

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Clínica Médica

Projeto de Doutorado

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

Pós-graduando: Márcio Junio Lima Siconelli

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Coorientadora: Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Ribeirão Preto – SP
Janeiro - 2020

RESUMO

O vírus da febre do Nilo Ocidental (VFNO) é um arbovírus emergente, que foi detectado, pela primeira vez, na região nordeste do Brasil em 2014. Quatro anos mais tarde foi detectado na região sudeste, acometendo três equinos. Em 2019 foi notificado outro caso equino no Estado de Minas Gerais e a confirmação do primeiro óbito humano por esse vírus no Brasil, embora tenha sido um caso 2017. O ciclo enzoótico é mantido entre aves silvestres e mosquitos, principalmente do gênero *Culex*. Seres humanos e equídeos não apresentam importância epidemiológica na transmissão, pois são considerados hospedeiros terminais e devido ao comprometimento neurológico, normalmente vem à óbito quando acometidos. Apesar disso, os equídeos podem atuar como animais sentinela para a detecção precoce da circulação desse vírus em diferentes regiões. Devido à importância dessa doença para a saúde pública e animal, a recente detecção da infecção pelo VFNO na região sudeste, a ausência de uma vigilância bem estabelecida e a dificuldade no diagnóstico, este estudo visa detectar a possível circulação do VFNO no Estado de São Paulo, em aves e equídeos que tenham apresentado algum sinal neurológico ou que tenham vindo à óbito sem causas conhecidas. O diagnóstico será realizado a partir de técnicas moleculares, histopatológicas e imunológicas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal, visando a detecção e a extensão da circulação deste vírus no Estado. Esse estudo servirá de subsídio para que as autoridades sanitárias conheçam a situação epidemiológica do Estado e possam atuar precocemente na disseminação da informação e assim evitar possíveis casos humanos e animais.

Palavras-chave: encefalomielite viral, flavivírus, vigilância epidemiológica, equídeos, sentinelas.

1. INTRODUÇÃO

A Febre do Nilo Ocidental (FNO) é uma doença zoonótica, não contagiosa, de transmissão vetorial, causada pelo vírus da Febre do Nilo Ocidental [em inglês, West Nile vírus (WNV)]; e, portanto, neste projeto será abreviado como determina o ICTV]. O WNV tem sua origem no continente africano, sendo uma arbovirose (doença transmitida por artrópodes) comum, naquele continente, porém apresenta caráter emergente fora da África. A forma mais grave da doença é caracterizada pelo acometimento do sistema nervoso central, apresentando sinais como febre, ataxia, fraqueza muscular, tremores, encefalite ou encefalomielite.

O ciclo de transmissão do WNV inclui mosquitos ornitofílicos ou zoofílicos e aves, principalmente da ordem passeriforme, como pardais e corvos. Seres humanos e equídeos são tidos como hospedeiros terminais, com viremia insuficiente para infectarem o vetor, não servindo como fonte de infecção para os vetores e consequentemente perpetuação da transmissão.

Embora o WNV tenha chegado às Américas em 1999, nos Estados Unidos, incluindo casos fatais, no Brasil o primeiro caso humano foi documentado apenas em 2014, no Estado do Piauí e mais recentemente em 2017, na mesma região. O primeiro caso em animais foi em 2018, em equinos que apresentavam síndrome neurológica.

No Brasil, a vigilância epidemiológica para o WNV é praticamente inexistente, e quando feita, o sistema é vulnerável, pois o diagnóstico é laborioso e poucos laboratórios estão capacitados para executá-lo, além dos profissionais e a população não estarem sensibilizados para a suspeita dessa doença. Apesar dos equídeos serem hospedeiros terminais, sem importância epidemiológica, até o momento, podem ser considerados como sentinelas. A suspeita junto a detecção precoce fornecerá subsídios para que medidas preventivas sejam instituídas na região, evitando-se a ocorrência de casos humanos.

Assim, todo equídeo ou ave que apresente síndrome neurológica ou algum sinal neurológico, ou ainda que foi encontrado morto sem causa aparente, deve ser submetido ao diagnóstico diferencial de outras encefalites, que não a raiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

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

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

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

Estudos filogenéticos analisando a glicoproteína E de diferentes cepas isoladas de diversas regiões do mundo demonstraram grandes diferenças entre os vírus, agrupando as linhagens virais em dois grupos (LANCIOTTI *et al.*, 2002) com distintos subclados ou “clusters” (LANCIOTTI *et al.*, 2000; CHARREL *et al.*, 2003). A linhagem 1 está distribuída do oeste da África até o Oriente Médio, Europa Oriental, Américas e Austrália (OMETTO, 2013). Esta linhagem é subdividida em três cladogramas (RIDPATH, J. F. *et al.*, 2017), sendo *1a* cepas israelenses e americanas, isoladas entre 1997 e 2000; *1b* cepas europeias e russas, isoladas entre 1996 e 2000 (CHARREL *et al.*, 2003); e *1c* cepas de origem italiana, isoladas entre 1998 e 2008 (MONACO *et al.*, 2010). Em 2018 no Brasil, Estado do Espírito Santo, foi feito o primeiro isolamento do WNV, cepa pertencente à linhagem 1 (MARTINS *et al.*, 2019). Anterior a isso, em outros países, surtos associados seres humanos e aves têm sido causadas por um subconjunto de cepas da linhagem 1 (OMETTO, 2013). A linhagem 2 concentra, principalmente, cepas isoladas na África subsaariana e Madagascar (RIDPATH, J. F. *et al.*, 2017) e parece ser menos virulenta, já que tem sido detectada a partir de casos assintomáticos ou leves, e ao acaso, durante a pesquisa de outros agentes (MONINI *et al.*, 2010; OMETTO, 2013, RIDPATH, J. F. *et al.*, 2017).

