em mamíferos, podendo transmitir o vírus de aves virêmicas para estes mamíferos, e pela pouca duração da replicação viral nessas espécies, que não apresentam grande potencial como fonte de infecção, sendo a doença autolimitada, não havendo disseminação da mesma, encerrando o ciclo de transmissão (FLORES e WEIBLEN, 2009).

Entre 2001 e 2003, surtos de FNO causaram alta mortalidade em jacarés americanos cultivados (*Alligator mississippiensis*) no sudeste dos Estados Unidos, sendo que os surtos permanecem como um problema nos EUA tanto para jacarés como para várias espécies de crocodilos (BYAS et al., 2022). A ocorrência de um surto em uma criação comercial de 10.000 crocodilos americanos, despertou a atenção por levar à óbito 1.250 animais com quadro de encefalite pelo VNO, transmitido provavelmente por carcaças de eqüinos utilizadas para alimentar os animais (FLORES e WEIBLEN, 2009).

Estudo realizado por KLENK et al. (2004), demonstrou que jacarés americanos jovens, são capazes de transmitir o VNO para outros jacarés experimentalmente e podem apresentar competência como hospedeiros para o VNO. Esses animais submetidos ao contato com virions por via enteral e parenteral, além de se infectarem, apresentaram níveis adequados de viremia, de alto título ( $> 10^5$  UFP/ml),

e de longa duração (1 a 8 dias), para a transmissão viral por mosquitos *Culex quinquefasciatus*.

Os surtos frequentes de FNO em jacarés criados em fazendas e de vida livre na Flórida (EUA), resultam provavelmente de uma combinação de fatores: transmissão de mosquitos do gênero *Culex* para jacarés (*Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens* e *Culex tarsalis*), transmissão horizontal entre jacarés através de fluidos orais e cloacais liberados na água, e ingestão de alimentos contaminados com o VNO como carcaças de equinos infectadas (procedentes de propriedades com surtos de FNO). Os jacarés são capazes de amplificação do VNO, subsequente infecção e capacidade de transmissão do *Culex spp.*; os mosquitos infectados, conseguem infectar os jacarés e a água pode servir como fonte de infecção para jacarés, mas não como intermediadora para a transmissão entre aves e jacarés (BYAS et al., 2022).

BYAS et al. (2022) demonstraram que os jacarés americanos são capazes de servir como hospedeiro amplificador para o VNO e que os surtos de FNO nos Estados Unidos com envolvimento destes animais, provavelmente continuarão a ocorrer, pois tanto as fazendas quanto os pântanos naturais são bons criadouros de mosquitos e habitat para vários hospedeiros aviários amplificadores, que infectam os mosquitos vetores.

A discussão obre o papel dos jacarés como amplificadores ou sentinelas permanece aberta visto que apesar de evidências, os surtos com estes répteis ocorreram em regiões específicas dos EUA, endêmicas para a FNO, não tendo sido observadas ocorrências similares em regiões com características favoráveis como o Pantanal brasileiro, porquanto o país apresentou até o momento, casos esporádicos em animais e seres humanos.

### 1.17 TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA

Não existe tratamento para a Febre do Nilo Ocidental, apenas terapia de suporte (fluidoterapia, antiinflamatórios), e os sinais clínicos podem regredir, havendo sequelas neurológicas ou progressão até o óbito (BRASIL, 2018). A profilaxia da FNO deve concentrar os esforços contra picadas de mosquito com a redução de atividades ao ar livre durante períodos de tempo crepusculares e o uso

de repelentes de inseticidas, além de baias teladas para os animais (BRASIL, 2011; CDC, 2023).

O tratamento, em humanos, é constituído por terapia de suporte com fluidoterapia, antiinflamatórios, e imunoglobulina intravenosa específica para o VNO de doadores agrupados se o tratamento for iniciado antes ou logo após o início da doença. Não existem vacinas aprovadas ou tratamentos antivirais específicos disponíveis para uso humano (CASTRO-JORGE et al., 2019).

A profilaxia da FNO deve concentrar os esforços contra picadas de mosquito deve-se basear em telagem de portas e janelas; mosquiteiros sobre a cama, vestimentas apropriadas (mangas e calças longas em cores claras); correntes de ar que dificultam o voo dos mosquitos (ventiladores e ar condicionado) (CDC, 2023); uso de repelentes em seres humanos e animais, evitar instalação das criações e construção de residências próximas às coleções d'água, com acúmulo de matéria orgânica (BRASIL, 2011).

Até o momento, não há nenhuma vacina comercialmente disponível aprovada para uso em humanos. Atualmente, quatro vacinas veterinárias estão licenciadas para imunoprofilaxia em equídeos na América do Norte e em alguns países da Europa, requerendo doses primárias múltiplas e reforços anuais, e seis vacinas para humanos estão na fase de ensaios clínicos, cujas características desejáveis devem incluir alta imunogenicidade com apenas uma dose única e sem reforços anuais, também no EUA (KAISER e BARRETT, 2019), não havendo vacina para imunização de qualquer espécie animal ou de humanos autorizada no Brasil (FELIPPE, 2016).

Quatro vacinas veterinárias anti-VNO para equinos estão disponíveis comercialmente. Três vacinas são confeccionadas com vírus inativados por formalina: WN Innovator™ (a 1ª licenciada para uso veterinário nos EUA em 2002) que confere imunidade protetora a 94% dos cavalos vacinados, Vetera™ WNV (Boehringer Ingelheim) e Prestige® WNV, sendo a principal desvantagem destes imunizantes, a necessidade de uma dose de reforço a cada seis meses para atingir e manter uma resposta imune adequada, após a administração de duas doses iniciais com intervalo entre 4 a 6 semanas (KAISER e BARRET, 2019; HABARUGIRA et al., 2020).

A vacinação eficaz em hospedeiros suscetíveis deve proteger contra a infecção e reduzir a transmissão viral entre animais e de animais para humanos. A busca por uma vacina que se adapte às diferentes espécies e que pode ser administrada por

várias vias permanece, de maneira que não há até o momento, uma vacina contra o VNO para aves domésticas como galinhas e gansos e múltiplas espécies (WANG et al., 2016).

Uma vacina contra o VNO deve conferir imunidade robusta de longo prazo, requerer no máximo uma dose de reforço e, caso seja vacina que utilize vírus vivo, não deve haver possibilidade de reversão (KAISER e BARRET, 2019).

Embora todos os flavivírus sejam antigenicamente relacionados, as tentativas de desenvolvimento de uma vacina única de proteção cruzada não foram bem sucedidas. O conceito de neutralização cruzada não está totalmente esclarecido, pois esta forma de imunidade seria restrita aos flavivírus do mesmo sorocomplexo.

No entanto, evidências de proteção cruzada contra o VNO, (em que a exposição prévia a um flavivírus confere imunidade contra outro flavivírus) vêm sendo observadas em populações do Caribe e América Latina, expostas ao vírus da Dengue (DENV), endêmico nestas regiões. Estudos também demonstraram que a vacinação contra o Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) pode conferir proteção contra a infecção secundária por DENV-1 (HABARUGIRA et al., 2020).

## 1.18 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

A vigilância epidemiológica visa demonstrar a ausência de infecção, determinar a presença ou distribuição de uma infecção ou detectar o mais rápido possível a presença de doenças exóticas ou emergentes. A vigilância da saúde animal é uma ferramenta para acompanhar as tendências de infecções, facilitar seu controle, fornecer os dados necessários para a análise de riscos no âmbito dos objetivos de saúde animal ou de saúde pública, justificar medidas sanitárias e fornecer garantias aos parceiros de negócios (WOAH, 2022).

As atividades de vigilância destinadas a subpopulações selecionadas nas quais é mais provável que uma infecção seja introduzida ou encontrada, ou nas quais é mais provável que se espalhe ou produza outras consequências, podem contribuir para a detecção precoce, para demonstrar a ausência de infecção, implementar ações de controle de doenças e estimar a prevalência. No entanto, a coleta de dados epidemiológicos suficientes para demonstrar a ausência de infecção nas populações de animais silvestres, pode ser difícil. Em tais circunstâncias, uma ampla



gama de evidências que apoiam essa avaliação devem ser usadas. Quando uma infecção está presente na vida selvagem, as consequências sobre o estado sanitário de animais domésticos no país ou na área devem ser avaliadas em cada situação (WOAH, 2022).

O planejamento de estratégias de vigilância epidemiológica implica em conhecer quais são as espécies potencialmente vetores e os prováveis ambientes de surgimento de focos da doença (PETRY et al., 2006). De acordo com o Capítulo 1.4. do Código Sanitário dos Animais Terrestres de 2022 (WOAH, 2022), ao projetar, implementar e avaliar um sistema de vigilância, os elementos essenciais devem ser levados em consideração a populações, momento e validade temporal dos dados de vigilância, definições de caso, unidade epidemiológica, conglomerado, testes diagnósticos, metodologias Analíticas, âmbito do sistema de vigilância e ações de acompanhamento.

As observações clínicas de animais no campo são uma fonte importante de dados de vigilância. A sensibilidade e a especificidade das observações clínicas dependem, em grande parte, dos critérios utilizados para definir um caso suspeito. É importante aumentar a conscientização e treinar potenciais observadores, incluindo donos de animais, para aplicar a definição e declarar casos. A análise sistemática dos dados de saúde, incluindo taxa de morbidade e de mortalidade, dados de produção e outros parâmetros, também pode gerar indicadores de mudanças na ocorrência de infecção (WOAH, 2022).

Após a disseminação do VNO na América do Norte, em 2003, e em decorrência de evidências sorológicas de circulação viral entre equinos e aves encontrados nas regiões do Pantanal e da Amazônia brasileira a partir de 2002, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) emitiu um alerta para epidemias de FNO em países sul-americanos, e criou - se o Sistema Nacional de Vigilância do VNO, com base nas recomendações da OPAS e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Desde então, qualquer caso suspeito de FNO humano ou animal deve ser investigado utilizando-se o protocolo estabelecido, que determina colheita e envio de amostras biológicas para diagnóstico laboratorial diferencial de outras arboviroses (VIEIRA et al., 2015).

Com a confirmação da entrada do vírus no Brasil, nos Estados do Piauí, Espírito Santo, São Paulo, Ceará, Minas Gerais, Mato grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná, as regiões litorâneas devem ser consideradas áreas prioritárias de vigilância

epidemiológica para VNO. O sistema de vigilância brasileiro do VNO, baseia - se na identificação e investigação de encefalites de etiologia desconhecida nos seres humanos, vigilância de epizootias em aves silvestres e equídeos e vigilância entomológica e de sentinelas, e monitoramento soroepidemiológico de sentinelas (aves domésticas e equinos) (OMETTO et al., 2013; BRASIL, 2022).

#### 1.18.1 Vigilância para o Vírus do Nilo Ocidental no Brasil

No Brasil, a partir de 2003, foi criado o Sistema Nacional de Vigilância da Febre do Nilo Ocidental, baseado na triagem sorológica de animais e vetores sentinela, conforme recomendações da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), para a investigação de qualquer caso suspeito humano ou animal (COSTA et al., 2020). No ano de 2011, um estudo descreveu a primeira evidência de circulação viral do VNO, através da detecção de anticorpos neutralizantes específicos em equinos sem sinais clínicos, no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011).

Em dezembro de 2014, a OMS confirmou o primeiro caso humano de FNO no Estado do Piauí, região Nordeste do Brasil em decorrência de apresentação de todos os critérios de confirmação do CDC para FNO, incluindo a detecção de anticorpos neutralizantes contra o vírus em uma amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR) de um paciente com paralisia flácida (VIEIRA et al., 2015; MARTINS et al., 2019). O relato de doença neurológica associada à infecção pelo VNO e o 1º isolamento do VNO no Brasil a partir de uma amostra de Sistema Nervoso Central de um equino do município de São Mateus, Estado do Espírito Santo, foram executados por MARTINS et al. (2019).

Em 2017 uma paciente idosa, no município de Piripiri, também no Piauí, foi à óbito em decorrência da FNO e um 3º caso foi relatado no município de Picos, com recuperação (SAÚDE, 2019). Em 2018, foram registradas epizootias de equídeos com meningoencefalite e evolução para óbito no norte do Espírito Santo, cuja etiologia pelo vírus do Nilo Ocidental, foi confirmada por diagnóstico laboratorial pela detecção de fragmento viral (PCR) (BRASIL, 2018a) e o 1º isolamento viral em um equino eutanasiado com sintomas neurológicos, no município de São Mateus / ES (MARTINS et al., 2019). A Secretaria de Estado da Saúde do Piauí (SAÚDE, 2019) confirmou em outubro de 2019 o quarto caso de Febre do Nilo Ocidental em uma

paciente em Teresina, no Piauí, que recuperou - se da doença, com sequelas. (SAÚDE, 2019).

Um estudo de 2020, utilizando três equinos com doença neurológica ou oftálmica, (suspeitos de infecção pelo VNO) originários dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Piauí, enviou amostras sanguíneas (glóbulos vermelhos) para diagnóstico molecular no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), cujos resultados apresentaram evidências genéticas da circulação do VNO nos três estados, através de técnicas de RT-PCR e nested PCR, além da identificação dos genomas brasileiros dentro da linhagem 1a e máxima verossimilhança com uma cepa de VNO isolada de um *Aedes albopictus* em Washington DC, no Estados Unidos em 2019 (COSTA et al., 2021).

Em julho de 2019, em decorrência de notificações de mortalidade em equídeos em vários municípios do estado do Ceará, que apresentavam sinais clínicos neurológicos, foram realizadas investigações epidemiológicas pelos servidores da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (SESA, 2019), com posterior colheita de amostras de tecido nervoso dos equídeos que vieram a óbito nos municípios de Caucaia, São Gonçalo do Amarante, Canindé, Abaiara, Boa Viagem, Irauçuba e Limoeiro do Norte/CE. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) de Pedro Leopoldo/MG, para diagnóstico diferencial, (visto que as amostras foram testadas previamente para Raiva, com resultados negativos) com diagnóstico positivo para Febre do Nilo Ocidental (FNO) em um equino do município de Boa Viagem/CE. O caso foi comunicado ao Ministério da Saúde, que liderou uma força-tarefa envolvendo diversas instituições públicas em níveis nacional, estadual e municipal, coordenada pela equipe de vigilância de arboviroses, para realização de vigilâncias epidemiológica e entomológica de arboviroses (SESA, 2019).

Em setembro de 2021, um caso suspeito em muar procedente do município de Porecatú/PR, foi diagnosticado como positivo pelo método RT-qPCR para FNO em líquido, em amostra processada no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) /MG/MAPA, conforme nota divulgada pela Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), em 02/09/2021 (ADAPAR, 2021).

Em 2022, foi descrito o 1º caso de FNO na Santa Casa de Caridade do município de Montes Claros/MG, em paciente do sexo feminino, 78 anos, com

síndrome febril e quadro neurológico, que relatou a presença de ave morta no quintal de sua residência. Como parte da investigação, foi realizado rastreio de arboviroses no líquido, confirmando-se o diagnóstico de Febre do Nilo Ocidental por PCR (MEIRELES et al., 2022).

De acordo com o panorama apresentado, torna – se preocupante a possibilidade de o VNO se estabelecer no Brasil. Considerando que a maioria dos pacientes é assintomática e os sintomas da FNO são inespecíficos, pode ocorrer subnotificação do número de casos da doença e surtos podem ocorrer em áreas consideradas livres de circulação do vírus. Neste contexto, a vigilância está inserida como importante ferramenta para a comprovação da ausência de circulação viral do VNO em aves domésticas de produção, para a identificação de animais infectados / presença do vNO circulante e para a certificação para comércio internacional de animais vivos e produtos. Além disso, através da vigilância é possível realizar o monitoramento da ocorrência de infecção em aves silvestres migratórias, para a implantação de ações de mitigação de risco e prevenção da introdução do vNO em animais domésticos e no contexto de saúde pública, visto se tratar de doença zoonótica, transmitida dos animais para o ser humano (BRASIL, 2022).

As informações de vigilância em países nos quais a FNO tornou – se endêmica como nos Estados Unidos, e com ocorrência de surtos periódicos como México e Caribe, devem ser acompanhadas de perto, pois indicam o momento de intensificação das ações de vigilância no Brasil (PETRY et al., 2006).

### 1.18.2 Vigilância em Animais Sentinelas

Sentinelas são organismos usados para determinar de forma mensurável riscos ou perigos ambientais, à saúde de mesmas espécies, de outras espécies com requisitos ecológicos semelhantes e para o homem, servindo, assim, como sinais de alerta precoce de perigo iminente. Exemplos de espécies sentinelas incluem animais de laboratório, domésticos e silvestres. Os animais sentinelas ideais são aqueles uniformemente suscetíveis a infecção por um agente infeccioso, com alta resistência à doença, que apresentam respostas imunes detectáveis, com baixo riscos a saúde de manipuladores, que não contribuem para os ciclos de transmissão de patógenos locais, e que são capazes de detectar a patogenia antes do início de surtos de doenças na comunidade local (CISS, 2022).