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

O ciclo de transmissão natural está relacionado à mosquitos ornitofílicos ou zoofílicos e aves. Os mosquitos do gênero *Culex*, em particular as espécies *Cx. pipens* e *Cx. restuans*, são considerados os principais vetores, embora mosquitos do gênero *Aedes* (*albopictus*) possuam grande potencial de transmissão (KULASEKERA *et al.*, 2001; TURELL *et al.*, 2005), pois mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culiseta* e *Psorophora* já foram detectados com o WNV (CDC, 2017). Diversas ordens de aves podem ser infectadas e atuar como hospedeiros de manutenção, amplificadores ou reservatórios, como por exemplo, a *Charadriiformes* (aves costeiras/limiícolas), *Strigiformes* (corujas), e *Falconiformes* (falcões) (KOMAR *et al.*, 2003; HAYES *et al.*, 2005; TURELL *et al.*, 2005; BRASIL, 2016), mas a principal ordem envolvida no ciclo é a *Passeriforme*, como pardais (*Passer domesticus*) e corvos (*Corvus spp.*) (CAMPBELL *et al.*, 2002; CASTRO-JORGE & SICONELLI *et al.*, 2019), que quando acometidas, as taxas de mortalidade excedem os 40% (HAYES *et al.*, 2005).

Equídeos e o próprio ser humano são considerados hospedeiros acidentais ou hospedeiros terminais, já que não conseguem desenvolver viremia em níveis suficientes para infectar novos vetores e fazer a manutenção da transmissão do vírus (CAMPBELL *et al.*; BUNNING *et al.*, 2002; BRASIL, 2016). Além das aves e mamíferos (terrestres e aquáticos), animais de sangue “frio” como anfíbios e répteis já foram encontrados infectados (KOSTIUKOV *et al.*, 1985; STEINMAN *et al.*, 2003; KLENK *et al.*, 2003).

Apesar de outras formas de transmissão já terem sido relatadas, como por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, vertical, perinatal e por aleitamento materno, elas não possuem importância epidemiológica para a manutenção do ciclo (WHO, 2017; CASTRO-JORGE & SICONELLI *et al.*, 2019).

Desde o seu isolamento, em 1937, diversos surtos começaram a ser detectados em todo o mundo. No ano de 1951, em Israel, foi registrado o primeiro surto em seres humanos (BERNKOPF *et al.*, 1953). Ainda na década de 50, no Egito (região do Delta do Nilo) e Sudão, verificou-se que a soroprevalência para o WNV era de 22% nas crianças e 61% nos adultos (HURLBUT *et al.*, 1956; MURGUE *et al.*, 2001). Em 1974, na África do Sul, uma epidemia resultou na infecção de 55% da população (MCINTOSH *et al.*, 1976). Até então, nenhum óbito pelo WNV havia sido registrado, quando em 1994 e 1996, na Algeria e na Romênia, ocorreram 02 e 17 óbitos, respectivamente (CHANCEY *et al.*, 2015). Após esses casos, muitos outros continuaram sendo reportados na Europa, Oriente Médio e África.

Até a década de 90, o WNV foi considerado um vírus do “Velho Mundo”, mas em 1999 cruza o atlântico e chega à América do Norte, gerando um surto em Nova Iorque, com aumento na mortalidade de aves de vida livre e de zoológicos, além de 67 pessoas infectadas, com 21 indo à óbito (CASTRO-JORGE & SICONELLI *et al.*, 2019). Depois desse primeiro contato, o WNV conseguiu estabelecer um ciclo enzoótico e assim se dispersar por todo o país, causando surtos de encefalites em equinos e seres humanos, além da redução nas populações de aves silvestres (ROEHRIG, 2013). Desde então tem ganho importância tanto para a saúde pública, quanto para a medicina veterinária, uma vez que gera o óbito em muitas espécies animais, em especial aves e equídeos.

Na América do Sul diversos estudos envolvendo técnicas sorológicas, como PRNT e ELISA, tem sido conduzido (CASTRO-JORGE & SICONELLI *et al.*, 2019). De 2004 a 2006 países como a Colômbia, Argentina e Venezuela, documentaram a circulação do WNV pela primeira em animais (aves e equinos), que foram infectados e vieram à óbito (MATTAR *et al.*, 2005; MORALES *et al.*, 2006; BOSCH *et al.*, 2007; DIAZ *et al.*, 2008). Apesar disso, apenas em 2008 foram encontradas evidências sorológicas no Brasil, na região do Pantanal, de que o vírus possivelmente já circulava no território brasileiro (PAUVOLID-CORREIA *et al.*, 2011; MELANDRI *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; BRASIL, 2016; SILVA *et al.*, 2019). Mais tarde, em 2013, na Paraíba, região nordeste do país novas evidências foram encontradas, sugerindo que o vírus tivesse se deslocado da região Centro-Oeste do país para a região Nordeste, hipótese confirmada um ano depois pela primeira confirmação, no Estado do Piauí, do primeiro caso humano até então registrado no Brasil. Apesar disso, o caso foi confirmado apenas por sorologia (VIEIRA *et al.*, 2015). Em 2017, 10 possíveis casos humanos foram reportados, também no Piauí, porém apenas em 2019, um dos casos foi confirmado (CASTRO-JORGE & SICONELLI *et al.*, 2019). Dez anos após a primeira evidência sorológica, pesquisadores conseguiram isolar o vírus pela primeira vez no Estado do Espírito Santo, de 3 equinos que tiveram sintomatologia neurológica e tiveram que ser eutanasiados (MARTINS *et al.*, 2019). Diferentemente de outros países, como Estado Unidos, localizados em região temperada, que possuem ciclos de transmissão em épocas definidas do ano, países tropicais, como o Brasil, possuem todos os fatores necessários para que surtos, silenciosos ou não, se processem durante todo o ano e contribuam para a sua dispersão (OMETTO, 2013). Esse conjunto de informações sugere que o WNV já possa estar amplamente distribuído pelo Brasil, e ter se dispersado silenciosamente, mostrando que a ausência de vigilância e a falta de um diagnóstico adequado possam contribuir para futuros surtos com maior amplitude.

O diagnóstico para o WNV está relacionado a evolução da infecção, definida clinicamente (BUSCH *et al.*, 2008), e para isso o isolamento viral (*in vivo* e *in vitro*), técnicas moleculares, sorológicas e imunopatológicas podem

ser utilizadas (OIE, 2018; CASTRO-JORGE & SICONELLI *et al.*, 2019). O período de incubação, assim como de outras arboviroses, pode variar em média de 2 a 15 dias (BUNNING *et al.*, 2002; VASCONCELOS, 2003; MURRAY *et al.*, 2011).

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

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

De acordo com a evolução da doença, a partir do 4º e 8º dias após o início dos sinais clínicos é possível detectar anticorpos da classe IgM e IgG, respectivamente (BUSCH *et al.*, 2008; MAEDA & MAEDA, 2013; LUSTIG *et al.*, 2018). Baseado nisso, é possível proceder o diagnóstico a partir de diferentes técnicas como ELISA (IgM e IgG), Inibição da Hemaglutinação (HI) e neutralização por redução de placas (PRNT) (MAEDA & MAEDA, 2013; LUSTIG *et al.*, 2018; ZANONI *et al.*, 2018). Assim, caso haja a detecção IgM isoladamente ou a soroconversão por IgG, pode-se confirmar a doença na forma aguda (LUSTIG *et al.*, 2018). Embora o teste de eleição tenha sido o MAC-ELISA para confirmar infecções recentes, alguns inconvenientes podem ser encontrados como a persistência prolongada, por meses e até anos, de anticorpos da classe IgM contra o WNV (PRINCE *et al.*, 2005; BUSCH *et al.*,

2008; MURRAY *et al.*, 2010, 2013; PAPA *et al.*, 2011, 2015) e em países tropicais onde se tem a presença de outros arbovírus do mesmo gênero, como DENV, ZIKV e YFV a chance de que ocorra reação cruzada no diagnóstico é alta (MURRAY *et al.*, 2011; LUSTIG *et al.*, 2018). Dessa maneira, a melhor forma de fazer o diagnóstico sorológico é com amostras pareadas, de modo que caso seja notada a soroconversão da primeira para a segunda amostra ou então um aumento no título de quatro vezes pode-se confirmar a doença aguda.

A confirmação do diagnóstico, no período *post-mortem*, é feita pela utilização de técnicas imunohistopatológicas, como a avaliação pela coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e a avaliação da presença do vírus na imunohistoquímica usando anticorpos específicos para proteínas virais presentes nos tecidos (MURRAY *et al.*, 2011; CDC, 2013). Nas aves, o órgão alvo é o cérebro, em particular o cerebelo (NIJDAM, 2010); Ellis *et al.* (2005) encontraram 92% de positividade pela técnica de isolamento viral. Entretanto pela imunohistoquímica, no mesmo estudo, apenas 40% dos testes foram positivos na análise do sistema nervoso central, enquanto que em tecido cardíaco 96% foram positivos. Palmieri *et al.* (2011) encontraram achados semelhantes pela imunohistoquímica, 97,1% de positividade em tecido cardíaco e 56,7% em tecido nervoso. Dessa maneira, sugere-se que diversos tecidos sejam avaliados, aumentando a sensibilidade de detecção nesses animais (ELLIS *et al.*, 2005; NIJDAM, 2010; PALMIERI *et al.*; 2011).

O mesmo não parece acontecer com os equídeos, já que o WNV demonstra forte tropismo pelo sistema nervoso central (STEELE *et al.*, 2000; CANTILE *et al.*, 2001) e parece não acometer outros tecidos, como coração, pulmões, fígado, rins, entre outros, com a mesma intensidade (NIJDAM, 2010), o que corrobora o fato de ser considerado um hospedeiro terminal (COLPITTS *et al.*, 2012). Histopatologicamente, as lesões causadas no sistema nervoso central são caracterizadas como meningoencefalomielite não supurativa com hemorragias perivascular, localizadas com maior frequência no tronco cerebral e medula espinhal (CANTILE *et al.*, 2001; READ *et al.*, 2005). Ademais, outras lesões como panencefalomielite multifocal e degeneração neuronal também podem ser encontradas (CANTILE *et al.*, 2001; TOPLU *et al.*, 2015).

Na infecção pelo WNV em seres humanos, à semelhança do que se conhece para outros arbovírus do mesmo gênero, a apresentação clínica se dá em cerca de 20% dos casos (REISEN, 2017; LUSTIG *et al.*, 2018). Apenas 1% dos casos, geralmente pessoas idosas e imunocomprometidas, apresentaram a forma grave, neuroinvasiva, da doença (HAYES *et al.*, 2005). Diferentemente, a manifestação da doença neurológica em equídeos chega a 10% dos casos (CASTILLO-OLIVARES & WOOD, 2004), o que apesar de pequena quando comparado ao número de infectados, são animais que podem ser utilizados como sentinela para a detecção precoce do vírus, assim como algumas espécies de aves da ordem dos passeriformes.