Requisitos que definem um animal sentinela: ter uma relação próxima e mensurável com o objeto de estudo; cobrir a maior superfície possível da área de interesse; ser fácil de capturar e seguir; apresentar populações abundantes e saudáveis. Na América Latina, desde a década de 60, vêm sendo desenvolvidas experiências localizadas da estratégia de acompanhamento de problemas de saúde pública mediante a seleção e delimitação de espaços, denominados "áreas sentinelas", diferenciados entre si de modo a representar as características de uma determinada situação, visando a coleta de informações com sensibilidade para monitorar um certo universo de fenômenos, particularmente de saúde. Neste sentido, as criações de aves de fundo de quintal localizadas nos sítios de aves migratórias são consideradas epidemiologicamente de "área sentinela".

Estas unidades podem oferecer a oportunidade de orientar a vigilância com base no risco de introdução ou de reemergência, na probabilidade de ocorrência de infecção, no custo de sua utilização em outras limitações práticas. É uma atividade que envolve a identificação (aves de fundo de quintal) e aplicação regular do teste (ELISA) em um ou mais animais para o conhecimento do estado de saúde ou de imunidade em certa área geográfica específica, neste caso, o entorno das unidades dos compartimentos avícolas, a fim de identificar a ocorrência de uma infecção (IA ou DNC). As unidades sentinelas podem auxiliar na demonstração da ausência ou da distribuição espacial de doenças ou infecções (WOAH, 2022).

O sistema de vigilância sentinela pioneiro para encefalites e outras síndromes neurológicas foi implementado no Estado do Piauí, em 2013, com o diagnóstico do primeiro paciente humano com infecção pelo VNO em 2014, e outro em 2019 neste mesmo estado (CASTRO-JORGE et al., 2019) e um caso em Minas Gerais em 2021 (MEIRELES et al., 2022). A identificação e isolamento do VNO no SNC de equinos ocorreu somente em 2018 no Estado do Espírito Santo (SILVA et al., 2019; MARTINS et al., 2019). A disseminação da doença foi confirmada com novos eventos reportados em 2019, em equinos com encefalite em São Paulo (SILVA et al., 2021) e um equino no Ceará em 2021 (CHALHOUB et al., 2021). Ainda um muar no Paraná, dois equinos no Estado de São Paulo e um no Estado de Minas Gerais em 2021, indicam a necessidade de ampliar o estudo epidemiológico e diagnóstico do vírus no país (SILVA et al., 2021; COSTA et al., 2021)

Galinhas e perus são refratários à doença, sendo considerados hospedeiros terminais, utilizados como sentinelas por não terem competência para a replicação

viral eficiente (PHALEN e DAHLHAUSEN, 2004; PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008). As galinhas e perus (Ordem Galliformes) podem se infectar naturalmente pelo VNO, permanecendo assintomáticas, sem manifestações clínicas ou mortalidade, auxiliando na detecção do vírus pela soroconversão de anticorpos anti-VNO em ensaios sorológicos, destacando – se as galinhas como sentinelas na vigilância do Vírus Kunjin e do VNO na Austrália, em Bucareste, na Cidade de Nova York/NY e no Condado de Suffolk/NY em surtos ocorridos entre 1999 e 2001 (LANGEVIN et al., 2001; TOLSÁ et al., 2018)

Em um experimento realizado por LANGEVIN et al. (2001), três galinhas infectadas com mosquitos foram amostradas duas vezes por semana, após a primeira semana de infecção para monitorar o padrão de resposta de anticorpos em 28 dias pós-infecção (dpi). O anticorpo neutralizante foi detectado em uma das três aves logo em 7 dpi (título = 10) e em todas as três em 10 dpi (títulos = 40, 40 e 80). Os títulos aumentaram de forma constante ao longo deste período, atingindo 320, 80 e 160, respectivamente, em 28 dpi.

Com relação ao equinos, embora apresentem em geral, infecção assintomática pelo VNO, sendo que apenas um pequeno percentual (10%) apresenta sinais clínicos neurológicos (CASTILLO-OLIVARES e WOOD 2004; ANGENVOORT et al., 2013), são considerados sentinelas na vigilância epidemiológica do VNO por auxiliarem na detecção precoce da circulação viral, visto que em geral, os casos clínicos nesta espécie antecedem a ocorrência de casos da FNO em humanos (PETROVIĆ et al., 2018).

Os equinos são considerados bons sentinelas para vigilância do VNO pela fácil identificação dos animais infectados e doentes, pois entre 10 e 20% dos infectados apresentam sinais clínicos da doença, pela simplicidade da metodologia de coleta de amostras nestes animais à campo, expressividade dos rebanhos, proximidade e estreita convivência com o ser humano para trabalho, esporte e lazer, pela docilidade e facilidade de manejo (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

Os equídeos, especialmente os cavalos, têm sido descritos na literatura como excelentes sentinelas para a vigilância de FNO no mundo todo, inclusive no Brasil. pois os casos de FNO em animais precedem os casos humanos, com exemplos na Europa e América do Norte que demonstram que a vigilância de cavalos, jegues, mulas e burros é mais fácil e mais barata do que a vigilância de aves. O estado de

saúde desses animais é monitorado de perto pelos tratadores, de forma que sinais clínicos de doença são rapidamente relatados para médicos veterinários, e estes podem acionar os órgãos públicos responsáveis para investigar a situação (CISS, 2022).

Estudo de infecção experimental com equinos expostos à picadas de mosquitos infectados com o VNO demonstraram que os animais apresentaram viremia sérica baixa, com nível máximo de  $10^4$  UFP/ml de soro ou menos, que durou de 1 a 4 dias, (BUNNING et al., 2002; ANGENVOORT et al., 2013), e que apenas um cavalo de 12 infectados apresentou sinais clínicos da doença com títulos virais relativamente altos nos tecidos,  $10^4-10^{6.8}$  UFP/tecido (BUNNING et al., 2002). Outros estudos de competência vetorial confirmaram a inabilidade dos equinos infectados de se tornarem reservatórios e amplificadores do VNO, uma vez que além da concentração virêmica muito baixa apresentada (já descrita), o pequeno volume de sangue ingerido por um vetor (aproximadamente um microlitro), tornaria improvável a exposição do epitélio intestinal do mesmo à unidades infecciosas de vírus. (TURELL et al., 2008). Estas características, aliadas ao expressivo rebanho equino no Brasil, o 4º maior do mundo (ALMEIDA e SILVA, 2010), torna o equino bom modelo de sentinela para a FNO em áreas de risco, assumindo importante papel nos sistemas de vigilância da doença, sobretudo para humanos, mesmo consideradas as limitações, como intervalo de geração, manejo reprodutivo da espécie (STEJSKALOVA et al., 2019) e a vacinação ostensiva da população equídea em regiões aonde a mesma está autorizada (ALBAYRAK et al., 2021).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar uma revisão de literatura sobre a Febre do Nilo Ocidental, no Brasil e no mundo e avaliação da circulação viral em aves sentinelas de fundo de quintal localizados no sítio de aves migratórias denominado como Complexo Estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape, Estado de São Paulo.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Realizar uma revisão de literatura sobre a Febre do Nilo Ocidental, no Brasil e no mundo, considerando a importância da doença como zoonose, em saúde pública, na sanidade animal pelo acometimento de rebanhos avícolas (domésticas e silvestres), impactos econômicos e no meio ambiente, pelo acometimento de espécies silvestres nativas e ou exóticas de aves e mamíferos, potencial de ocorrência e magnitude de surtos no Brasil, prevenção à ocorrência e controle de focos da doença, detecção precoce de circulação viral para prevenção da doença em seres humanos, importância de ações integradas entre os órgãos oficiais de saúde, agricultura e meio ambiente, balisadas pelo conceito “One Health”.
- b. Realizar vigilância epidemiológica, com pesquisa de circulação viral, pela prova de RT-PCR, em aves sentinelas de fundo de quintal localizados no sítio de aves migratórias denominado como Complexo estuarino–lagunar de Ilha Comprida e Iguape, Estado de São Paulo.
- c. Descrever o 1º caso de FNO em um equino em propriedade localizada no município de São Paulo/SP, no ano de 2019.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão sistematizada da literatura sobre a Febre do Nilo Ocidental e inquérito sorológico para FNO em aves e equinos, que inclui alguns elementos do processo de revisão sistemática, sendo, no entanto, mais curta (GRANT e BOOTH, 2009). Foram pesquisados artigos gerais sobre o tema com seleção dos mais completos e recentes para uma abordagem geral.

Quanto a colheita de amostras, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária promoveu a realização de Vigilância Ativa (VA) para IA e DNC, em áreas de interesse epidemiológico no Estado de São Paulo, definidas de acordo com o Plano de Prevenção à Influenza Aviária em Aves Silvestres e de Subsistência com colheita



de amostras de sangue de aves de subsistência (galinhas), em propriedades localizadas no complexo estuarino – lagunar de Ilha Comprida e Iguape (cadastradas no sistema GEDAVE/CDA), no período compreendido entre 28/06 e 01/07/2021, sendo parte das amostras doadas à este estudo.

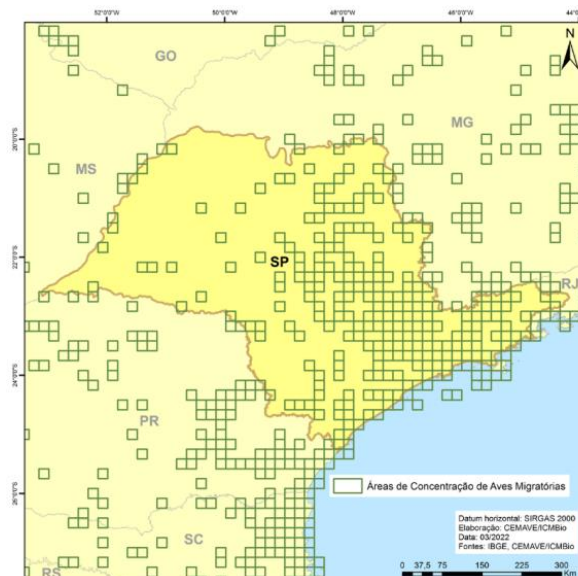
### 3.2 COMITE DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

As colheitas e a análise das amostras, utilizadas neste estudo, foram realizadas em conformidade com as diretrizes de proteção animal e aprovação legal pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP) sob o nº 1918/2023.

### 3.3 DELIMITAÇÃO DA PESQUISA

Selecionou-se o sítio de aves migratórias denominado como Complexo estuarino–lagunar de Iguape e Ilha Comprida, localizado no Estado de São Paulo, área com potencial de circulação viral e presença de vetores competentes para transmissão do VNO como *Culex quinquefasciatus* e *Aedes spp*, com condições favoráveis à sua reprodução, dadas as características climáticas, de umidade e temperatura, além de existência de coleções d'água, aves limícolas (reservatórios) e espécies domésticas residentes como galinhas e equinos, sentinelas para a Febre do Nilo Ocidental.

Figura 11: Áreas Importantes para Aves Migratórias (áreas regulares de rota, pouso, descanso, alimentação e reprodução) no estado de São Paulo



Fonte: Relatório anual ICMBio, 2022

### 3.4 LEVANTAMENTO DE DADOS

Realizou - se a busca de evidências com inclusão de artigos científicos nas bases de dados PUBMED, WEB OF SCIENCE (WoS), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Google Scholar, também foram consultados livros-texto, teses de mestrado, resumos de congressos, sites oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA, do Ministério da Saúde, Organização Mundial de Saúde Animal – OMSA (WOAH), e Centers for Disease Control and Prevention – CDC (USA), de janeiro de 1999 a março de 2023, nos idiomas inglês, português e espanhol. As seguintes combinações de descritores foram usadas com base em artigos relacionados ao tema e revisões sistemáticas: West Nile Fever, West Nile Virus, Febre do Nilo Ocidental, vírus do Nilo Ocidental, inquérito sorológico WNV em aves, galinhas, equinos; vacinação Febre do Nilo Ocidental; FNO em humanos; vetores arbovírus, revisão WNV; aves migratórias aquáticas; zoonoses (CANELAS et al., 2016).

Todos os títulos e resumos pesquisados foram lidos e os textos selecionados foram lidos integralmente para correta compreensão e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos artigos finais a serem utilizados. Como critérios de inclusão foram escolhidos os artigos mais abrangentes e relevantes que

incluíram o histórico da FNO, o vírus do Nilo Ocidental, hospedeiros do vírus, vetores, rotas migratórias de aves silvestres, epidemiologia, virologia, imunopatogenia, sinais clínicos, diagnóstico, tratamento, imunoprofilaxia, controle e prevenção da doença em equinos, aves silvestres e domésticas e seres humanos, artigos em inglês, português e espanhol (MENDES, 2015; CANELAS et al., 2016; CASTILLO-SALGADO e RIBEIRO, 2016).

Os critérios de exclusão estabelecidos foram: pesquisa de outros flavivírus que não fossem o vNO, artigos em outras línguas que não fossem inglês, português ou espanhol, inquéritos sorológicos em seres humanos, estudos da doença em seres humanos, artigos datados anteriormente à 1999.

### 3.5 CÁLCULO AMOSTRAL

Não se sabe o número exato de estabelecimentos que criam aves de fundo de quintal na localidade, e nos municípios de Iguape e Ilha Comprida, respectivamente, existem apenas 11 e 9 propriedades com aves de fundo de quintal regularmente cadastradas na Coordenadoria de Defesa Agropecuária.

Assim, a definição do número de criatórios de galinhas a serem amostradas deve garantir a identificação de pelo menos uma localidade infectada, se a prevalência de explorações infectadas for de pelo menos 5%, com um intervalo de confiança de 95% e sensibilidade de 99%. Para a definição do número de galinhas a serem amostrados em cada propriedade, deve – se considerar a identificação de pelo menos uma ave soropositiva, caso a prevalência de aves soropositivas seja igual ou superior a 30%, com uma probabilidade de 95% (BRASIL, 2012).

Desta forma, foram selecionadas 113 aves de 17 criatórios, sendo 07 em Iguape e 10 em Ilha Comprida, que contemplam respectivamente 76 e 506 aves, totalizando 582 aves de fundo de quintal.

### 3.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

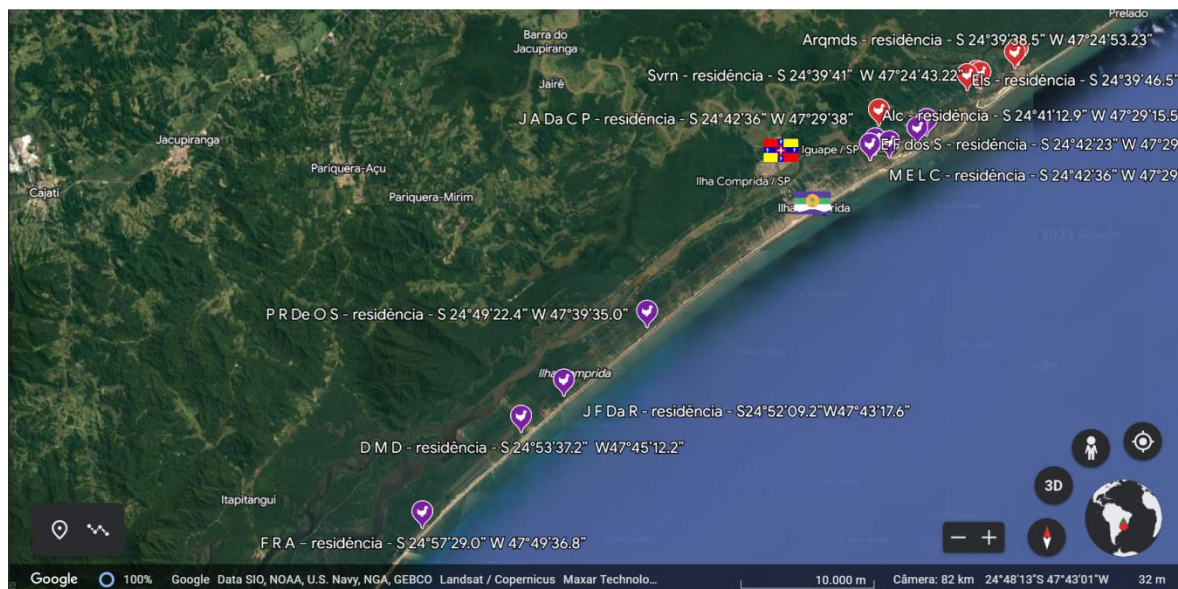
Foi realizada a pesquisa de Vírus do Nilo Ocidental (VNO) por meio da técnica de RT – PCR em tempo real. Adicionalmente, as amostras foram testadas em ensaio de RT-PCR em tempo real “Panflavivírus”, capaz de detectar genoma de

vírus do gênero Flavivírus, o qual inclui além do VNO, os vírus da Encefalite de Saint Louis, vírus da Febre Amarela, vírus Dengue, vírus Zika e vírus Rocio. As amostras de soro foram agrupadas no laboratório em pools, por propriedade, levando em consideração, volume disponível e presença ou não de hemólise. As análises foram executadas pelo Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do Instituto Adolfo Lutz (IAL), laboratório de referência para o diagnóstico das arboviroses, localizado no município de São Paulo/SP. As mesmas amostras, agrupadas em pools, foram encaminhadas para o Instituto Evandro Chagas (IEC) localizado no município de Belém/PA, para a pesquisa de anticorpos para o VNO.

#### **4. RESULTADOS**

Foram colhidas amostras de sangue de galinhas de criações de fundo de quintal, por profissionais do Serviço Veterinário Oficial (SVO) da CDA (Governo do Estado de São Paulo), para Vigilância Ativa de IA e DNC nos municípios de Iguape e Ilha Comprida/SP, obtidas a partir de residências cadastradas no Sistema GEDAVE, localizadas em um raio de 10 km no entorno do sítio migratório do complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape, no período compreendido entre 28/06 e 02/07/2021, com escolha das galinhas por propriedade, de forma aleatória, sendo as amostras excedentes (banco de material estocado), de 113 aves de 17 propriedades (quadro), cedidas ao presente estudo, não sendo realizada atividade exclusiva de colheita para Vigilância de FNO.

Figura 12: Localização das propriedades com criações de aves domésticas de subsistência participantes do estudo em Iguape e Ilha Comprida, Estado de São Paulo, Brasil.



Fonte: ORLANDI S.T, 2023. Adaptado do Google Earth (<https://earth.google.com/web>). Acesso em 01/02/2023.

Legendas:



Residências em Iguape com colheita de amostras de galinhas



Residências em Ilha Comprida com colheita de amostras de galinhas



Município de Ilha Comprida



Município de Iguape

As 113 amostras sanguíneas de galinhas, foram colhidas aleatoriamente, 07 no município de Iguape (41%) e 10 no município de Ilha Comprida (59%), com 3 ml de sangue por ave, por punção venosa da veia ulnar, utilizando agulhas estéreis de calibre 25 x 0,70 mm, acopladas à seringas descartáveis de 3 ml, com formação de pools de rebanho por propriedade amostrada, em um total de 17 pools (quadro). As amostras foram dessoradas nas próprias seringas de coleta em temperatura ambiente, e os soros obtidos foram acondicionados em microtubos para centrifugação tipo Eppendorf, na quantidade de 1 a 2 ml por ave/tubo, que foram identificados em pools por propriedade e congelados à  $-20^{\circ}\text{C}$ , para o transporte até a sede da CDA em Campinas, em caixa isotérmica com gelo reciclável (BRASIL, 2010b) para armazenamento, e posterior encaminhamento ao Núcleo de Doenças de transmissão Vetorial do Instituto Adolfo Lutz - IAL, para pesquisa do VNO e

Panflavivírus pela técnica de RT-PCR (reação em Cadeia de Polimerase) em tempo real, cuja cronologia das ações de vigilância foi a seguinte:

- a. 28/06/2021: chegada das equipes do SVO ao município de Ilha Comprida para preparação das atividades de colheita;
- b. 29/06/2021: acompanhamento de coleta de amostras de sangue de galinhas em dez propriedades de subsistência no município de Ilha Comprida, com georreferenciamento e preenchimento de Formulários de colheita por propriedade;
- c. 30/06/2021: acompanhamento de coleta de amostras de sangue de galinhas em sete propriedades de subsistência no município de Iguape, com georreferenciamento e preenchimento de Formulários de colheita por propriedade;
- d. 30/06/2021: dessoragem e preparo das alíquotas de soros sanguíneos, em amostras individuais em microtubos de 2 ml de soro por ave, identificadas em pools por propriedade amostrada; congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e armazenamento das amostras;
- e. 01/07/2021: retorno das equipes à sede da CDA no município de Campinas e armazenamento das amostras congeladas;
- f. 01/10/2021: envio das amostras ao Laboratório de Virologia do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do Instituto Adolfo Lutz, para realização de pesquisa para o vírus do Nilo Ocidental e Panflavivírus pela técnica molecular diagnóstica de RT – PCR;
- g. 12/11/2021: Envio do Laudo laboratorial do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do IAL/SP, com resultado NEGATIVO ao PCR-RT para o VNO e Panflavivírus, em todas as amostras testadas.

Quadro 1.: Resultados de PCR-RT de amostras de soro sanguíneo de galinhas de subsistência de Ilha Comprida e Iguape para VNO e Panflavivírus

MUNICÍPIO	CRITÉRIO	ID DA AMOSTRA	Nº AMOSTRAS ANALISADAS	RESULTADO RT-PCR VNO/FLAVIVIRUS
Ilha Comprida	E F S	STO 001/2021	11	NEGATIVO

Ilha Comprida	M M O F	STO 002/2021	05	NEGATIVO
Ilha Comprida	J A C P	STO 003/2021	03	NEGATIVO
Ilha Comprida	O J S	STO 004/2021	17	NEGATIVO
Ilha Comprida	G M A	STO 005/2021	10	NEGATIVO
Ilha Comprida	M E L C	STO 006/2021	07	NEGATIVO
Ilha Comprida	J F R	STO 007/2021	04	NEGATIVO
Ilha Comprida	F R A	STO 008/2021	04	NEGATIVO
Ilha Comprida	P R O S	STO 009/2021	08	NEGATIVO
Iguape	C A	STO 010/2021	07	NEGATIVO
Iguape	M A P C	STO 011/2021	10	NEGATIVO
Iguape	R J M A	STO 012/2021	05	NEGATIVO
Iguape	A	STO 013/2021	04	NEGATIVO
Iguape	E	STO 014/2021	05	NEGATIVO
Iguape	ARQ	STO 015/2021	04	NEGATIVO
Iguape	S	STO 016/2021	06	NEGATIVO
Ilha Comprida	D M	STO 017/2021	02	NEGATIVO
<b>Total</b>	<b>2 Mun.</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>112</b>
				<b>17</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados da pesquisa pelo teste PCR em Tempo Real (Rt-PCR) para VNO e Panflavivírus, encaminhados pelo Laboratório de Referência para Arboviroses do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do IAL/SP, foram NEGATIVOS para as 112 amostras de soro analisadas, conforme documento encaminhado em 12/11/2021, em anexo. As mesmas alíquotas de soro foram encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas – Belém/PA - IEC, para realização de PRNT para VNO pelo Laboratório de Arboviroses do IEC; contudo, os resultados das análises não foram encaminhados até a presente data.

De acordo com o laudo diagnóstico emitido pelo IAL/SP, todas as amostras de galinhas de subsistência coletadas e testadas para este estudo (100%, n= 112) apresentaram resultado negativo para o Vírus do Nilo Ocidental bem como para outros Flavivírus, como o vírus da Encefalite de Saint Louis, da Febre Amarela, Dengue, Zika e Rocio, no teste PCR em Tempo Real (Rt-PCR), demonstrando a ausência de circulação viral do VNO nas galinhas residentes no entorno do Sítio Migratório de Ilha Comprida e Iguape em julho de 2021.

## 5. DISCUSSÃO

A ocorrência de surtos de FNO é de difícil previsibilidade, pois depende de fatores ambientais, incluindo clima, precipitação de chuvas, umidade relativa e paisagem ou o desenvolvimento urbano, que podem alterar o ecossistema e impactar na distribuição do mosquito vetor, e nos padrões de migração das aves, facilitando ou dificultando a introdução e disseminação do vírus (KAISER e BARRET, 2019), como no caso do Complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape, escolhido por contemplar um sítio migratório de invernada com ocorrência de diversas espécies de aves migrantes neárticas, entre as quais, aves aquáticas limícolas pertencentes às famílias Charadriidae (batuínas) e Scolopacidae (maçaricos), Ordem Charadriiformes, hospedeiros e reservatórios em potencial do VNO, que poderiam contribuir na introdução e disseminação da FNO no Estado, visto serem originárias das Américas, aonde a detecção viral e a ocorrência de surtos de FNO vêm sendo registrados desde 1999.

As condições ambientais como fortes chuvas seguidas de inundações, irrigação e altas temperaturas, podem causar um aumento nas populações de mosquitos e também na incidência de vírus transmitidos por mosquitos, como o VNO. Em áreas urbanas, as baixas precipitações, que despejariam periodicamente os esgotos, resultam no aumento das populações de mosquitos que se reproduzem em poças de água estagnada, além da atração de pássaros nessas poças escassas, que também auxiliam na transmissão do VNO como foi o caso do surto de 1999 na cidade de Nova York (BRINTON, 2002).

Estudo desenvolvido por LORENZ et al. (2022), criou um modelo preditivo considerando variáveis ambientais que emularam alterações climáticas que poderão afetar a dinâmica de transmissão e distribuição do VNO na América do Sul no futuro, com o uso de dados de evidências da circulação do vírus em pacientes humanos, mosquitos, equídeos e aves em toda a América do Sul durante os últimos 15 anos.

Os resultados concluíram que várias áreas brasileiras poderão aumentar a probabilidade de apresentar VNO, principalmente nas regiões nordeste e centro-oeste, incluindo o bioma Pantanal devido aos aspectos ambientais e ecológicos singulares do Pantanal, como a prevalência da migração de aves da América do Norte, influenciada por ações como o aumento da agricultura e das atividades relacionadas ao desmatamento. Esses problemas poderão alterar o ciclo natural do



VNO, aumentando o risco de infecção. Em oposição, a Cordilheira dos Andes poderá atuar como uma barreira física contra a dispersão do vNO na América do Sul, devido à ausência de rotas de migração de aves nesta área. Concluiu – se que com a expansão da distribuição geográfica do vNO, haverá um aumento no número de epidemias de meningoencefalite pelo vNO nos próximos anos (LORENZ et al., 2022).

O fator de risco mais importante para adquirir a infecção pelo vNO é a exposição a mosquitos infectados, sendo a intensidade da transmissão determinada pela abundância de mosquitos competentes. De acordo com estudos realizados em residências cujos moradores adoeceram com a FNO no surto de Nova York em 1999, concluiu-se que a maior incidência de casos ocorreu em área com maior cobertura vegetal, indicando um habitat favorável ao mosquito gênero *Culex*. Da mesma forma, um surto em Chicago em 2002, revelou que os casos humanos ocorreram em áreas com mais vegetação, moradias mais antigas, predominância de residentes idosos e proximidade com pássaros mortos (HAYES et al., 2005b).

Assim como ocorreu nas epidemias pelos vírus Ilheus (ILHV) e Rocio (ROCV) no Estado de São Paulo durante a década de 70, um maior número de casos de VNO em humanos registrados no mundo, tendem a ocorrer no início da primavera até outono, período considerado de maior emergência de culicídeos adultos, sugerindo que a reemergência sazonal do vírus no ciclo enzoótico de transmissão na primavera (em clima temperado), esteja envolvida com a permanência de partículas virais infectantes nos mosquitos vetores, como o *Culex pipiens*, durante todo o inverno, além da transmissão vertical do vírus nos mesmos (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

O vNO apresenta relevância entre as arboviroses por causar doença zoonótica na população humana e animal. A ocorrência da FNO na América em 1999, ocasionou 24.000 casos de doença neurológica relatados e mais de 2.300 mortes humanas; a incidência em equinos foi de aproximadamente 28.000 casos e mortalidade em mais de 300 espécies de aves, causando redução na população de várias espécies, entre as quais o corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*) que foi reduzido nos EUA a 45% da população inicial nos últimos 20 anos, após a introdução do vírus. O impacto negativo do vírus repercutiu também no Canadá, Europa e América do Sul em países como Colômbia e Argentina (LORENZ et al., 2022).

Para além dos fatores observados, considerando-se o histórico de ocorrência da Febre do Nilo Ocidental em equinos no Espírito Santo, em bovinos no Ceará, de um caso confirmado em equino no município de São Paulo/SP em 2019 e casos humanos com um óbito no estado do Piauí a partir de 2014 (SAÚDE, 2019), justifica-se a execução de um plano estratégico de vigilância para a FNO em aves de subsistência que atuem como sentinelas para a doença, fornecendo um panorama da circulação viral do VNO que anteceda a infecção de seres humanos para o fomento de ações conjuntas interinstitucionais para vigilância e respostas integradas entre saúde humana, animal e meio ambiente sob o conceito de ou One Health.

A FNO pode ocasionar impacto ambiental pela mortalidade de aves, impacto sanitário pelo acometimento de seres humanos e impacto econômico, pela perda de animais de produção, tornando esta zoonose de interesse multissetorial reforçando a aplicação do conceito de One health que estabelece a atuação conjunta para o cuidado humano, animal e do ambiente para garantia de bem estar das populações. Por isto, há a necessidade da revisão e divulgação de mais informações sobre o agente, vetores, manifestações clínicas, abordagem diagnóstica e terapêutica da doença, além da implementação de um sistema de vigilância epidemiológica, para a prevenção da introdução e controle de focos da FNO no Brasil (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2018).

Sendo as aves migratórias, hospedeiros intermediários naturalmente infectados, elas provavelmente carrearão o vírus durante a migração, o qual será transmitido pela picada de um culicídeo infectado, confirmando a importância das aves migratórias na disseminação do VNO entre duas regiões, e conseqüentemente o aumento do risco da circulação viral em áreas nas quais estas aves estejam presentes, em sítios de invernada (para descanso e alimentação) ou para reprodução, em associação à presença abundante de vetores e animais suscetíveis, além do homem (VILIBIC-CAVLEK et al., 2019).

A migração de aves da ordem *Charadriiforme* como a andorinha-do-mar (limícola), que realiza a rota de deslocamento de Nova York nos Estados Unidos para o Caribe e América do Sul, poderia contribuir na introdução e manutenção de ciclos da doença no Brasil, (RAPPOLE et al., 2000; KOMAR e CLARK, 2006) pois estas aves apresentam níveis altos e longos de viremia, com infecções persistentes ocasionais quando o vírus pode ser encontrado nos folículos das penas (KOMAR

e CLARK, 2006), além da movimentação de espécies residentes não migratórias, reservatórios do vírus (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

Algumas ordens de aves residentes ou migratórias, como *Passeriformes*, *Charadriiformes* e *Falconiformes*, são suscetíveis à infecção pelo vNO, e atuam como reservatórios e amplificadores virais porquanto o vírus apresenta grande replicação no organismo da ave antes que esta adoença e morra alguns dias após ser infectada (COSTA et al., 2020). Estudo realizado com várias espécies de aves da América do Norte identificaram o gaio-azul, o grackle comum, o tentilhão doméstico, o corvo americano e o pardal doméstico entre as principais espécies de aves residentes, amplificadoras do VNO, pois são altamente infecciosos para mosquitos e apresentam taxas de mortalidade acima de 40% (MARTÍN-ACEBES e SAIZ, 2012). Estudos de campo durante surtos de FNO nos Estados Unidos em 1999, confirmaram que os pardais domésticos eram abundantes e freqüentemente infectados com o VNO, características que os identificaram como importantes hospedeiros amplificadores (FLORES e WEIBLEN, 2009).

Estudo realizado por MCLEAN et al. (2001) demonstrou que espécies como o corvo americano, quando infectados podem liberar vírus em quantidade nas fezes ou secreções orais possibilitando a transmissão direta ave-ave por via oral-fecal, e até mesmo de ave para seres humanos, demonstrando a importância das aves migratórias na transmissão do VNO entre diferentes regiões. Contudo, a transmissão viral direta entre mamíferos e entre aves e mamíferos, não foi comprovada (FELIPPE, 2016), podendo ocorrer transmissão ainda em aves pela ingestão de mosquitos infectados, camundongos infectados e até mesmo água contaminada experimentalmente.

Por esta razão, corvos e outras aves com hábitos carniceiros que consumam aves e mamíferos mortos, infectados pelo VNO podem se infectar (PHALEN et al., 2004). Um surto de FNO em criação comercial de 10.000 crocodilos americanos, com mortalidade de 1250 animais, após doença clínica de encefalite, provavelmente foi iniciado na criação pelo uso de carcaças de eqüinos infectados com o VNO, para alimentar os crocodilos, demonstrando a suscetibilidade e potencial deste animal para o desenvolvimento de níveis de viremia suficientes para a transmissão por mosquitos (MILLER et al., 2003; FLORES e WEIBLEN, 2009).

Um estudo realizado por PAUVOLID-CORRÊA et al. (2011) em cavalos do Pantanal brasileiro, foi pioneiro no relato de evidência sorológica confirmada da atividade do VNO no país, pela detecção de anticorpos neutralizantes específicos para o vírus em 3% dos animais testados. A partir desta data, alguns estudos desenvolvidos no país relataram evidências sorológicas de VNO de diferentes hospedeiros e regiões indicando a circulação do vírus, porém, o isolamento ocorreu somente em 2018, obtido de um equino com encefalite no Espírito Santo (CASTRO-JORGE et al., 2019; MARTINS, 2019). O vírus foi relacionado com encefalite em eqüinos na América do Sul, na Argentina em 2006 (MORALES et al., 2006; FLORES e WEIBLEN, 2009), e no Brasil, detectado pela primeira vez através de estudos sorológicos em equinos no Pantanal Sul Mato-Grossense (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011), com evidências sorológicas sendo descritas em aves domésticas, equinos e em humanos nas mesmas regiões, e nos estados da Paraíba e do Piauí, demonstrando a disseminação do vírus pelo país (MELANDRI et al., 2012; OMETTO et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014; VIEIRA et al., 2015).