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país tropical e isso significa ter a combinação de períodos de alta pluviosidade e temperatura elevadas. Por estas características, está fadado a conviver com enfermidades cuja transmissão se dá principalmente por meio de insetos hematófagos (vetores). Nos últimos cinco anos, a população brasileira, e em particular do Estado de São Paulo, tem sofrido com diversas epidemias causadas por diferentes arbovírus, como Dengue, Zika, Chikungunya (em menor escala) e recentemente, Febre Amarela, que além da população humana, teve grande impacto na população de primatas não humanos, excedendo 15 mil notificações por epizootias. Embora seja o Estado cujo sistema de vigilância em saúde esteja mais desenvolvido, a vigilância epidemiológica não consegue prever quais destas epidemias acontecerão e onde elas terão maior importância, podendo elas acometer seres humanos e animais, estes últimos de grande valor sentimental e econômico. Outros exemplos de arbovírus de importância na saúde animal e, portanto, de econômica são o vírus da Língua Azul (Bluetongue virus), para ruminantes, e recentemente, diagnosticado junto com o WNV em equinos do ES, o “Peruvian Horse Sickness virus” (Nota Informativa nº 123/2019-CGARB/DEIDT/SVS/MS, de 25 de junho de 2019), ainda desconhecido no país.

O WNV é um exemplo de arbovírus que está circulando desde 2014 no Brasil e, provavelmente, vem se dispersando silenciosamente da região nordeste para a região sudeste/sul do país. Novos casos humanos detectados em 2017, no Piauí, e em equinos em 2018, no Espírito Santo, subsidiam essa afirmação. Por ser a economia mais forte do Brasil, o Estado de São Paulo possui alto fluxo migratório de pessoas, e junto a isso, pela sua cultura agropecuária abriga uma população de aproximadamente 214 mil equinos (IBGE, 2017). Fatores de vulnerabilidade como os citados exigem que o sistema de vigilância seja aprimorado e atualizado constantemente, exercendo seu papel de prevenção. Apesar do Estado de São Paulo contar com uma rede de diagnóstico de raiva animal (Instituto Pasteur, Instituto Biológico e FMVZ/Unesp, entre outros) já bem consolidada, esses laboratórios não possuem capacidade operacional para o diagnóstico diferencial de outros patógenos, como o WNV e outras encefalomyelites virais, de importância para a saúde pública e animal. Cabe destacar que, das amostras de equídeos com síndrome neurológica encaminhadas para diagnóstico de raiva animal, cerca de 20 a 30% é positiva para o vírus rábico, o restante fica sem diagnóstico conclusivo. Essa ausência de investigação para outros agentes que ocasionem sinais semelhantes torna o sistema de vigilância vulnerável a introdução e manutenção de doenças jamais registradas.

A dificuldade no diagnóstico é patente e o sistema brasileiro de vigilância, junto à sua população, sofre com isso. Diante de todos os pontos elencados, o desenvolvimento de projetos de pesquisa propostos pela

academia é importante para auxiliar na detecção precoce da circulação viral no nosso Estado e dar apoio aos órgãos oficiais na definição dos programas de vigilância. Desse modo, o presente estudo, realizado em colaboração com a rede de laboratórios do Estado de São Paulo, visa detectar precocemente a circulação do WNV, já que até o momento não se tem dados suficientes que suportem a sua presença (SILVA *et al.*; 2013). O uso de uma população animal sentinela e que seja abundante, como aves e equídeos, é a forma mais adequada para se conhecer a situação epidemiológica de uma região, à exemplo do que é feito na rotina da vigilância de febre amarela, por meio das epizootias em primatas não humanos; assim a detecção precoce da circulação do WNV, conjuntamente, fornecerá subsídios às autoridades sanitárias (humana, animal e ambiental), para que, em tempo hábil, implementem ações de prevenção e controle, mitigando a dispersão desse vírus na população humana e animal, e consequentemente, reduzindo o número de óbitos em ambas populações.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar a circulação do WNV na população de aves e de equídeos do Estado de São Paulo, que vierem à óbito com síndrome neurológica ou sem causa definida.

4.2. Específicos

- 4.2.1. Triar aves e outros animais selvagens recebidos nos serviços de atendimento ambulatorial de animais selvagens, com manifestação neurológica, anterior ao óbito;
- 4.2.2. Coletar amostras de sistema nervoso central de aves, outros animais selvagens e de equídeos que vieram à óbito com manifestação de sinais neurológicos;
- 4.2.3. Coletar amostras de sistema nervoso central de aves e equídeos que vieram à óbito sem causa aparente ou definida;
- 4.2.4. Avaliar a presença do material genético do WNV nas amostras que testaram negativas para raiva animal, por meio da RT-qPCR e/ou nested PCR;
- 4.2.5. Realizar o diagnóstico diferencial de outras causas de encefalomyelites virais em equídeos (EEEV, WEEV e VEEV) nos animais que testarem negativos para WNV;
- 4.2.6. Proceder o isolamento viral em cultivo celular (em células C6/36 e Vero) das amostras positivas pela RT-qPCR e/ou nested PCR;
- 4.2.7. Fazer o sequenciamento e caracterização do vírus detectado nas amostras positivas e/ou quando isolado em cultivo celular;