De acordo com estudo desenvolvido por LANGEVIN et al. (2001), foram definidos critérios de eleição para o uso de galinhas como sentinelas para a circulação viral do VNO: suscetibilidade à infecção, competência virêmica do hospedeiro como reservatório, não participação do ciclo de transmissão direta do vírus através do contato ave-ave, desenvolvimento de anticorpos detectáveis e sobrevivência, com o monitoramento de resposta das aves à infecção experimental em cativeiro por picada de mosquito.

Os resultados obtidos demonstraram que todas as galinhas inoculadas e infectadas, sobreviveram com tempo hábil para desenvolver anticorpos neutralizantes detectáveis; que a viremia detectada nas galinhas testadas ficou abaixo do nível necessário para manter o ciclo de transmissão do VNO pelo vetor *Culex pipiens* (importante no ciclo de transmissão da FNO em aves nos Estados Unidos), impedindo a amplificação viral e demonstrando a incompetência desta espécie para retransmissão do VNO ao vetor; a transmissão direta experimental (por agulha) demonstrou – se falha, sendo observada em apenas uma galinha de todas as cobaias testadas, sendo esta, uma característica desejável para eleição de espécie sentinela (embora outras pesquisas apontem aves como gansos domésticos e corvos americanos com competência para a transmissão direta do vírus, que pode ocorrer através da inalação de aerossóis infecciosos, ingestão de alimentos

contaminados ou contato com sangue infectado); a presença do VNO em secreções orais e fezes das galinhas apresenta decréscimo significativo após 24 horas, implicando na redução do risco de transmissão do vírus pelas excretas à medida em que o tempo da mesma fora do hospedeiro aumenta.

Galinhas de fundo de quintal, criadas na parte ocidental da Turquia, foram utilizadas em pesquisa sorológica como sentinelas para investigar a presença de anticorpos contra o VNO, por serem fonte de amostras sanguíneas seguras para estudo da transmissão do VNO pelo vetor *Culex spp.*, por serem mais viáveis economicamente, e por responderem com maior sensibilidade à pesquisas sorológicas, conforme demonstrado em estudos anteriores, em vários países como a Grécia (ALBAYRAK et al., 2021). Os resultados do estudo na Turquia e estudos realizados durante a epidemia de 2010 na Grécia demonstraram a importância da modelagem de um sistema de vigilância utilizando galinhas sentinelas, capazes de prever a dinâmica do VNO em certas áreas oferecendo resultados confiáveis para auxiliar na detecção da atividade mínima e precoce do vírus, na ausência de casos humanos (KWAN et al., 2012). Pode – se inferir que galinhas apresentam características importantes como sentinelas na detecção da circulação viral e para o monitoramento da transmissão do VNO devido à sua susceptibilidade à infecção, resistência à doença e alta eficácia para a detecção da infecção pela combinação de ELISA de captura de IgM e ELISA de IgG indireto. (LANGEVIN et al., 2001).

Pesquisa sorológica realizada para o VNO e onze flavivírus brasileiros por PAUVOLID-CORRÊA et al. (2014) em 760 equinos, 238 ovinos e 61 jacarés de 17 fazendas locais do sul do Pantanal Sul Mato Grossense, identificou anticorpos neutralizantes em equinos para o VNO e para ILHV e SLEV em duas diferentes sub-regiões locais, o que é uma forte evidência da ampla circulação desses flavivírus na região, que devem ser incluídos como diagnóstico diferencial em futuros soroinquéritos de flavivírus. Contudo, a identificação de animais soropositivos não implica necessariamente no estabelecimento do VNO na região, uma vez que a detecção de anticorpos é uma evidência indireta da circulação de flavivírus e a circulação viral não foi confirmada pelo isolamento do VNO; por esta razão, o isolamento viral é necessário para confirmar a detecção do VNO, bem como de outros flavivírus. Estudos de acompanhamento demonstraram uma importante disseminação do VNO, por evidências sorológicas de circulação do vírus em equinos

do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul (MELANDRI et al., 2012; OMETTO et al., 2010; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014).

Não se pode afirmar que as aves silvestres aquáticas e migratórias tenham sido protagonistas na propagação do VNO na América do Norte somente com base em estudo de simulação ecológica e geográfica realizado à época (PETERSON et al., 2003), visto que a propagação do vírus nos Estados Unidos seguiu modelo radial, diferente do padrão das rotas migratórias; além disso, considerando as mais de 170 espécies migratórias compartilhadas com o Hemisfério Norte, ainda são escassos os estudos de detecção de circulação viral ou sorologia para o VNO em aves silvestres, e com resultados positivos, no Brasil (PETRY et al., 2006). Portanto outras hipóteses de introdução e disseminação viral já discutidas, devem ser igualmente consideradas nas estratégias de vigilância.

Para outros pesquisadores as aves migratórias têm um papel importante na introdução do VNO em áreas anteriormente não afetadas. Durante a migração, as aves podem transportar vírus de áreas de inverno, infectadas endemicamente, para locais de parada em regiões não afetadas; portanto, a identificação de possíveis regiões que sirvam como porta de entrada à introdução do VNO, depende do estudo das espécies migratórias e suas rotas. Além da migração regular, rotas menos previsíveis podem ser utilizadas, devido ao deslocamento acidental das aves por tempestades, contribuindo para a introdução do vírus (VAN DER MEULEN et al., 2005).

Nos Estados Unidos as epidemias ocorreram em regiões pantanosas, onde há contato entre aves e mosquitos, que por sua vez são capazes de infectar humanos (RAPPOLE et al., 2000). Regiões como a Amazônia e o Pantanal, que apresentam estas condições ecológicas, ocupam grande área do território brasileiro e delineiam ambientes favoráveis à circulação de arbovírus: pela elevada densidade populacional de mosquitos como hospedeiros invertebrados, e grande diversidade de aves residentes ou de hábitos migratórios, como hospedeiros vertebrados amplificadores (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

As planícies litorâneas abrigam um extenso e complexo sistema de lagoas, manguezais e áreas úmidas associadas. O litoral brasileiro apresenta características de conurbação e recebe grande número de turistas nos meses de verão e férias, época que podem estar presentes também, diversas espécies migrantes neárticas. O táxon que representa o principal reservatório na manutenção da transmissão local

do VNO permanece desconhecido (PETRY et al., 2006). Os passeriformes são importantes reservatórios para o VNO e estão associados a ambientes terrestres, e áreas urbanas, com a possibilidade de introdução do VNO nas cidades que percorram durante seu deslocamento (KOMAR et al., 2003).

Contudo, não há na atualidade, como comprovar os efeitos da introdução do VNO em regiões tropicais da América do Sul como o Brasil; estudos sugerem efeitos pouco deletérios em relação aos apresentados nos Estados Unidos, quando da ocorrência de surtos pelo VNO, o que poderia ser explicado por um contato prévio dos organismos suscetíveis com outros vírus da família Flaviviridae (como por exemplo Dengue, Febre Amarela e Rocio) que confeririam proteção cruzada, ou pela possibilidade de uma dissolução dos efeitos do vírus em função da existência de grande diversidade de espécies, comparando com o Hemisfério Norte. Existe ainda a possibilidade de subnotificação de casos de mortalidade em aves silvestres (PETRY et al., 2006)

O contato permanente de aves domésticas, equinos e eventualmente do homem, com aves silvestres ou migratórias e mosquitos vetores, assim como a ausência de medidas de biossegurança, torna as criações de fundo de quintal vulneráveis a infecção pelo VNO. Desta forma, a identificação de aves migratórias que entram em contato com aves de subsistência, pessoas e animais domésticos em regiões com condições de proliferação de culicídeos, é importante para a vigilância e prevenção de surtos da FNO no Brasil (JÚNIOR et al., 2020).

Considerando a grande população de aves do reservatório e a abundância e diversidade de espécies de mosquitos no Brasil, o VNO pode ter se tornado endêmico em alguns estados. A evolução contínua do VNO na América do Norte 34 e as possíveis consequências da circulação do VNO no Brasil na saúde pública, na conservação de aves silvestres e na economia enfatizam a necessidade de estabelecer vigilância do VNO e programas de pesquisa do VNO brasileiro para minimizar possíveis danos à sociedade brasileira a partir da introdução de outra arbovirose letal além das já estabelecidas no país.

Existem poucos relatos na literatura sobre o período de incubação da doença nas aves, entretanto o período de viremia nestes animais é de 1 a 4 dias, onde a partir daí a maioria adquire imunidade. Correlacionando, este aspecto com o registro de tempo de vôo de algumas espécies de aves anilhadas no Brasil e recapturadas nos EUA, que foi de 11 dias, reforça a possibilidades de entrada deste e de outros

vírus no Brasil, ou vice-versa. A quantidade de animais que migram para a área, a diversidade de espécies e a infra-estrutura do local, foram os fatores mais importantes para a escolha do local de realização do inquérito.

## **6. CONCLUSÕES**

A FNO é uma doença complexa, envolvendo vários atores, não elucidada por completo, mostrando – se um desafio para a comunidade científica e uma ameaça à organismos animais de diferentes espécies, que deve receber atenção e esforços continuados para o seu completo conhecimento, de onde advirão formas de prevenção e controle, para o salvaguardo das populações humanas e animal, inclusive do Brasil.

Em relação ao inquérito molecular realizado no Complexo estuarino-lagunar de Ilha Comprida e Iguape, com aves de subsistência sentinelas para FNO, de acordo com o Laudo diagnóstico emitido pelo IAL/SP, todas as amostras testadas para este estudo (100%, n= 112) demonstraram – se negativas para o Vírus do Nilo Ocidental bem como para outros Flavivírus, como o vírus da Encefalite de Saint Louis, da Febre Amarela, Dengue, Zika e Rocio, no teste PCR em Tempo Real -Rt – PCR, demonstrando a ausência de circulação viral do vNO nesta localidade em julho de 2021.

Apesar do resultado obtido, as vigilâncias epidemiológica e entomológica são ferramentas valiosas na detecção precoce de doenças, para prevenção e controle de espalhamento de patógenos nocivos à saúde humana e animal, devendo ser adotadas estratégias robustas e contínuas de busca ativa da presença da FNO em animais e na população, como o inquérito realizado no presente trabalho, envolvendo áreas de risco para a circulação do vírus do Nilo Ocidental no país.

Ressaltamos a importância dos equinos como sentinelas para a FNO e a valiosa contribuição que estudos realizados continuamente no Brasil, envolvendo esta espécie, ofertam à compreensão, ao controle, tratamento e profilaxia da doença, e à construção de um sistema de vigilância epidemiológica eficaz, englobando o conceito de Saúde Única.

Com a posse de tal conhecimento, a realização de um estudo de circulação viral que contemplasse ambas as espécies, aves e equinos, seria fundamental para compor uma fotografia momentânea da localidade estudada no tocante ao vNO.



Contudo, em decorrência da pandemia de COVID – 19, ações inéditas que seriam desenvolvidas pelo Serviço Veterinário Oficial do Governo Estadual Paulista, como os inquéritos de Anemia Infecciosa Equina e de Mormo em equídeos do Estado de São Paulo, que ofertariam as amostras biológicas para pesquisa do vNO e comporiam o presente estudo, não ocorreram, deixando uma lacuna a ser preenchida em estudos posteriores.

O 1º caso positivo de FNO em um equino no Estado de São Paulo em 2019, descrito no apêndice desta dissertação, corrobora a necessidade de implementação e de manutenção de esforços no tocante à execução de ações de vigilância epidemiológica pelo poder público, em consonância com instituições de ensino e pesquisa, para o estudo desta arbovirose.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAPAR. AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ - ADAPAR/PR. NOTA TÉCNICA GSA Nº 01/2021 - Ocorrência de Febre do Nilo Ocidental no Paraná. PR, 2021. Disponível em: [https://www.crmv-pr.org.br/uploads/noticia/arquivos/nt\\_01\\_2021\\_adapar.pdf](https://www.crmv-pr.org.br/uploads/noticia/arquivos/nt_01_2021_adapar.pdf). Acesso em: 05 maio 2022.

ALBAYRAK, H.; SAHINDOKUYUCU, I.; MUFTUOGLU, B. et al. Sentinel serosurveillance of backyard hens proved West Nile virus circulation in the western provinces of Turkey. **Vet Med Sci**, v. 7, n. 6, p. 2348-2352, 2021. Disponível em: <doi: 10.1002/vms3.589.> Acesso em: 14 set. 2022.

ALMEIDA, F. Q. DE e SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39 (suppl. spe.), p.119-129, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300014>>. Acesso em: 10. fev. 2023.

ANGENVOORT, J. et al. West Nile viral infection of equids. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n.1-2, p. 168-180, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.013>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ARJONA, A.; WANG, P.; MONTGOMERY, R. R. et al. Innate immune control of West Nile virus infection. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1648–1658, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01649.x>>. Acesso em: 25 fev. 2022.

AUSTIN, R. J. et al. An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. **The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 45, n. 2, p. 117-

123, Feb. 2004. Disponível em: <PMID: 15025147; PMCID: PMC548600>. Acesso em: 20 out. 2021.

BANET-NOACH, C; SIMANOV, L; MALKINSON, M. Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 489-494, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/0307945031000154080>>. Acesso em: 25 ago. 2021.

BLACKMORE, C. G. et al. Surveillance results from the first West Nile virus transmission season in Florida. **American Journal Tropical Medicine of Hygiene**, v. 69, n. 2, p. 141-50, 2001. Disponível em: <PMID: 13677369>. Acesso em: 14 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF: MS, p. 325-329, 2005a. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_7ed.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf)>. Acesso em: 22 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Gabinete do Secretário de Defesa Agropecuária, do MAPA. Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005b. Aprova o Manual Técnico para o Controle da Raiva dos Herbívoros. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 set. 2005. p. 9.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros: Manual Técnico**. [s.n.]. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Departamento de Saúde Animal / SDA / MAPA. INFORMATIVO PNSA Nº 4, de 10 de setembro de 2010. **Reconhecimento de sítios de aves migratórias no Estado do MT**. Brasília, DF, 2010a. Disponível em: <<file:///C:/Users/cda/Documents/FNO%202/InformativoPNSA4Reconhecimentositiosdeavesmigratorias.pdf>> Acesso em: 04 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. In: OPAS-Organização Pan-Americana da Saúde; OMS-Organização Mundial da Saúde; PANAFTOSA-Centro Pan-Americano de Febre Aftosa. **Manual veterinário de colheita e envio de amostras**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.], 2010b, p. 35-47.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância do *Culex quinquefasciatus***. Brasília, DF: MS, 2011. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_culex\\_quinquefasciatus.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_culex_quinquefasciatus.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária / Departamento de Saúde Animal / Coordenação Geral de Combate a Doenças / Coordenação de Sanidade Avícola. NOTA TÉCNICA CSA Nº 16/2012 de 08 de outubro de 2012. Vigilância epidemiológica para influenza aviária (IA) e doença de Newcastle (DNC) em sítios de aves migratórias. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 out. 2012. p. 1-2. Disponível em: <

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa>>. Acesso em: 18 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal, publicado pelo Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, na forma do anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2013. p. 47.

BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses**: normas técnicas e operacionais. Brasília, DF, 2016.p.121. Disponível em:<[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_prevencao\\_controle\\_zoonoses.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonoses.pdf)>. Acesso em: 05 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria N° 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 fev. 2016. p. 23-24. Disponível em: <[file:///C:/Users/cda/Downloads/portaria204de17defevereirode2016%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/cda/Downloads/portaria204de17defevereirode2016%20(1).pdf)>. Acesso em: 26 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Portaria n.º 782, de 15 de março de 2017. Define a relação das epizootias de notificação compulsória e suas diretrizes para notificação em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: MS, 2017. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt0782\\_16\\_03\\_2017.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt0782_16_03_2017.html)>. Acesso em: 19 maio. 2021

BRASIL. Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo – SESA/ES. Núcleo Especial de Vigilância Epidemiológica. GT ARBOVIROSES/NEVE/GEVS/SESA/ES. NOTA TÉCNICA N° 01/2018 - Informações e procedimentos para a vigilância de Febre do Nilo Ocidental: Orientações para profissionais de saúde no Estado do Espírito Santo. Vitória, ES, 2018a. Disponível em: <<https://ameci.org.br/wp-content/uploads/2018/06/Nota-Tecnica-Febrido-Nilo-2018.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. Coordenação-Geral de Planejamento e Avaliação Zoossanitária - CGPZ. Nota Técnica N° 5/2018/CGPZ/DSA/SDA/MAPA de 21 de novembro de 2018. Ficha Técnica - Febre do Nilo Ocidental – Orientações ao Serviço Oficial de Saúde Animal. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, 21 nov. 2018b. p. 1-2. Disponível em: [http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0). Acesso em: 18 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Febre do Nilo Ocidental. Brasília, DF: MS, v.1, p. 389-400, 2019. Disponível em:

<[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5. Ed, MS, Brasília, DF, v. 1, p. 126, 2022. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_5ed\\_rev\\_atual.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2023.

BRINTON, M. A. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 371-402, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160654>>. Acesso em: 05 jan. 2023.

BUNNING, M. L.; BOWEN, R. A.; CROPP, B. C. et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 380-386, Apr. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid0804.010239>>. Acesso em: 04 dez. 2022.

BURKE, D.S. e MONATH, T.P. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M. e HOWLEY P. M. **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1043-1125.

BYAS, A. D. e EBEL, G. D. Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 48, Jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9010048>>. Acesso em: 24 fev. 2023

BYAS, A. D.; GALLICHOTTE, E. N.; HARTWIG, A. E. et al. American alligators are capable of West Nile virus amplification, mosquito infection and transmission. **Virology**, v. 568, p. 49–55, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.01.009>>. Acesso em: 18 maio. 2022.

CANELAS, T.; CASTILLO-SALGADO, C.; RIBEIRO, H. Revisão de Literatura Sistematizada sobre Análise Espacial de Fatores de Risco Ambientais de Transmissão de Malária. **Avanços em Doenças Infecciosas**, v. 6, p. 52-62, 2016. Disponível em: <[doi:10.4236/aid.2016.62008](https://doi.org/10.4236/aid.2016.62008)>. Acesso em: 24 jun. 2022.

CASTILLO-OLIVARES, J. e WOOD, J. West Nile virus infection of horses. **Veterinary research**, Suffolk, v. 35, n. 4, p. 467-483, 2004. Disponível em: <<https://hal.science/hal-00902791/> ff10.1051/vetres:2004022ff. >. Acesso em 18 abril 2021.

CASTRO-JORGE, L.A. de; SICONELLI, M. J. L.; RIBEIRO, B. D. S.; MORAES, F. M. D.; MORAES, J. B. D.; AGOSTINHO, M. R. et al. West Nile virus infections are here! Are we prepared to face another flavivirus epidemic?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0089-2018>>. Acesso em: 02 fev. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD), Diagnostic Testing, c2023. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/westnile/healthcareproviders/healthCareProviders-Diagnostic.html>. Acesso em: 04 mar. 2023.

CHALHOUB, F. L. L. **Investigação da circulação dos vírus da Encefalite de Saint Louis e do Oeste do Nilo em equinos do Estado do Rio de Janeiro**. 2017. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

CHALHOUB, F. L. L.; QUEIROZ-JÚNIOR, E. M. DE; DUARTE, B. H. et al. Vírus do Nilo Ocidental no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. **Microorganisms** v. 9, n. 8, p. 1699, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms90816>>. Acesso em: 15 maio 2022.

CIOTA, A. T. e KRAMER, L. D. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3021-3047, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v5123021>>. Acesso em 18 maio 2022.

CISS: Centro de informação em Saúde Silvestre. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, c2022. Disponível em: <<https://www.biodiversidade.ciss.fiocruz.br/saude-silvestre-e-humana-de-olho-na-febre-do-nilo-ocidental>>. Acesso em: 15 out. 2022.

CONAN, A.; GOUTARD, F. L.; SORN, S.; VONG, S. Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries: a systematic review. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 240, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-240>>. Acesso em: 10 abril 2022.

COSTA, E. A.; BAYEUX, J. J. M.; SILVA, A. S. G.; et al. Vigilância epidemiológica do vírus do Nilo Ocidental no mundo e no Brasil: relevância da vigilância equina no contexto da "One Health". **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 56, n. 4, p. e164335, 2020. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/164335>>. Acesso em: 19 abr. 2022.

COSTA, E. A.; GIOVANETTI, M.; SILVA C. L. et al. West Nile Virus in Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 896, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens10070896>>. Acesso em: 24 set. 2022.  
CTBIO. Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ e Ministério da Saúde – MS. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. MS, Rio de Janeiro, RJ, p. 79, 2005. Disponível em: <[http://www3.iq.usp.br/uploads/grupos/grupo4/Biosseguran%C3%A7a/Manuais%20de%20Biosseguran%C3%A7a/Manual\\_Biosseguranca\\_FIOCRUZ.pdf](http://www3.iq.usp.br/uploads/grupos/grupo4/Biosseguran%C3%A7a/Manuais%20de%20Biosseguran%C3%A7a/Manual_Biosseguranca_FIOCRUZ.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2023.

DIAZ, A. L. et al. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 689-691, Apr. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid1404.071257>>. Acesso em: 03 abr. 2023.

DIBO, M. R. et al. A presença de espécies de Culicidae em cidades de médio porte no Estado de São Paulo, Brasil e o risco de infecção pela Febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n. 4, p. 496-503, jul./ago. 2011.

FEITOSA JÚNIOR, A. B.; IMPROTA, C. T. R.; ARRUDA, R. C. N.; BEZERRA, N. P. C.; BEZERRA, D. C.; CORREA SILVA COIMBRA, V. Caracterização epidemiológica dos criatórios de aves de subsistência localizados no entorno do sítio migratório de Panaquatira - MA. **Conjecturas**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 382–396, 2022. Disponível em: <<http://conjecturas.org/index.php/edicoes/article/view/980>>. Acesso em: 11 maio 2022.

FELIPPE, M.J.B. Vírus do Oeste do Nilo (West Nile Virus). In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 1238-1246.

FIGUEIREDO, L. T. M. West Nile virus infection in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20190226, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0226-2019>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. O vírus do Nilo Ocidental. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 604–612, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000070>>. Acesso em: 05 abr. 2023.

FRITSCH, H. et al. Retrospective Investigation in Horses with Encephalitis Reveals Unnoticed Circulation of West Nile Virus in Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1540, 14 jul. 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/v14071540>>. Acesso em: 13 dez. 2022.

FORATTINI, O. P.; NATAL, D.; KAKITANI, I. et al. Food preferences and domiciliation of Culicidae mosquitoes in the Ribeira Valley, São Paulo, Brazil, with special reference to *Aedes scapularis* and *Culex (Melanoconion)*. **Revista de Saude Publica**, v. 23, n. 1, p. 9-19, 1989.

FOUCHIER, R. A.; OSTERHAUS, A. D.; BROWN, I. H. Animal Influenza vírus surveillance. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1754-1757, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00067-7)>. Acesso em: 20 abr. 2021.

GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; BENTO, E. F.; DE SOUZA, A. F. Diagnóstico da realidade dos criatórios de aves na comunidade base física–lpangaçu/RN. **Holos**, v. 4, p. 120-126, 2009.

GANDELMAN-MARTON, R.; KIMIAGAR, I.; ITZHAKI, A. et al. Electroencephalography Findings in Adult Patients with West Nile Virus--Associated Meningitis and Meningoencephalitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 11, p. 1573–1578, Dec. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/379516>>. Acesso em 20 abr. 2021.

GANZENBERG, S. et al. Seroprevalence and Risk Factors for Equine West Nile Virus Infections in Eastern Germany, 2020. **Viruses**, v. 14, n. 6, p. 1191,

2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/v14061191>>. Acesso em: 30 maio 2022.

GLASER, R. L. e MEOLA, M. A. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e11977, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>>. Acesso em: 10 set. 2021.

GODDARD, L. B. et al. Vector Competence of California Mosquitoes for West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1385–1391, dez. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid0812.020536>>. Acesso em: 20 set. 2021.

GRANT, M. J. e BOOTH, A. 2009. Uma tipologia de revisões: uma análise de 14 tipos de revisão e metodologias associadas. **Health Information & Libraries Journal**, v. 26, n. 2, p. 91-108, 2009. Disponível em:<<https://doi.org/10.1111/j.1471-1842.2009.00848.x>>. Acesso em: 20 set. 2021.

HABARUGIRA, G.; SUEN, W. W; HOBSON-PETERS, J. et al. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 589, 19 Jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens9070589>>. Acesso em 20 jan. 2023.

HAYES, E. B. et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1167-1173, 2005a. Disponível em: < <https://doi: 10.3201/eid1108.050289a>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

HAYES, E. B. et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1174-1179, 2005b. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid1108.050289b>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

HARBACH, R. E. e KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, v. 23, n. 4, p. 327-370, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x>>. Acesso em 12 out. 2021.

HEINZ, F. et al. Família Flaviviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. (Editores). **Taxonomia de Vírus: Classificação e Nomenclatura de Vírus (7º Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)**. San Diego: Imprensa Acadêmica, 2000. p. 859–878.

HINTON, M. G.; REISEN, W. K.; WHEELER, S. S. et al. West Nile virus Activity in a Winter Roost of American Crows (*Corvus brachyrhynchos*): Is Bird-To-Bird Transmission Important in Persistence and Amplification? **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 4, p. 683–692, July. 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/jme/tjv040>>. Acesso em: 23 jul. 2022.

HUBÁLEK, Z. e HALOUZKA, J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 5, p. 643–650,

Sep./Oct. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEMAVE/ICMBIO. **Relatório anual de rotas e áreas de concentração de aves migratórias no Brasil**. Cabedelo; PB, 2016. 63 p. Disponível em: <[file:///C:/Users/cda/Documents/FNO%202/Relatorio%20ICMBio%202016%20DCOM\\_Miolo\\_Rotas\\_Migrat%C3%B3rias\\_2016\\_final.pdf](file:///C:/Users/cda/Documents/FNO%202/Relatorio%20ICMBio%202016%20DCOM_Miolo_Rotas_Migrat%C3%B3rias_2016_final.pdf)>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEMAVE/ICMBIO. **Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil**. 3a Edição. Cabedelo; PB, 2020. 105 p. Disponível em: <<file:///C:/Users/cda/Documents/FNO%202/artigos/Relat%C3%B3rio%20de%20Rotas%20e%20%C3%81reas%20ICMBio%202019.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEMAVE/ICMBIO. **Relatório de áreas de concentração de aves migratórias no Brasil**. 4a Edição. Cabedelo; PB, 2022. 213 p. Disponível em: <<file:///C:/Users/cda/Documents/FNO%202/Teses/Relatorio%20ICMBio%202022.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2023.

JÚNIOR, A. B. F.; BEZERRA, N. P. C.; BEZERRA, D. C. et al. Influenza aviária: vigilância ativa em criações avícolas de subsistência no entorno do Sítio de aves migratórias de Panaquatira, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Desenvolvimento, [S. l.]**, v. 6, n. 4, p. 17773–17782, 2020. Disponível em: <DOI: 10.34117/bjdv6n4-085>. Acesso em: 14 dez. 2022.

KAISER, J. A. e BARRETT, A. D. T. Twenty Years of Progress Toward West Nile Virus Vaccine Development. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 823, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v11090823>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

KAISER, J. A. e BARRETT, A. D. T. Twenty Years of Progress Toward West Nile Virus Vaccine Development. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 823, Sep. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v11090823>>. Acesso em: 30 jul. 2022.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses : including certain other viruses of vertebrates. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, San Antonio, Texas, 1985.

KLENK, K.; SNOW, J.; MORGAN, K. et al. Alligators as West Nile virus amplifiers. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 12, p. 2150–2155, Dec. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid1012.040264>>. Acesso em 29 ago. 2022.

KOMAR, N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. **Advances in virus research**, v. 61, p. 185-234, 2003. Disponível em: <[https://doi:10.1016/s0065-3527\(03\)61005-5](https://doi:10.1016/s0065-3527(03)61005-5)>. Acesso em: 29 ago. 2021.



KOMAR, N.; LANGEVIN, S.; HINTEN, S. et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 311-322, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>>. Acesso em 24 fev. 2022.

KUTZLER, M.; HARRIS, J.; SWOPE, C. et al. Efficacy and dose response of passive administration of hyperimmunized West Nile virus serum in horses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 10., 2008, Moscow. **Proceedings...**Moscow: Russia, 2008. p. 408–409.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature05829>>. Acesso em: 23 jul. 2022.

LAGATTA, L. **Fatores de risco para introdução e disseminação dos vírus da Influenza Aviária e da Doença de Newcastle em criações de aves de fundo de quintal localizadas no entorno de compartimentos avícolas**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Disponível em: <[https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id\\_trabalho=10984454](https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=10984454)>. Acesso em: 21 fev. 2023.

LANCIOTTI, R. S. Lanciotti RS e KERST, 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. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.39.12.4506-4513.2001>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

LANGEVIN, S. A.; BUNNING, M.; DAVIS, B. et al. Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 726-729, 2001. Disponível em: <doi:10.3201/eid0704.010422>. Acesso em: 23 jul. 2022.

LAWRIE, C. H. et al. Ixodid and argasid tick species and west nile virus. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 653–657, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1004.030517>. Acesso em: 25 fev. 2022.

LONG, M.T. West Nile Encephalomyelitis in Horses. In: KENILWORTH, N.J. (Coord.). DOHME, M. S. **MSD Veterinary Manual**. New York: Merck Sharp & Dohme, 2018. Disponível em: <<https://www.merckvetmanual.com>>. Acesso em: 15 out. 2019.

LORENZ, C.; DE AZEVEDO, T. S.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Impact of climate change on West Nile virus distribution in South America. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 116, n. 11, p. 1043–1053, Nov. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/trstmh/trac044>>. Acesso em 15 fev. 2023.

MARTINS, L. C. et al. Primeiro isolamento do vírus do Nilo Ocidental no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. 1-7, jan. 2019. Disponível em: <[doi:10.1590/0074-02760180332](https://doi.org/10.1590/0074-02760180332)>. Acesso em: 10 abr. 2021.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J. C. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. **World Journal of Virology**, v. 1, n. 2, p.51-70, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i2.51>>. Acesso em: 25 maio 2022.

MAXIMOVA, O. A.; BERNBAUM, J. G.; PLETNEV, A. G. West Nile virus spreads transynaptically within motor control pathways: anatomical and ultrastructural mapping of neuronal virus infection in the central nervous system of primates. **PLoS Negl Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1-23, 2016.

MCLEAN, R. G.; UBICO, S. R.; DOCHERTY, D. E. et al. West Nile virus transmission and ecology in birds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 54-57, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02684.x>>. Acesso em: 24 ago. 2022.

MENDES, C. V. **Febre do Nilo Ocidental: Revisão de Literatura**. 2015. Monografia (Curso de especialização em Infectologia do Programa de Residência Médica em Infectologia) - Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, 2015.

MEIRELES, A. R.; FERNANDES, L. F.; FERNANDES, P. M. G. et al. Primeiro Diagnóstico de Febre do Nilo Ocidental em humano em Minas Gerais: relato de caso. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 102294, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.102294>>. Acesso em: 06 ago. 2022.

MELANDRI, V.; GUIMARÃES, A. E.; KOMAR, N. et al. 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800020>>. Acesso em: 13 mar. 2022.

MOSTASHARI, F.; BUNNING, M. L.; KITSUTANI, P. T. et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. **Lancet**, London, v. 358, n. 9278, p. 261–264, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05480-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05480-0)>. Acesso em: 29 jun. 2021.

NATAL, D. e UENO, H. M. Vírus do Nilo Ocidental: características da transmissão e implicações vetoras. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 417-433, 2004. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001572932>>. Acesso em: 31 mar. 2022.

NEMETH, N.; YOUNG, G.; NDALUKA, C. et al. Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). **Archives of virology**, v. 154, p. 783–789, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-009-0369-x>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

OMETTO, T.; DURIGON, E. L.; DE ARAÚJO, J. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 107, n. 11, p. 723-30, 2013. Disponível em: <doi: 10.1093/trstmh/trt081>. Acesso em 17 ago. 2022.

OSTLUND, E. N.; CROM, R. L.; PEDERSEN, D. D. et al. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 665-669, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid0704.010412>. Acesso em: 23 fev. 2023.

PAUVOLID-CORRÊA, A. e VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da febre do oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 3, p. 463-472, set. 2008.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Anticorpos neutralizantes para o vírus do Nilo Ocidental em cavalos do Pantanal brasileiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 467-474, jun. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000400014>>. Acesso em 23 jul. 2021.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Evidência Sorológica de Circulação Ampla do Vírus do Nilo Ocidental e Outros Flavivírus em Equinos do Pantanal, Brasil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002706>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

PEALER, L. N.; MARFIN, A. A.; PETERSEN, L. R. et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 13, p. 1236-1245, 2003. Disponível em: < DOI: 10.1056/NEJMoa030969>. Acesso em: 20 out. 2021.

PETERSEN, L. R. e ROEHRIG, J. T. West Nile virus: a reemerging global pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 611-614, Jul./Aug., 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.3201/eid0704.010401>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PETERSON, A. T.; VIEGLAIS, D. A.; ANDREASEN, J. K. Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile virus in North America. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 3, n. 1, p. 27-37, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/153036603765627433>>. Acesso em: 12 nov. 2021.