- 4.2.8. Avaliar macro (quando possível) e microscopicamente as lesões teciduais pelo exame histopatológico (coloração H&E);
- 4.2.9. Avaliar a presença de antígenos do WNV, pela técnica de imunohistoquímica em diferentes cortes do sistema nervoso central e, quando disponível, em outros órgãos;
- 4.2.10. Avaliar a ficha clínica dos animais e os achados *post-mortem* dos animais positivos, relacionando-os com possível infecção viral;
- 4.2.11. Realizar o geoprocessamento e caracterização dos pontos de origem dos animais positivos;
- 4.2.12. Na possibilidade de detecção do WNV ou outra encefalomielite viral em algum animal do estudo, comunicar a Secretaria de Saúde (SES) e de Abastecimento e Agricultura (SAA) do Estado de São Paulo para que sejam tomadas as medidas cabíveis para o controle desta doença;
- 4.2.13. Colaborar na definição de casos suspeitos, em parceria com órgãos oficiais da saúde e agricultura estadual e federal, incluindo os equídeos na rotina das notificações de epizootias como animais sentinelas para a detecção precoce de encefalites virais zoonóticas;
- 4.2.14. Servir de modelo para a implantação do sistema de vigilância já adaptado à estrutura e realidade existente na rede de vigilância e de laboratórios do Estado;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Locais de condução do experimento

Todas as avaliações laboratoriais deste projeto de pesquisa serão desenvolvidas no Laboratório de Virologia Molecular, localizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP), onde existe um laboratório BSL-3/NB-3 que permite o manuseio destas amostras e também do vírus em cultivo (WHO, 2017). Ademais, contará com a colaboração dos pesquisadores do Laboratório de Raiva do Instituto Pasteur de São Paulo (IP/SP); do Laboratório de Raiva e Encefalites Instituto Biológico de São Paulo (IB/SP); do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ/Unesp); do Serviço de Patologia de Animais Selvagens e do Laboratório de Patologia Animal, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/Unesp), e do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL/SP).

AUTORIZAÇÕES CONCEDIDAS:

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO/IBAMA): **autorização concedida: nº 70580-1;**

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA): **despacho de dispensa;**

Despacho de parceria e cooperação - Instituto Pasteur de São Paulo: **celebrado e concedido o uso das amostras;**

Despacho de parceria e cooperação - Laboratório de Raiva e Encefalites - Instituto Biológico de São Paulo: **celebrado e concedido o uso das amostras.**

Despacho de parceria e cooperação – Serviço de Patologia de Animais Selvagens, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/Unesp: **concedido o uso das amostras.**

5.2. Caracterização das amostras

Serão analisadas neste estudo, preferencialmente, amostras de aves e equídeos que forem recebidos vivos com algum sinal clínico de doença neurológica, que evoluírem com quadro neurológico durante o seguimento clínico e/ou que vierem a óbito por causa do quadro neurológico ou com algum sinal relativo a esse sistema. Animais que forem recebidos mortos com suspeita de raiva e/ou outra síndrome neurológica estarão incluídos no estudo. Animais que forem encaminhados aos laboratórios colaboradores e em cujo histórico constem “encontrado morto”, sem nenhuma suspeita aparente, também serão incluídos.

Exemplos disso são as amostras de sistema nervoso central, encaminhadas rotineiramente para rede de diagnóstico de raiva animal do Estado de São Paulo (Instituto Biológico, Instituto Pasteur e FMVZ/Unesp) para diagnóstico único e exclusivamente de raiva animal. Após descartada a infecção por raiva o caso é encerrado, mesmo sem diagnóstico conclusivo. Portanto, com a nossa parceria, essas amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Virologia Molecular para processamento e vigilância virológica para o WNV, já que existe a possibilidade de que este vírus possa estar infectando e causando o óbito destes animais.

Amostras de outros animais como, mamíferos (canídeos, primatas, etc), reptéis, anfíbios e de seres humanos poderão ser incluídos no estudo da vigilância do WNV no Estado de São Paulo.

5.2.1. Histórico dos animais

O histórico clínico dos animais e/ou os achados *post-mortem* serão compilados em planilhas para que, após a análise laboratorial, sejam avaliados conjuntamente a fim de verificar algum sinal que seja característico ou que permita suspeitar precocemente da infecção pelo WNV e assim auxiliar no serviço de vigilância oficial do estado.

Além disso, será avaliado também a região de origem do animal (ambiente urbano, rural ou silvestre), migrações ou viagens (no caso de animais domésticos ou domesticados). Esses dados subsidiarão uma futura análise de risco de disseminação da circulação deste vírus.

5.2.2. Tipo de material a ser colhido

Nos animais que forem encaminhados vivos, com suspeita de síndrome neurológica ou com algum sinal neurológico, ou ainda, que evoluírem com sinais neurológicos deverá ser colhido sangue, para a obtenção do soro.

Os animais sob supervisão, já com sinais neurológicos, que evoluírem para óbito e os animais que forem recebidos com suspeita de raiva, síndrome neurológica ou sem histórico do óbito, durante a necropsia deverão ter, preferencialmente, colhido fragmentos do Sistema Nervoso Central (região encefálica e medular) e quando possível fragmentos de outros órgãos como, coração, pulmões, fígado, baço e rins. Quando disponível, será coletado o líquido cefalorraquidiano.

5.2.3. Armazenamento das amostras

5.2.3.1. Soro

Quando a amostra a ser colhida for sangue ou líquido, este deverá ser colhido, preferencialmente em tubo seco, com ou sem gel separador, de tampa vermelha ou amarela, para a obtenção do soro. As amostras de sangue deverão ser centrifugadas, dessoradas e separadas em duas ou três alíquotas e congelado a ultrabaixa temperatura (-80°C) até o momento da sua utilização.