PETRY, R.; PETER, A. S.; GUADAGNIN, D. L. Avifauna do Rio Grande do Sul e doenças emergentes: conhecimento atual e recomendações para a vigilância ornitológica da Influenza Aviária e da Febre do Nilo Ocidental. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 3, p. 269-277, 2006. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/profile/Demetrio-Guadagnin/publication/289700758>>. Acesso em: 05 abr. 2023.

PHALEN, D. N. e DAHLHAUSEN, B. West Nile vírus. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 13, n. 2, p. 67-78, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.saep.2004.01.002>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

RAPPOLE, J. H.; DERRICKSON, S. R.; 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. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid0604.000401>. Acesso em: 10 jun. 2021.

RECH, R. e BARROS, C. Doenças neurológicas em equinos. As Clínicas Veterinárias da América do Norte. **Equine Practice**, v. 31, p. 281–306, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2015.04.010>. Acesso em: 10 abr. 2022.

REED, K. D.; MEECE, J. K.; HENKEL, J. S. et al. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, Influenza A and enteropathogens. **Clinical Medicine & Research**, v. 1, n. 1, p. 5–12, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.3121/cm.1.1.5>. Acesso em: 15 set. 2022.

ROBINSON, N. N. E. e SPRAYBERRY, K. A. **Current Therapy in Equine Medicine**. Oxford: Elsevier Health Sciences, 2009. v. 6, p. 624.

SAMUEL, M. A. e DIAMOND, M. S. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. **Journal of virology**, v. 80, n. 19, p. 9349-9360, 2006. Disponível em: [doi:10.1128/JVI.01122-06](https://doi.org/10.1128/JVI.01122-06). Acesso em: 13 ago. 2021.

SAÚDE. Secretaria de Estado da Saúde do Piauí – SESAPI/PI. Piauí: Nota sobre a ocorrência de Febre do Nilo Ocidental no estado, c2019. Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2019-02-08/8933/nota-sobre-a-ocorrencia-de-febre-do-nilo-ocidental-no-estado.html>. Acesso em: 26 jan. 2020.

SESA. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará – SESA/CE. Vigilância em Saúde. Técnicos da SESA e da ADAGRI investigam caso de Febre de Nilo Ocidental em equinos, c2019. Disponível em: <https://www.saude.ce.gov.br/2019/09/10/tecnicos-da-sesa-e-da-adagri-investigam-caso-de-febre-de-nilo-ocidental-em-equinos/>. Acesso em 26 jan. 2020.

SERRANO, C. P. et al. Arbovírus em emergência: infecção pelo vírus do Nilo Ocidental no Brasil. In \_\_\_\_\_. **Atualidades em Medicina Tropical na América do Sul: Microbiologia**. Stricto sensu, 2021. p. 31-34. Disponível em: (<https://sseditora.com.br/wp-content/uploads/3-ARBOVIRUS-EM-EMERGENCIA-INFECCAO-PELO-VIRUS-DO-NILO-OCIDENTAL-NO-BRASIL-.pdf>). Acesso em: 16 mar. 2023.

SILVA, A. S. G.; MATOS, A. C. D. ; da CUNHA, M. A. C. R. et al. Vírus do Nilo Ocidental associado à encefalite equina no Brasil, 2018. **Transboundary and emerging diseases**, v. 66, n. 1, p. 445-453, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13043>. Acesso em: 06 maio 2022.

SILVA, A.S.G. REHFELDL, S.; SANTOS, B. S. et al. Febre do Nilo Ocidental em equídeos no Brasil: o novo desafio aos médicos-veterinários. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**,

São Paulo, v.19, n.1, 2021. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.36440/recmvz.v19i1.38082>>. Acesso em: 06 maio 2022.

SOMENZARI, M. et al. Um panorama das aves migratórias no Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [S. l.], v. 58, p. e20185803, 2018. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/paz/article/view/127771>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

STEELE, K. E.; LINN, M. J.; SCHOEPP, R. J. et al. Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. **Veterinary pathology**, v. 37, n. 3, p. 208-224, 2000.

STEJSKALOVA, K.; CVANOVA, M.; OPPELT, J. et al. Genetic susceptibility to West Nile virus infection in Camargue horses. **Res in Vet Science**, v. 124, p. 284-292, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.04.004>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

STYER, L. M. et al. Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 9, p. 1262-1270, Sep. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030132>>. Acesso em: 16 jul. 2022.

SUTHAR, M. et al. West Nile virus infection and immunity. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 115–128, Jan. 2013. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1038/nrmicro2950>>. Acesso em 23 jul. 2022.

TOLSÁ, M. J.; GARCIA-PEÑA, G. E.; RICO-CHÁVEZ, O. et al. 2018  
Macroecologia de aves potencialmente suscetíveis ao vírus do Nilo Ocidental. **Proc. R. Soc. B.**, v. 285, p. 2178, 2018. Disponível em:  
<<http://doi.org/10.1098/rspb.2018.2178>>. Acesso em: 23 jul. 2022.

TURELL, M. J. et al. Potential North American vectors of West Nile virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 317-324, 2001.

VALENTE, R. et al. (Org.). Conservação de aves migratórias neárticas no Brasil. **Conservação Internacional**. Belém: 2011.

VAN DER MEULEN, K. M. et al. West Nile virus in the vertebrate world. **Archives of virology**, v. 150, n. 4, p. 637–657, 2005. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1007/s00705-004-0463-z>>. Acesso em: 21 set. 2021.

VIEIRA, M. A.; ROMANO, A. P.; BORBA, A. S. et al. Encefalite pelo Vírus do Nilo Ocidental: o primeiro caso humano registrado no Brasil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377–379, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0170>>. Acesso em: 24 set. 2022.

VILIBIC-CAVLEK, T.; SAVIC, V.; PETROVIC, T. et al. Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Southern Europe. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 437, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00437>>. Acesso em: 03 fev. 2021.

WANG, J.; YANG, J.; GE, J. et al. Newcastle disease virus-vectorized West Nile fever vaccine is immunogenic in mammals and poultry. **Virology Journal**, v. 13, p. 109, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-016-0568-5>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

WARD, M. P.; SCHUERMANN, J. A.; HIGHFIELD, L. D. et al. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3-4, p. 255-259, Dec. 2006. Disponível em: <[doi: 10.1016/j.vetmic.2006.07.016](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.016)>. Acesso em: 20 jan. 2023.

WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH, S. Y. et al. Flaviviridae. **Intervirology**, v. 24, n. 4, p. 183–192, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000149642>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WOAAH - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Taking a Multisectoral, One Health Approach: A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries**. Geneva, Switzerland: [s.n.], 2019. Disponível em: <[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/EN\\_TripartiteZoonosesGuide\\_webversion.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/EN_TripartiteZoonosesGuide_webversion.pdf)>. Acesso em: 02 fev. 2022.

WOAH - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. WEST NILE FEVER. In: WOAAH. **Terrestrial Manual 2022: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022**. Paris, Fr: 2022. p. 697-704. Disponível em: <<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

ZEINAD, A. K.; NOVARETTI, M. C. Z.; CHAMONE, D. A. F. Vírus do Nilo Ocidental: nova ameaça à segurança transfusional?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 2, p. 114–121, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-84842004000200009>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

ZELLER, H. G. e SCHUFFENECKER, I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 147-56, Mar. 2004. Disponível em: <[doi: 10.1007/s10096-003-1085-1](https://doi.org/10.1007/s10096-003-1085-1)>. Acesso em: 05 jun 2022.

## 8. APÊNDICE

### 8.1 CASO DE FEBRE DO NILO OCIDENTAL EM UM EQUINO NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO EM 2019. DESCRIÇÃO E INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Relata-se neste primeiro documento, a vigilância epidemiológica e atendimento de foco para suspeita de ocorrência de Febre do Nilo Ocidental em um equino presente em área urbana na zona leste do município de São Paulo no ano de 2019.

#### FEBRE DO NILO OCIDENTAL (FNO)

A Febre do Nilo Ocidental (FNO) é uma doença causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (VNO), gênero *flavivirus*, RNA vírus, comumente encontrado na África, Ásia Ocidental, Oriente Médio, na Europa e Américas até o Brasil. Faz parte do complexo da família das encefalites japonesas, como St.Louis, Rocio, Murray e Valley e Ilhéus (BRASIL, 2005). O vírus é transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Culex*, que acomete em especial aves silvestres / migratórias, o ser humano e equídeos, e ocasiona desde infecção subclínica, febre branda, até quadros neurológicos graves como encefalite e óbito em casos extremos. O vírus é mantido na natureza em um ciclo enzoótico entre aves e mosquitos, os quais permitem a replicação viral. (MAPA, 2018).

A doença acomete e produz sintomas, podendo ser fatal, para algumas espécies de aves (como corvos, gralhas e pardais) que são o principal reservatório e amplificador do vírus; muitas outras espécies não manifestam sintomas evidentes mesmo infectadas. Somente as aves atuam como reservatório, por apresentarem uma viremia alta e prolongada, servindo, assim, como fonte de infecção para os vetores (BRASIL, 2005).

Não existem evidências da ocorrência da FNO em aves domésticas, à exceção de gansos que têm merecido atenção em estudos de mortalidade e como reservatórios para o vírus. Entre os mamíferos suscetíveis, a FNO acomete especialmente equídeos e seres humanos, que são hospedeiros acidentais e terminais, encerrando o ciclo de transmissão do agente, e não oferecem suporte

para a disseminação da patologia. (FELIPPE, 2016). O período de incubação em equídeos varia entre 3 e 14 dias (BRASIL, 2005).

Nos equídeos, os sinais clínicos da FNO decorrentes da encefalomielite pelo vírus incluem ataxia de grau variado, incoordenação motora, fasciculação muscular, letargia e problemas em nervos craniais, para os quais não há tratamento, apenas terapia de suporte. A taxa de morbidade é de 40%, e letalidade chega à 20% destes, sendo que os outros 20% se recuperam, podendo ou não apresentar sequelas neurológicas. (BRASIL, 2018b).

A profilaxia está baseada em procedimentos como controle de vetores, e redução de exposição dos animais à ambientes de risco. Vacinas contra a FNO para equídeos não estão disponíveis no Brasil. Em humanos, 20% dos infectados apresentam sinais clínicos similares aos de gripe, e menos de 1% apresentam quadro neurológico de encefalite ou meningite e evolução para óbito (FELIPPE, 2016).

## A INVESTIGAÇÃO

No dia 14 de agosto de 2019, às 10:35 hs, o Serviço Veterinário Oficial da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (CDA) foi notificado por e-mail, por meio do Formulário de Notificação de Suspeita ou Ocorrência de Doenças Animais (Form Notifica), utilizado para notificar doenças das categorias 1, 2 ou 3 da Lista de Notificação obrigatória e Doenças Exóticas ou Emergentes conforme a Instrução Normativa N° 50 de 24/09/2013 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2013), da ocorrência de um caso de Febre do Nilo Ocidental no Estado de São Paulo, em um equino.

Segundo informações registradas na notificação, assinada por um Médico Veterinário do setor privado, um equino, macho, de 20 anos, raça trotador, sem histórico vacinal para raiva ou encefalomielite equina, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Cruzeiro do Sul (UNICSUL), no dia 19/07/2019, às 10:00 hs, oriundo de uma propriedade na Zona Leste do município de São Paulo, apresentando quadro de ataxia em membros pélvicos e diagnóstico presuntivo de infecção por *Sarcocystis neurona*, com instituição imediata de tratamento suporte pelos profissionais do hospital, após colheita de sangue total, soro sanguíneo e



líquor que foram conservados por congelamento, para investigação da síndrome neurológica estabelecida.

Durante o período de dez dias de internação, o animal apresentou rápida evolução dos sinais neurológicos com progressão da ataxia em membros posteriores e diminuição da propriocepção, que culminaram em decúbito lateral permanente, com movimentos de pedalagem e quadro convulsivo (aproximadamente em 72 horas após internação), corroborando a decisão de eutanásia para abreviar o sofrimento do animal, em 28/07/2019, às 12:00 horas, através de metodologia humanitária.

No dia 10/08/2019, as amostras de sangue total, soro e líquido do equino foram encaminhadas conjuntamente com o Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (Form SN), do Médico Veterinário requisitante, para o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com solicitação de exames diagnósticos para herpesvirus equino 1 (EHV-1) e vírus da Febre do Nilo Ocidental (FNO). Foi efetuado o processamento do sangue total (com anticoagulante EDTA) para extração de RNA, sendo realizados exames pela metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da ORF30 do herpesvirus equino 1 (EHV-1) (COSTA et al., 2015) e Nested RT-PCR para detecção parcial do gene NS5 do vírus da Febre do Oeste do Nilo (FNO) (SILVA et al., 2019), com posterior sequenciamento dos produtos amplificados por PCR para confirmação do diagnóstico.

No dia 13/08/2019, foram emitidos os diagnósticos por PCR, pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, com resultado negativo para herpesvirus equino tipo 1 (EHV – 1) e positivo para o vírus da Febre do Nilo Ocidental, com confirmação do diagnóstico molecular -PCR / detecção do vírus da FNO, pelo sequenciamento dos produtos amplificados pela nested RT-PCR. O laudo foi encaminhado ao Médico Veterinário requisitante que o retransmitiu ao Serviço Oficial em 14/08/2019.

A partir da notificação ao Serviço Oficial, a ocorrência foi considerada como caso confirmado para Febre do Nilo Ocidental em acordo com a definição contida na Nota Técnica N° 5/2018/CGPZ/DSA/SDA/MAPA: caso suspeito - equídeo com sinais clínicos compatíveis e descartado para raiva, com confirmação pela técnica de

diagnóstico laboratorial 1. – Identificação do agente ... ou demonstração do antígeno viral específico... (BRASIL, 2018).

Em 15/08/2019 o escritório regional do Serviço oficial comunicou a ocorrência à subprefeitura da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, procedendo à abertura do Formulário de Investigação de Doenças Inicial (Form - In), com início da investigação referente à propriedade foco (unidade epidemiológica na qual foi confirmado o caso de FNO), com informações obtidas por um vizinho da localidade (pois o proprietário do animal não encontrava – se no local) o qual relatou que possivelmente em 09/07/2019, o equino, retornando de um passeio com seu proprietário, sofreu uma aparente queda, apresentando claudicação em membro posterior quando foi iniciado tratamento com antiinflamatório, sem sucesso. Em 19/07/2019, com a piora do quadro clínico, o equino foi encaminhado ao HOVET – UNICSUL.

## INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E ENTOMOLÓGICA VETERINÁRIA EM CAMPO

Em 23/08/2019, foi realizada pelo Serviço Oficial, visita à localidade aonde vivia o equino positivo, para dar sequência à investigação epidemiológica, quando constatou – se durante a inspeção, a presença de uma égua e uma potra contactantes, bem como uma dezena de aves domésticas, entre gansos e galinhas, todos aparentemente hígidos, sem relato de ocorrência de mortalidade súbita entre os mesmos.

A propriedade localiza - se em área de periferia da cidade de São Paulo, limítrofe entre a zona urbana e mata densa, circundada por um cinturão verde, com matéria orgânica (serragem e esterco de cocheiras) de diversas propriedades, acumulada a céu aberto, e acúmulo de lixo orgânico e materiais inservíveis de vizinhos nas proximidades e na própria rua. No local encontra – se uma nascente próxima às residências, na qual os moradores também depositam lixo, propiciando ambiente favorável à proliferação de mosquitos do gênero *Culex*, que poderiam estar envolvidos como vetores na transmissão da Febre do Nilo Ocidental.

Moradores locais informaram que havia mais nove propriedades com aproximadamente 20 equinos ao todo, e que três destas abrigariam também aves domésticas (aproximadamente 40 animais), sem sinais clínicos de doenças.

Houve relatos de mordeduras em equinos por morcegos hematófagos, com vacinação esporádica contra raiva, realizada pelos proprietários dos animais e orientação para cadastramento de todas as propriedades com animais de peculiar interesse do Estado junto à CDA. Não foi feita a coleta de amostras de sangue dos equinos contactantes na propriedade foco neste dia, uma vez que o proprietário estava ausente no momento da ação. As ações foram descritas posteriormente no Formulário de Investigação Complementar (Form - Com).

Figura 13: Local da propriedade foco.



Fonte: Adaptação do Autor, Google Earth, 23 de agosto de 2019

Figura 14: Propriedade Foco



Fonte: ORLANDI, S. T. (2019)



Figura 15: Acúmulo de lixo e “cama” das cocheiras, com presença de equino, nas imediações do foco



Fonte: ORLANDI, S.T. (2019)

Figura 16: Equino na área perifocal



Fonte 1: ORLANDI, S.T. (2019)

Figura 17: Equino na propriedade foco



Fonte 2: ORLANDI, S.T. (2019)



Figura 18: Aves sentinelas na propriedade foco



Fonte: ORLANDI, S.T. (2019)

Figura 19: Aves sentinelas na área perifocal




Fonte: ORLANDI, S.T. (2019)

Na data de 27/08/2019 o evento foi reportado pelo Departamento de Saúde Animal e Insumos Pecuários do MAPA em Brasília ao Escritório Internacional de Epizootias (OIE, atual WOA), que tornou a informação pública através de comunicado em site oficial.

Figura 20: Comunicado oficial de foco de FNO no município de São Paulo, emitido pela OIE em 27 de agosto de 2019

21/01/2020 [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=31542](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=31542)

 **Oie** Febre do Nilo Ocidental, Brasil Imprimir  
Fechar

Informações recebidas em 27/08/2019 pelo Dr. Geraldo Marcos De Moraes, Diretor, Departamento de Saúde Animal e Insumos Pecuários, Ministério da Agricultura, Ganaderia e Abastecimento, Brasília, Brasil

Sumário

Tipo de relatório	Notificação imediata
Data de início do evento	07/09/2019
Data de confirmação do evento	23/08/2019
Data do relatório	27/08/2019
Data de envio à OIE	27/08/2019
Evento de data resolvido	28/07/2019
Motivo da notificação	Primeira ocorrência de uma doença listada
Manifestação de doença	Doença clínica
Agente causal	Vírus do Nilo Ocidental
Natureza do diagnóstico	Clínica, Laboratório (avançado)
Este evento pertence a	uma zona definida dentro do país
Relatórios relacionados	<a href="#">Notificação imediata (27/08/2019)</a> <a href="#">Relatório de acompanhamento n.o 1 (20/01/2020)</a>

Novos surtos (1)

Surto 1 (35503080073)	São Paulo, São Paulo
Data de início do foco	07/09/2019

Fonte: Imagem Original do site do Escritório Internacional de Epizootias - OIE

Em 29/08/2019 foi efetuada nova visita do Serviço Oficial à propriedade foco, para a execução de inspeção clínica dos dois equinos contactantes, uma égua e uma potra de dois anos, que encontravam – se hígdas, sem sinais de síndrome neurológica. Foi realizada a colheita de amostras de sangue total e soro sanguíneo de ambas que foram mantidas sob refrigeração, acondicionadas, identificadas através de Formulário de Colheita de amostras (Form Lab), com solicitação de teste padrão para FNO, e encaminhadas em 03/09/2019 ao Centro de Análise e Diagnóstico (CAD/CDA), responsável pelo envio das mesmas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais de Pedro Leopoldo – LDDV/PL, do Laboratório Nacional Agropecuário –Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LANAGRO/MG/LFDA/MAPA), na mesma data.

Figura 21: Coleta de amostras dos equinos do foco



Fonte: ORLANDI, S.T. (2019)

Figura 22: Amostras de sangue coletadas



Fonte: ORLANDI, S.T. (2019)

As amostras de sangue total dos dois animais foram submetidas aos ensaios para detecção do RNA do vírus da Encefalite Equina do Leste e do Oeste pelo método RT – qPCR e para detecção do vírus causador da Encefalite Equina Venezuelana pelo método RT – PCR convencional, com resultados negativos / não detectados, para as 3 enfermidades avaliadas. As amostras foram submetidas ao



ensaio para detecção do RNA do vírus da Febre do Nilo Ocidental (FNO) por técnicas moleculares, com resultado também negativo / não detectado para a enfermidade, com encaminhamento do Relatório de Ensaio emitido pelo LANAGRO/Pedro Leopoldo/ MG em 04/09/2019 ao Serviço Oficial.

Em 23/10/2019, dias após uma reunião entre técnicos da SAA/CDA e membros da Secretaria Estadual da Saúde e do município de São Paulo, realizou-se um evento conjunto entre os órgãos, definido pelo conceito “Saúde Única” ou One Health, na região de ocorrência do caso de FNO, quando foi efetuada uma campanha de vacinação humana contra Raiva por técnicos da saúde, por conta de relatos de mordedura de morcegos em pessoas do local; técnicos da CDA executaram nova inspeção nos 2 equinos contactantes na propriedade foco (os quais não apresentaram sinais clínicos de doenças neurológicas), e educação sanitária sobre as síndromes neurológicas de ocorrência em animais, bem como outras de potencial zoonótico (Raiva, Febre do Nilo Ocidental, Encefalomyelites Equinas do Leste e Oeste, Herpesvírus Equino), enfatizando a importância da vacinação dos herbívoros domésticos contra Raiva em áreas endêmicas ou foco para a doença, ou em casos de síndrome neurológica sem diagnóstico conclusivo, em animais a partir de três meses de idade com reforço após 30 dias e revacinação anual, de acordo com o Manual Técnico para o Controle da Raiva dos Herbívoros (BRASIL, 2009).

Uma coleta entomológica em agosto de 2019 foi realizada na propriedade foco pela equipe da DPE/SUCEN, que não identificou mosquitos do gênero *Culex* (possivelmente devido às baixas temperaturas), sendo que os mosquitos coletados de outros gêneros, apresentaram resultados negativos para detecção viral, pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL).

Nas datas de 23 e 24/10 de 2019 foram realizadas por equipes da Divisão de Programas Especiais - Região Metropolitana de São Paulo (DPE/SUCEN), atividades de reconhecimento do Local Provável de Infecção (LPI) e de vigilância entomológica na localidade definida como foco e em áreas adjacentes, para identificação de locais com potencial e/ou com circulação viral para Febre do Nilo Ocidental, assim como possíveis espécies de vetores envolvidas (DE DEUS e DUARTE, 2019).

As ações foram executadas com o intuito de coleta de mosquitos adultos no período noturno, utilizando – se de armadilhas CDC ou isca luminosa, próximas à

baia do cavalo e dentro do galinheiro (da propriedade); aspiração com Aspirador de Nasci no intradomicílio, peridomicílio, no galinheiro e na baia (da propriedade) e armadilha de Shannon (barraca de tecido branco com lampião no interior) montada próxima à mata e na área peridomiciliar. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e identificadas no laboratório da SUCEN, com os resultados transcritos abaixo (DE DEUS e DUARTE, 2019).

Quadro 2 - Datas das investigações entomológicas e resultado por método utilizado. Fonte: Original SUCEN/DPE. Relatório de Investigação Entomológica no Município de São Paulo – Epizootia Confirmada para Febre do Nilo Ocidental, 2019

Data	Aspiração Nasci	CDC	Shannon	Puçá
23/10/2019	1 amostra	negativa	1 amostra	-
24/10/2019	1 amostra	negativa	1 amostra	1 amostra

Fonte: DE DEUS,J; DUARTE, 2019

Quadro 3 - Resultado de identificação taxonômica das investigações entomológicas. Fonte: Original SUCEN/DPE. Relatório de Investigação Entomológica no Município de São Paulo – Epizootia Confirmada para Febre do Nilo Ocidental, 2019

Data	Espécie	Sexo	Qtde.
23/10/2019	<i>Aedes fluviatilis</i>	Fêmea	1
23/10/2019	<i>Limatus durhamii</i>	Fêmea	2
23/10/2019	<i>Wyeomyia confusa</i>	Fêmea	2
24/10/2019	<i>Aedes fluviatilis</i>	Fêmea	3
24/10/2019	<i>Aedes scapularis</i>	Macho	1
24/10/2019	<i>Anopheles sp.</i>	Fêmea	1
24/10/2019	<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	Fêmea	1
24/10/2019	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Fêmea ingurgitada	1

24/10/2019	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Fêmea	2
24/10/2019	<i>Culex (Culex) sp.</i>	Macho	1
24/10/2019	<i>Limatus durhamii</i>	Fêmea	2
24/10/2019	<i>Wyeomyia confusa</i>	Fêmea	2

Fonte: DE DEUS, J.; DUARTE, 2019

Visto que na propriedade foco de Febre do Nilo Ocidental não houve notificação de novos casos suspeitos da doença, após dois períodos de incubação (30 dias), desde a cura ou óbito do último animal doente (BRASIL, 2018b), o foco foi considerado encerrado pela CDA, a partir de comunicação dos resultados laboratoriais ao interessado e ao MAPA em janeiro de 2020.

Figura 23: Comunicado da OIE de encerramento de caso de FNO no município de São Paulo em 20 de janeiro de 2020

**Oie** Febre do Nilo Ocidental, Brasil

Informações recebidas em 20/01/2020 pelo Dr. Geraldo Marcos De Moraes, Diretor, Departamento de Saúde Animal e Pecuária, Ministério da Agricultura, Ganaderia e Abastecimento, Brasília, Brasil

Sumário

Tipo de relatório	Relatório de acompanhamento nº 1 (relatório final)
Data de início do evento	07/09/2019
Data de confirmação do evento	23/08/2019
Data do relatório	20/01/2020
Data de envio à OIE	20/01/2020
Evento de data resolvido	28/07/2019
Motivo da notificação	Primeira ocorrência de uma doença listada
Manifestação de doença	Doença clínica
Agente causal	Vírus do Nilo Ocidental
Natureza do diagnóstico	Clinica, Laboratório (avanzado)
Este evento pertence a	uma zona definida dentro do país
Relatórios relacionados	<a href="#">Notificação imediata (27/08/2019)</a> <a href="#">Relatório de acompanhamento n.o 1 (20/01/2020)</a>
Surto	Não há novos surtos neste relatório

Epidemiologia

Fonte: Imagem Original do site Escritório Internacional de Epizootias – OIE.

Ressalta-se a importância da descrição de caso para a Febre do Nilo ocidental em animais considerados sentinelas para a doença, pois estes indicam a presença de vírus da Febre do Nilo em uma região e que sob determinadas condições, pode permanecer viável em espécies reservatórios e vetores, com acometimento também da espécie humana, por tratar - se de uma zoonose.

A detecção da presença da doença bem como do agente causal, auxiliam na adoção de medidas preventivas e de controle para animais e para a sociedade, através de ações mistas de vigilâncias ativa e passiva, exercidas pelo poder público e pela comunidade.

## 9. ANEXOS

### 9.1 APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**VIGILÂNCIA PARA FEBRE DO NILO OCIDENTAL EM AVES DE SUBSISTÊNCIA LOCALIZADAS EM SÍTIO DE AVES MIGRATÓRIAS DO COMPLEXO ESTUARINO - LAGUNAR DE ILHA COMPRIDA E IGUAPE/SP**”, registrada com o nº 1918/2023, sob a responsabilidade de **Adriano Pinter dos Santos** e **Silvia Tranquilli Orlandi**, apresentada pela Faculdade de Saúde Pública da USP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 29/03/2023

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 23-03-2023 Término: 23-03-2025
Espécie/linhagem/raça	Gallus gallus
Nº de animais	<b>Não se aplica</b> (material coletado)
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 29 de março de 2023

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

## 9.2 CESSÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS



**Governo do Estado de São Paulo**  
Secretaria de Agricultura e Abastecimento  
Departamento de Defesa Sanitária e Inspeção Animal

### Declaração

**Interessado:** Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP  
**Assunto:** Cessão de amostras biológicas

### TERMO DE DECLARAÇÃO

Eu, Affonso dos Santos Marcos, Médico Veterinário, Diretor Técnico do Departamento de Defesa Sanitária e Inspeção Animal - DDSIA, da Coordenadoria de Defesa Agropecuária - CDA, órgão da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Credencial nº 1729, considerando a Lei de acesso à informação, Lei nº 12.527/2011, que resguarda aos órgãos públicos a observância aos preceitos quanto ao sigilo e confidencialidade dos dados de proprietários, **DECLARO** à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - CEUA-FM/USP, que as 113 amostras de soro de galinhas, cujos resultados serão utilizados no projeto de Mestrado Profissional em Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, da Médica Veterinária Sílvia Tranquilli Orlandi, intitulado: "Protocolo de Vigilância Epidemiológica Ativa para Febre do Nilo Ocidental, em equinos e aves de subsistência - galinhas, do Complexo Estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida/SP", foram coletadas por Médicos Veterinários do Serviço Oficial, integrantes desta Coordenadoria, e encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto Adolfo Lutz - IAL/SP, em atendimento à Instrução Normativa nº 50, de 24/09/2013 - MAPA e Nota Técnica nº 5/2018/CGP/SDA/DSA /MAPA, não havendo a participação da referida aluna no processo de coleta das amostras ou no processamento e análise das mesmas.

Desta forma, não havendo mais nada a declarar, subscrevo - me, reiterando nossos protestos de elevada estima e distinta consideração por esta prestigiosa Universidade, e coloco - me à disposição para quaisquer informações ou esclarecimentos suplementares que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Campinas, 28 de fevereiro de 2023.

Classif. documental	006.01.09.002
---------------------	---------------



Assinado com senha por AFFONSO DOS SANTOS MARCOS - 28/02/2023 às 12:25:48.  
Documento Nº: 66151138-76 - consulta à autenticidade em  
<https://www.documentos.spsempapel.sp.gov.br/sigaex/public/app/autenticar?n=66151138-76>



SAACER202300420A

SIGA

**Governo do Estado de São Paulo**  
Secretaria de Agricultura e Abastecimento  
Departamento de Defesa Sanitária e Inspeção Animal

Affonso dos Santos Marcos  
Diretor Técnico de Departamento  
Departamento de Defesa Sanitária e Inspeção Animal



Assinado com senha por AFFONSO DOS SANTOS MARCOS - 28/02/2023 às 12:25:48.  
Documento Nº: 66151138-76 - consulta à autenticidade em  
<https://www.documentos.spsempapel.sp.gov.br/sigaex/public/app/autenticar?n=66151138-76>



### 9.3 FICHA DE CADASTRO DE ESTABELECIMENTOS AVÍCOLAS DE SUBSISTÊNCIA OU DE "FUNDO DE QUINTAL"



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA  
PROGRAMA ESTADUAL DE SANIDADE AVÍCOLA



#### FICHA DE CADASTRO DE ESTABELECIMENTOS AVICOLAS DE SUBSISTENCIA OU DE "FUNDO DE QUINTAL"

##### 1. Dados do Estabelecimento:

Endereço: [Redacted]	Nº/Km: [Redacted]
Bairro: [Redacted]	
Localidade / Distrito: [Redacted]	
Complemento: [Redacted]	CEP: [Redacted]
Município: Ilhéus Compinade	UF: SÃO PAULO
Telefone: [Redacted]	Fax: [Redacted]
E-mail: [Redacted]	Caixa Postal: [Redacted]
Georreferenciamento:	
Latitude (S): G° [Redacted] M' [Redacted] S" [Redacted]	
Longitude (W): G° [Redacted] M' [Redacted] S" [Redacted]	

##### 2. Dados do proprietário ou responsável legal:

CPF: [Redacted]	
Nome do Responsável legal ou proprietário: [Redacted]	
Endereço: O mesmo	Nº/Km: [Redacted]
Bairro: O mesmo	
Localidade / Distrito: [Redacted]	
Complemento: [Redacted]	CEP: [Redacted]
Município: Ilhéus Compinade	UF: SÃO PAULO
Telefone: [Redacted]	Fax: [Redacted]
E-mail: [Redacted]	Caixa Postal: [Redacted]

##### 3. Endereço para Correspondência (preencher somente se o endereço do item 1 ou 2 for diferente):

Endereço: [Redacted]	Número: [Redacted]
Bairro: [Redacted]	
Localidade / Distrito: [Redacted]	
Complemento: Povoado	CEP: [Redacted]
Município: Ilhéus Compinade	UF: SP
Telefone: [Redacted]	Fax: [Redacted]
E-mail: [Redacted]	Caixa Postal: [Redacted]





## 9.4 FORMULÁRIO DE COLHEITA E ENVIO DE MATERIAL AO LABORATÓRIO PARA VIGILÂNCIA ATIVA EM AVES - PNSA



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA



### FORMULÁRIO DE COLHEITA E ENVIO DE MATERIAL AO LABORATÓRIO PARA VIGILÂNCIA ATIVA EM AVES – PNSA

#### Identificação da amostra

Termo de colheita nº	Lacre(s) nº	Data da colheita:
<sup>1</sup> País de Origem	<sup>2</sup> Responsável pela colheita:	

#### Identificação do estabelecimento avícola

<sup>3</sup> Nome do Estabelecimento/Incubator. (razão social) ou Sítio de Aves Migratórias:		
Proprietário:		
<sup>4</sup> Nº registro no órgão oficial:	Nº cadastro no serviço veterinário oficial:	
Geoposicionamento Latitude (hh° mm' ss.s") - ° ' " Longitude (hh° mm' ss.s") - ° ' "		
Endereço:		
Bairro:	Município:	U.F.
CEP:	Fone:	Fax:
<sup>5</sup> Empresa: Nome da empresa (razão social):		
<sup>6</sup> Endereço:		
Bairro:	Município:	U.F.
CEP:	Fone:	Fax:

#### Identificação do lote de aves

Núcleo:	Lote:	<sup>7</sup> Idade (dia ou sem):	<sup>8</sup> Nº aves:	<sup>9</sup> Nº Total granja:
---------	-------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