5.2.3.2. Tecidos/órgãos

Amostras coletadas durante a necropsia ou amostras recebidas já coletadas (sem passar por necropsia antes) deverão ser separadas, equivalentemente, em dois grupos: A, destinado a exames virológicos e B, destinado a exames anatomopatológicos. No grupo A, cada órgão ou região tecidual deverá ser acondicionado em criotubos separadamente, devendo ser adequadamente identificados. Na sequência serão congelados, preferencialmente, em ultrabaixa temperatura; na ausência desse recurso as amostras poderão ser congeladas temporariamente em freezer -20°C. No

grupo B, os órgãos deverão ser cortados em fragmentos de 0,5 a 1,0 cm por no máximo 2,0 a 3,0 cm, em seguida, acondicionados em potes com solução de formalina 4% tamponada (pH 7,4) para fixação do tecido, na proporção 1:10 (tecido:fixador). Será preconizado que os fragmentos fiquem na formalina por pelo menos 48 horas, a depender do tamanho do fragmento obtido, garantindo a fixação completa do tecido. Após esse período, os fragmentos deverão ser acondicionados em solução de álcool 70% até o momento do emblocamento em parafina. Quando possível, será solicitado ao laboratório colaborador que identifique as regiões de cada fragmento encaminhado para a patologia.

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

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

As análises serão realizadas a partir do RNA extraído das amostras obtidas diretamente do soro ou dos tecidos/órgãos coletados dos animais sob suspeita.

5.3.1. Extração do RNA

Para extração do RNA serão utilizados os seguintes kits: QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat No./ID: 52906 - Qiagen®) para amostras de soro e RNeasy Mini Kit (Cat No./ID: 74106 - Qiagen®) para as amostras de tecido. Alternativamente aos kits, a extração poderá ser realizada por meio do TRI Reagent® (Sigma-Aldrich®), utilizando o protocolo já otimizado no laboratório.

5.3.2. RT-qPCR (*West Nile Virus*)

A RT-qPCR será realizada conforme orientação do Manual Terrestre da OIE (*Office International des Epizooties* - Organização Mundial de Saúde Animal, 2018). A técnica recomendada é uma adaptação do método desenvolvido por Eiden *et al.* (2010) para a identificação das linhagens 1 e 2 do WNV. O conjunto de *primers* (*Forward primer*: GGG-CCT-TCT-GGT-CGT-GTT-C; *Reverse primer*: GAT-CTT-GGC-YGT-CCA-CCT-C) e sonda (FAM-CCA-CCC-AGG-AGG-TCC-TTC-GCA-A-BHQ) tem como referência a região

de NS2A do genoma viral. A otimização da RT-qPCR será definida conforme orientação do kit que será utilizado (TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix, Applied Biosystems, Woodward St., Austin, TX, USA). Para a amplificação, as reações serão realizadas em um termociclador da Applied Biosystems, 7500 Real-Time PCR, sendo realizados 45 ciclos, maximizando a detecção do genoma viral.

5.3.3. PCR convencional e Nested PCR

A PCR convencional, seguida da Nested PCR, será utilizada preferencialmente quando a amostra a ser testada for proveniente do sistema nervoso central de mamíferos. Ambas as técnicas já padronizadas são recomendadas no Manual Terrestre da OIE (*Office International des Epizooties* - Organização Mundial de Saúde Animal, 2018) para a detecção da linhagem 1 do WNV (JOHNSON *et al.*, 2001).

Na primeira reação será realizada a RT-PCR *onestep* (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen GmbH, Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany) com o conjunto *outer primers*: 1401F: ACC-AAC-TAC-TGT-GGA-GTC e 1845R: TTC-CAT-CTT-CAC-TCT-ACA-CT. Já a Nested PCR será realizada com o *TaqPCR Master Mix Kit* (Qiagen GmbH, D-60724 Hilden, Germany) com o conjunto *nested primers*: 1485F: GCC-TTC-ATA-CAC-ACT-AAA-G e 1732R: CCA-ATG-CTA-TCA-CAG-ACT. Para a amplificação, as reações serão realizadas em um termociclador da Applied Biosystems, Veriti™ PCR, sendo realizados 35 ciclos em ambas as etapas (convencional e Nested).

5.4. Isolamento e Sequenciamento

As amostras que forem positivas na PCR convencional, Nested PCR e/ou RT-qPCR (Ct < 42), serão tratadas e direcionadas para o isolamento viral em cultivo celular [linhagens de *Aedes albopictus* (clone C6/36) e de rim de macaco verde africano (VERO)], conforme descrito por Martins *et al.* (2019).

Após cada passagem cega, totalizando três, o isolamento será confirmado por RT-qPCR. Caso o isolado seja confirmado, a cepa será preparada para sequenciamento conforme o kit ABI Prism BigDye® Terminator™ v.3.1 Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, USA) e purificada pelo BigDye® Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Alternativamente poderá ser utilizado o protocolo Isopropanol-Etanol, já padronizado em laboratório.

A separação eletroforética e a coleta de dados serão realizadas no sequenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 sequencer Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

5.5. Histopatologia e Imunohistoquímica

5.5.1. Histopatologia

Após fixados em formalina 4% tamponada (pH 7,4), os fragmentos dos tecidos serão embebidos em parafina conforme rotina do Serviço de Patologia de Animais Selvagens e do Laboratório de Patologia Animal, do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal. O bloco parafinado contendo o tecido será cortado na espessura de 3 a 5 µm para a confecção das lâminas e corado pela Hematoxilina e Eosina (H&E; TOLOSA *et al.*, 2003) para avaliação histopatológica. A avaliação histopatológica pela coloração de HE, será realizada em microscopia óptica convencional (microscópio Nikon E200), nos aumentos de 10X, 40X e 100X, sendo identificada a estrutura estudada e todas as alterações presentes que sejam decorrentes de infecção viral.