#### <sup>10</sup> Tipo de Ave

<input type="checkbox"/> Galinhas	<input type="checkbox"/> Perus	<input type="checkbox"/> Avestruzes	<input type="checkbox"/> Codoma
<input type="checkbox"/> Marreco	<input type="checkbox"/> Pato	<input type="checkbox"/> Emas	<input type="checkbox"/> Perdiz
<input type="checkbox"/> Aves Silvest./Migrat.	<input type="checkbox"/> Aves Ornamentais	<input type="checkbox"/> Outras (especificar)	

#### <sup>11</sup> Tipo de exploração de aves Granja Incubatório

<input type="checkbox"/> Matrizes	<input type="checkbox"/> Avós	<input type="checkbox"/> Bisavós	<input type="checkbox"/> Linhas Puras	<input type="checkbox"/> Frango de corte
<input type="checkbox"/> Postura comercial	<input type="checkbox"/> Recria P. comercial	<input type="checkbox"/> Subsistência	<input type="checkbox"/> SPF	<input type="checkbox"/> Prod. Ovos Control.
<input type="checkbox"/> Outros (especificar)				

#### Utilização de Vacina contra Doença de Newcastle

<sup>12</sup> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim inat. <input type="checkbox"/> Sim viva	<sup>13</sup> Data da última vacinação
---	--

#### Utilização de Vacina contra *Salmonella* Enteritidis

<sup>14</sup> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim inat. <input type="checkbox"/> Sim viva	<sup>15</sup> Data da última vacinação
---	--

#### <sup>16</sup> Tipo de Vigilância

<input type="checkbox"/> Certificação de estabelecimento de reprodução para Salmonelas e Micoplasmas	<input checked="" type="checkbox"/> Monitoramento de estabelecimento comercial para Salmonelas
<input type="checkbox"/> Mortalidade em aves de corte – colheita no SIF	<input type="checkbox"/> Importação
<input type="checkbox"/> Aves de descarte	<input type="checkbox"/> Exportação*
<input type="checkbox"/> Sítios de aves migratórias	<input type="checkbox"/> Compartimentação

\*especificar os testes a serem realizados para cada agente a pesquisar, no campo observação

#### <sup>17</sup> Agentes a pesquisar

<input type="checkbox"/> Newcastle	<input type="checkbox"/> Influenza Aviária	<input type="checkbox"/> Laringotraqueite	<input type="checkbox"/> Salmonelas	<input type="checkbox"/> Micoplasmas
------------------------------------	--	---	-------------------------------------	--------------------------------------

#### <sup>18</sup> Tipo de quantidade de Amostras Colhidas (escrever o número de amostras colhidas)

<input type="checkbox"/> Soros nº	<input type="checkbox"/> Suabes de Cloaca nº	<input type="checkbox"/> Suabes de traquéia nº
<input type="checkbox"/> Propé nº	<input type="checkbox"/> Suabes de Arrasto nº	<input type="checkbox"/> Fezes frescas nº
<input type="checkbox"/> Mecônio nº	<input type="checkbox"/> Suabes Fundo Caixas nº	<input type="checkbox"/> Papel de Caixa Transp. nº
<input type="checkbox"/> Aves mortas nº	<input type="checkbox"/> Pintos Mortos nº	<input type="checkbox"/> Ovos Férteis nº
<input type="checkbox"/> Ovos nº	<input type="checkbox"/> Ovos Bicados nº	
<input type="checkbox"/> Outros (especificar) nº		
<input type="checkbox"/> Órgãos (especificar) nº		



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA



<sup>19</sup> Meio para conservação e transporte de amostras

Material Coletado	Meio utilizado	Validade

Nome do laboratório para o qual o material será enviado

Laboratório:

<sup>20</sup> Observações

--

**Declaração de não utilização de agentes inibidores de crescimento bacteriano e de micoplasmas, quando da colheita de materiais para certificação sanitária dos estabelecimentos avícolas de reprodução e para o monitoramento dos estabelecimentos avícolas comerciais.**

Declaro que tenho pleno conhecimento da Norma Técnica para Monitoramento e Certificação Sanitária de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para salmoneloses (*Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*) e micoplasmoses aviárias (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma melleagridis*), e afirmo que os lotes descritos neste Termo de Colheita não receberam tratamento com agentes inibidores de crescimento bacteriano e de micoplasmas, no período de 3 semanas (ou mais, caso o período de carência desses agentes seja maior) anteriores a data da colheita oficial para certificação sanitária dos referidos lotes. Declaro ainda estar ciente de que exames complementares para a detecção de resíduos de agentes inibidores de crescimento bacteriano e de micoplasmas poderão ser realizados para confirmação desta declaração.

<sup>21</sup> Assinatura do Médico Veterinário Responsável Técnico

Local e Data:

**Profissional responsável pela colheita do material:**

Médico Veterinário Responsável Técnico	Médico Veterinário Oficial
Nome: _____	Nome: _____
CRMV: _____	CRMV: _____
Tel: _____	Tel: _____
_____	_____
Assinatura / Carimbo	Assinatura / Carimbo

## 9.5 RESULTADOS DA PESQUISA DE VÍRUS DO NILO OCIDENTAL E PESQUISA DO GÊNERO FLAVIVÍRUS EM AMOSTRAS DE AVES DE SUBSISTÊNCIA, POR BIOLOGIA MOLECULAR (IAL/SP)



São Paulo, 12 de novembro de 2021

**A Ilma.Dra. Silvia Tranquilli Orlandi**  
**Assistente Agropecuária da Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo/Secretaria da Agricultura e Abastecimento/SP**  
**Assunto: Resultados da pesquisa de Vírus do Nilo Ocidental e pesquisa do gênero Flavivírus em amostras de aves de subsistência, por biologia molecular.**

O Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do Instituto Adolfo Lutz, laboratório de referência para o diagnóstico das arboviroses, encaminha o resultado da pesquisa de Vírus do Nilo Ocidental (VNO), por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Adicionalmente, as amostras foram testadas em ensaio de RT-PCR em tempo real "Pan-flavivírus", capaz de detectar genoma de vírus do gênero Flavivírus, o qual inclui, além do VNO, os vírus da Encefalite Saint Louis, vírus da Febre Amarela, vírus Dengue, vírus Zika e vírus Rocio, entre outros. As amostras de soro recebidas foram agrupadas em *pools*, por propriedade, levando em consideração, volume disponível e presença ou não de hemólise.

As mesmas amostras, agrupadas em *pools*, foram encaminhadas para o Instituto Evandro Chagas (Belém/Pará) para a pesquisa de anticorpos para vírus do Nilo Ocidental.

Os resultados obtidos nos ensaios de biologia molecular estão listados a seguir:

Identificação da propriedade	Município	Id amostra	Pool PCR	Resultado RT-PCR em tempo real VNO/Flavivírus
STO 001/2021 - Eva Falcão dos Santos	Ilha Comprida	EFS 01	EFS Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		EFS 02		
		EFS 03		
		EFS 04	EFS Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
		EFS 05		
		EFS 06		
		EFS 07	EFS Pool 03	NEGATIVO/NEGATIVO
		EFS 08		
		EFS 09		
		EFS 10	EFS Pool 04	NEGATIVO/NEGATIVO
		EFS 11		





**SÃO PAULO**  
GOVERNO DO ESTADO

| Secretaria da Saúde

Identificação da propriedade	Município	Id amostra	Pool PCR	Resultado RT-PCR em tempo real VNO/Flavivírus
STO 002/2021 - Maria Madalena de Oliveira Ferreira	Ilha Comprida	MMOF 01	MMOF Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		MMOF 02		
		MMOF 03	MMOF Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
		MMOF 04		
		MMOF 05		
STO 003/2021 Jose Antonio da Cunha Pinto	Ilha Comprida	JACP 01	JACP Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		JACP 02		
		JACP 03	JACP Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
STO 004/2021 - Onofre de Jesus Souza	Ilha Comprida	OJS 01	OJS Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		OJS 02		
		OJS 03		
		OJS 04	OJS Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
		OJS 05		
		OJS 06	OJS Pool 03	NEGATIVO/NEGATIVO
		OJS 07		
		OJS 08		
		OJS 09		
		OJS 10	OJS Pool 04	NEGATIVO/NEGATIVO
		OJS 11		
		OJS 12		
		OJS 13	OJS Pool 05	NEGATIVO/NEGATIVO
		OJS 14		
		OJS 15		
		OJS 16		
		OJS 17		
STO 005/2021 - Geraldo Majela de Araujo	Ilha Comprida	GM 01	GM Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		GM 02		
		GM 03		
		GM 04		
		GM 05	GM Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
		GM 06		
		GM 07		
		GM 08		
		GM 09		
		GM 10	GM Pool 03	NEGATIVO/NEGATIVO



Identificação da propriedade	Município	Id amostra	Pool PCR	Resultado RT-PCR em tempo real VNO/Flavivírus
STO 006/2021 - Maria Enilda Lima Carneiro	Ilha Comprida	MELC 01	MELC Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		MELC 02		
		MELC 03		
		MELC 04	MELC Pool 02	
		MELC 05		
		MELC 06		
		MELC 07		
STO 007/2021 - Jandira Ferreira da Rocha	Ilha Comprida	JFR 01	JFR Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		JFR 02		
		JFR 03		
		JFR 04		
STO 008/2021 - Francesco Renato Asevedo	Ilha Comprida	FRA 01	FRA Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		FRA 02		
		FRA 03		
		FRA 04		
STO 009/2021 - Paulo Roberto de Oliveira Sales	Ilha Comprida	PROS 01	PROS Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		PROS 02		
		PROS 03		
		PROS 04	PROS Pool 02	
		PROS 05		
		PROS 06		
		PROS 07	PROS Pool 03	
		PROS 08		
STO 010/2021 - Clodinaldo de Andrade	Iguape	CA 01	CA Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		CA 02		
		CA 03		
		CA 04	CA Pool 02	
		CA 05		
		CA 06		
		CA 07		

Identificação da propriedade	Município	Id amostra	Pool PCR	Resultado RT-PCR em tempo real VNO/Flavivirus
STO 011/2021 - Maria Aparecida Pontes Carneiro	Iguape	MAPC 01	MAPC Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		MAPC 02		
		MAPC 03		
		MAPC 04		
		MAPC 05		
		MAPC 06	MAPC Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
		MAPC 07		
		MAPC 08		
		MAPC 09		
		MAPC 10	MAPC Pool 03	NEGATIVO/NEGATIVO
STO 012/2021 - Rute de Jesus Marques Andrade	Iguape	RJMA 01	RJMA Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		RJMA 02		
		RJMA 03		
		RJMA 04	RJMA Pool 02	NEGATIVO/NEGATIVO
		RJMA 05		
STO 013/2021 - Alice	Iguape	STO 013/21 01 A	STO 013/2021 Pool 01 A	NEGATIVO/NEGATIVO
		STO 013/21 02 A		
		STO 013/21 03 A		
		STO 013/21 04 A		
STO 014/21 - Eliseu	Iguape	STO 014/21 01 E	STO014/2021 Pool 01 E	NEGATIVO/NEGATIVO
		STO 014/21 02 E		
		STO 014/21 03 E		
		STO 014/21 04 E		
		STO 014/21 05 E		
STO 015/2021 - Arquimedes	Iguape	STO 015/21 01 Arq	STO 015/2021 Pool 01 Arq	NEGATIVO/NEGATIVO
		STO 015/21 02 Arq		
		STO 015/21 03 Arq		
		STO 015/21 04 Arq		
STO 016/2021 Severino	Iguape	STO 016/21 01 S	STO 016/2021 Pool 01 S	NEGATIVO/NEGATIVO
		STO 016/21 02 S		
		STO 016/21 03 S		
		STO 016/21 04 S	STO 016/2021 Pool 02 S	NEGATIVO/NEGATIVO
		STO 016/21 05 S		
		STO 016/21 06 S		

Identificação da propriedade	Município	Id amostra	Pool PCR	Resultado RT-PCR em tempo real VNO/Flavivírus
STO 017/2021 - Daniele Marques Dias	Ilha Comprida	DM 01	DMD Pool 01	NEGATIVO/NEGATIVO
		DM 02		



**Juliana Silva Nogueira**


CRMV 23.661

Diretor Técnico I

Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial



## 9.6 RESULTADO LABORATORIAL DOS EQUINOS CONTACTANTES, NEGATIVO PARA FNO



**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA**  
**Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MG**  
**Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais - LDDV/PL**

Formulário - FOR		Página: 1 de 2
FOR/LDDV/PL/084 - V.5 - Relatório de Ensaio		
<b>Nº da requisição:</b> LDDV-2019-1023	<b>Data de entrada no laboratório:</b> 03/09/2019 14:35:00	<b>Data coleta:</b> 29/08/19
<b>Requisitante:</b> Centro de Análise e Diagnóstico / Coordenadoria de Defesa Agropecuária		
<b>Endereço:</b> Av. Brasil, 2340 - Jardim Chapadão		
<b>Município:</b> Campinas	<b>UF:</b> SP	<b>CEP:</b> 13070-178 <b>Tel.:</b> (19) 3045-3482 <b>Fax:</b> ---
<b>Proprietário:</b> Valmir Nunes da Silva		<b>CPF/CNPJ:</b> ---
<b>Propriedade:</b> Cochoeira do Valmir		
<b>Endereço:</b> ---		
<b>Município:</b> São Paulo	<b>UF:</b> SP	<b>CEP:</b> --- <b>Tel.:</b> --- <b>Fax:</b> ---
<b>Documento de encaminhamento</b>		<b>Exame(s) solicitado(s)</b>
<b>FORM-IN:</b> 3550308-0073	Febre do Nilo Ocidental e diferenciais	
<b>Número GTA:</b> ---		

**Método:** Detecção do RNA do vírus da Encefalite Equina do Leste por RT-qPCR  
**Ensaio:** Detecção do RNA do vírus da Encefalite Equina do Leste por RT-qPCR

Amostra	Matriz	Identificação	Espécie	Resultado
LDDV-2019-1023-0001	Sangue	Pepita	Equina	Não detectado
LDDV-2019-1023-0002	Sangue	Safira	Equina	Não detectado

**Método:** Detecção do RNA do vírus da Encefalite Equina do Oeste por RT-qPCR  
**Ensaio:** Detecção do RNA do vírus da Encefalite Equina do Oeste por RT-qPCR

Amostra	Matriz	Identificação	Espécie	Resultado
LDDV-2019-1023-0001	Sangue	Pepita	Equina	Não detectado
LDDV-2019-1023-0002	Sangue	Safira	Equina	Não detectado


**Método:** MET/LDDV/PL/074 (Febre do Nilo)  
**Ensaio:** Detecção do RNA do vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV) por técnicas moleculares

Amostra	Matriz	Identificação	Espécie	Resultado
LDDV-2019-1023-0001	Sangue	Pepita	Equina	Não detectado
LDDV-2019-1023-0002	Sangue	Safira	Equina	Não detectado

**Método:** Detecção do Vírus causador da Encefalite Equina Venezuelana por RT-PCR Convencional  
**Ensaio:** Detecção do Vírus causador da Encefalite Equina Venezuelana por RT-PCR Convencional

Amostra	Matriz	Identificação	Espécie	Resultado
LDDV-2019-1023-0001	Sangue	Pepita	Equina	Não detectado
LDDV-2019-1023-0002	Sangue	Safira	Equina	Não detectado

Nº Certificado: **PL-LDDV2019/1018**  
 Av. Rômulo Joviano, s/n, C. P 35 e 50 - Centro, Pedro Leopoldo/MG - CEP 33.600-000. Tel:(31) 3660-9600 - Fax (31)3660-9615

  
 8 3 1 9 6



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA  
 Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MG  
 Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais - LDDV/PL

Formulário - FOR  
 FOR/LDDV/PL/084 - V.5 - Relatório de Ensaio Página: 2 de 2

Observação: -

DATA RECEBIMENTO:	DATA TERMINO DA ANÁLISE:	DATA DA EMISSÃO:
03/09/2019	04/09/2019	04/09/2019 14:58:11

As datas de realização das análises estão disponíveis no laboratório caso seja solicitado pelo cliente. O relatório de ensaio deve ser reproduzido completo. O relatório de exame é válido apenas para os itens de ensaio constantes.  
 A interpretação dos resultados é de responsabilidade do solicitante com base no histórico do animal e/ou rebanho e legislação vigente.  
 A regra de decisão está descrita nos manuais e normas de referência internacionais do método de ensaio.

*Marcelo Fernandes Camargos*

Marcelo Fernandes Camargos  
 Auditor Fiscal Federal Agropecuário  
 CRMV-MG 5.970  
 Signatário Autorizado

Assinado Eletronicamente em: 4-SET-2019 15:40:13.17

Código de autenticação: F655E54A0EF774A0E7BC0819

Nº Certificado: **PL-LDDV2019/1018**  
 Av. Rômulo Joviano, s/n, C. P 35 e 50 - Centro, Pedro Leopoldo/MG - CEP 33.600-000, Tel:(31) 3660-9600 - Fax  
 (31)3660-9615