5.5.2. Imunohistoquímica

Após as lâminas serem confeccionadas, será dado início ao protocolo da técnica de imunohistoquímica, conforme descrito por Palmieri *et al.* (2011) específico para WNV. Serão utilizados os seguintes anticorpos para a identificação das partículas virais: *rabbit polyclonal anti-WNV antibody* (BioReliance, Rockville, MD) e *rabbit monoclonal anti-WNV antibody* (ATCC, Manassas, VA). A avaliação da lâmina de imunohistoquímica será feita em microscopia óptica convencional (microscópio Nikon E200), nos aumentos de 10X, 40X e 100X, buscando-se identificar a coloração marrom acobreada ou avermelhada, a depender do substrato presente no anticorpo secundário, a fim de identificar a presença de antígeno viral intracelular em cada estrutura tecidual avaliada.

A padronização dessa técnica será realizada em parceria com o Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, referência macrorregional para o diagnóstico de diversas doenças de importância em Saúde Pública.

6. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

6.1. Extração do RNA

A avaliação da quantidade e da qualidade do RNA será realizada com auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer), medindo-se a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

6.2. Ct na RT-qPCR

A positividade das amostras será avaliada conforme orientação do Manual Terrestre da OIE. Valores de Ct 37 ou menor serão considerados

positivos; valores de Ct 37.1 até 42 serão considerados suspeitos; e valores acima do Ct 42 serão considerados negativos (OIE, 2018).

6.3. Produto da PCR convencional e Nested PCR

Os produtos da PCR e o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder Plus (NEB3231) serão submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % e visualizadas sob luz UV em equipamento de foto documentação (GEL DOC XR – BioRad).

Amostras positivas para WNV serão identificadas pela banda de 445 pb (*outer primer*) e/ou pela banda de 248 pb (*nested primer*) (OIE, 2018).

6.4. Análise do Isolamento, Sequenciamento, Caracterização e Bioinformática

A confirmação do isolamento nas passagens cegas será feita pela RT-qPCR, conforme item 5.3.2. De cada passagem serão colhidas pequenas alíquotas, para extração do RNA, em pelo menos três momentos diferentes: T0, para verificar a ausência de qualquer RNA viral, ou a presença em proporções residuais; T2, para verificar se está havendo a replicação viral com o surgimento/aumento de RNA viral; e T3, para verificar esse aumento e conseguir confirmar o isolamento. Uma vez confirmada será sequenciado, conforme item 5.4. e analisado.

As sequências de nucleotídeos obtidas serão montadas com o auxílio do programa Bioedit v.7.1.3.0. e os *contigs* gerados serão analisados e comparados com sequências já depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Essas análises serão realizadas com o auxílio do programa JalView v.2.10.5 (<http://www.jalview.org/>). As análises filogenéticas serão feitas de acordo com o melhor modelo de substituição de nucleotídeos implementado no jModelTest (Darriba *et al.*, 2012), pelo programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA) v.7 (TAMURA *et al.*, 2011). Para uma análise mais aprofundada, usaremos tanto a análise *Maximum Likelihood*, quanto a *Bayesian* (DRUMMOND *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2014; GRUBAUGH *et al.*, 2019), no intuito de responder questões como: 1) Há quanto tempo o WNV circula no Brasil?; 2) Quantas introduções distintas aconteceram no Brasil e de onde teriam vindo? 3) Qual cepa estaria circulando atualmente? Tais análises serão realizadas em parceria com o Prof. Dr. Nathan Grubaugh, da Yale School of Public Health, Yale University.

6.5. Georreferenciamento das áreas com animais positivos

O geoprocessamento dos municípios em que as propriedades e/ou regiões cujos animais forem positivos nos testes diagnósticos para o WNV será efetuado com auxílio do software TerraView 4.2.2. A estrutura de

independência contida no conjunto de dados será avaliada pelos Índices de Moran local e global, utilizando o teste de pseudo-significância ($\alpha < 0,05$). Mapas temáticos serão utilizados para a visualização das distribuições espaciais.

7. RESULTADOS ESPERADOS

Diversos arbovírus tem emergido em novos territórios nos últimos anos, muito disso, consequência do aumento da temperatura global, da capacidade de migração do ser humano e dos animais, e da urbanização não planejada, ausência de saneamento e infraestrutura adequada. Em países tropicais, como o Brasil, a emergência é facilitada por todas as condições naturais que apresenta, como temperatura, precipitação média, vegetação, relevo, urbanização e principalmente condições artificiais para manutenção de insetos hematófagos.

Diante disso e das evidências oficiais e não oficiais que tem sido descrita nos últimos anos, conforme discutido por Castro-Jorge e Siconelli *et al.*, (2019), é provável que o WNV esteja circulando silenciosamente no Estado de São Paulo, já que a vigilância e a pesquisa por esse arbovírus é incipiente.

De acordo com a OIE (2018) a carga viral presente no sistema nervoso central de mamíferos, como equídeos é relativamente menor do que a encontrada em aves, o que condiz com o fato desses animais serem considerados hospedeiros terminais e não amplificadores. Por isso, optou-se por abordar diferentes técnicas com o intuito de aumentar a sensibilidade de detecção do WNV, buscando um diagnóstico diferencial para as causas de morte dos animais que tenham sido negativos para raiva.

Outro ponto a se destacar é que, de fato, o vírus pode não ser detectado, seja pela conservação inicial do material, que teve sua origem no campo, pela baixa sensibilidade de alguma das técnicas ou então devido ao vírus não estar presente nessa população estudada. Todas as amostras após recebidas serão armazenadas em ultrabaixa temperatura (-80°C) e formol; embora a técnica adotada seja referência, otimizações poderão ser realizadas para que sejam adequadas à realidade local.

Caso não aconteça a detecção desse arbovírus outras encefalites virais de cunho zoonótico serão pesquisadas. Alguns arbovírus pertencentes ao mesmo gênero são: vírus da encefalite Japonesa (JEV) e encefalite de Saint Louis (SLEV); e do gênero Alphavírus, que parecem acometer com relativa frequência equídeos: encefalomielites equinas do leste (EEEV), oeste (WEEV), e venezuelana (VEEV). De acordo com o MAPA, os últimos casos de EEEV e WEEV datam do ano de 2005, na região Norte e Nordeste do país. Diferentemente a VEEV nunca foi registrada em animais domésticos.

Dessa maneira essas arboviroses também serão pesquisadas, à partir de técnicas moleculares, RT-qPCR e/ou Nested PCR, conforme os protocolos descritos no Manual Terrestre da OIE (2018).

8. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Ano	2019/2020		2020/2021		2021/2022		2022/2023	
Semestre	2	1	2	1	2	1	2	1
Disciplinas								
Revisão de Literatura								
Finalização das Parcerias								
Aquisição de amostras e dados clínicos/ <i>post-mortem</i>								
Extração e RT-qPCR/ Nested RT-PCR								
Isolamento e caracterização genética								
Histopatológico/Leitura								
Imunohistoquímica/Leitura								
Análise parcial dos dados								
Geoprocessamento e análise de risco								
Análise final dos dados								
Redação da Tese								
Redação de artigos científicos								

REFERÊNCIAS

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros**. Manual técnico. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)**. Cartilha técnica. 2015. <Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/CartilhaEEBtcnica.pdf>>

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia Vigilância em Saúde**. 2016.

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

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

BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO J. C.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PEREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A. E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER L. West Nile Virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 651-3. 2007.

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

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

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S.; WESTAWAY, E. G.; BRANDT, W. E. Antigenic

relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37– 43. 1989.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, MA.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 1969–1973, 2012.

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

EIDEN, M.; VINA-RODRIGUEZ, A.; HOFFMANN, B.; ZIEGLER, U.; GROSCHUP, M. H. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 748–753, 2010.

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

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

GRUBAUGH, N.D.; LADNER, J.T.; LEMEY, P.; PYBUS, O.G.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E.C.; ANDERSEN, K.G. **Tracking virus outbreaks in the twenty-first century. Nature Microbiology**, v. 4, p. 10–19, 2019.

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

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

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

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

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Agro 2017**. População de equinos do Estado de São Paulo. 2017. <Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?tema=75665&localidade=35>

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

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

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

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

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

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

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

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

LANCIOTTI, R. S.; EBEL, G. D.; DEUBEL, V.; KERST, A. J.; MURRI, S.; MEYER, R.; BOWEN, M.; MCKINNEY, N.; MORRILL, W. E.; CRABTREE, M. B.; KRAMER, L. D.; ROEHRIG, J. T. Complete genome sequences and

phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96–105, 2002.

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

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

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

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

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

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F.C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, n. 64, p. 160–173, 2015. <Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NUNES, M. R. T.; PALACIOS, G.; FARIA, N. R.; SOUSA-JUNIOR, E. C.; PANTOJA, J. A.; RODRIGUES, S. G.; CARVALHO, V. L.; MEDEIROS, D. B. A.; SAVJI, N.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A.; LEMEY, P.; VASCONCELOS, P. F. C.; LIPKIN, W. I. Air Travel Is Associated with Intracontinental Spread of Dengue Virus Serotypes 1–3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, e2769, 2014.

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

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

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

PALMIERI, C.; FRANCA, M.; UZAL, F.; ANDERSON, M.; BARR, B.; WOODS, L.; MOORE, J.; WOOLCOCK, P.; SHIVAPRASAD, H. L. Pathology and Immunohistochemical Findings of West Nile Virus Infection in Psittaciformes **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 5, p. 975-984, 2011. <doi:10.1177/0300985810391112>

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

PANAFTOSA (Centro Pan-Americano de Febre Aftosa). OPAS (Organização Pan Americana de Saúde). Organização Mundial de Saúde (OMS). Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico. **Cooperação Técnica MAPA/OPAS-PANAFTOSA para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil**. 2010.

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

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

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

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

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

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

RICE, C. M.; LENCHES, E. M.; EDDY, S. R.; SHIN, S. J.; SHEETS, R. L.; STRAUSS, J. H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726–735, 1985.

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, J. R.; MEDEIROS, L. C.; REIS, V. P.; CHÁVEZ, J. H.; MUNHOZ, T. D.; BORGES, G. P.; SOARES, O. A. B.; CAMPOS, C. H. C.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D.; SILVA, M. L. C. R.; FARIA, J. L. M.; SILVA, E. E.; FIGUEIREDO, L. T. M. Serologic survey of West Nile virus in horses from

Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921-923, 2013.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2003. 331p.

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

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

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

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

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

ZANONI, F.; ALFIERI, C.; MORONI, G.; PASSERINI, P.; REGALIA, A.; MENEGHINI, M.; MESSA, P. Delayed Diagnosis of West Nile Virus Infection in a Kidney Transplant Patient Due to Inaccuracies in Commonly Available

Diagnostic Tests. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 1, n. 1, 2018.

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