



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Karinny Ferreira Campos

Encefalomielite equina Leste na Ilha de Marajó, Pará

Belém
2012

Karinny Ferreira Campos

Encefalomielite equina Leste na Ilha de Marajó, Pará

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

**Belém
2012**

Karinny Ferreira Campos

Encefalomielite equina Leste na Ilha de Marajó, Pará

Dissertação submetida como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Sanidade Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

José Diomedes Barbosa Neto, Dr.
Universidade Federal do Pará

Valéria Duarte Cerqueira, Dra.
Universidade Federal do Pará

Stéfano Juliano Tavares de Andrade, Dr.
Universidade Federal do Pará

*À minha Mãe,
meu tudo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Pai, Protetor, que me deu forças pra superar tantos obstáculos que apareceram no caminho da conclusão desse mestrado. Obrigada meu Pai!

À minha mãe que me inspira levantar cada dia e querer ir mais longe, porque ao meu lado, *Minha Vida*, você estará sempre.

Ao meu irmão Júnior por amizade, companheirismo e agora também por ser meu colega de trabalho.

À família Bittencourt, sem vocês o mais simples não teria acontecido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diomedes, por tudo o que sou como profissional. Obrigada pela paciência e desculpe-me pelas negligências, sou humana e falha, mas apaixonada pelo que faço.

Ao Prof. Carlos Magno, por ter me ajudado desde o TCC, bolsas de iniciação científicas e trabalhos realizados.

Ao Prof. Marcos Duarte por toda ajuda, mesmo eu pedindo em cima da hora, não se negou a ler, reler e corrigir erros.

Ao meu amigo Cairo Henrique, pela amizade e ajuda no trabalho, desde lá na Ilha até o trabalho final hoje.

À Alessandra Belo que participou de todo o trabalho na Ilha de Marajó.

Ao querido amigo Henrique Bomjardim, pela dedicação e disposição sempre que preciso.

À amiga Natália Silva, que corrigiu inúmeros erros de português.

Aos demais colegas com os quais convivi e que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e pessoal. André, Ágatha, Melina, Sebastião, Nayra, Cinthia, Cleyton, Alcides, Danillo Henrique, Marcelo, Tatiane, Susiane.

Ao meu colega de trabalho e amigo Naelson Carvalho, por cumplicidade, tranquilidade e apoio em horas difíceis.

Ao PPGCA pela oportunidade de estudar em uma Instituição excelente, com professores de qualidade.

À Adepará, que simplesmente me deixou mais encantada com minha profissão depois de mostrar o quanto ela é importante para a vida das pessoas.

*Que a força do medo que tenho não me impeça de ver o que anseio.
Que a morte de tudo que acredito não me tape os ouvidos e a boca.*

Oswaldo Montenegro

RESUMO

Nove casos de encefalomielite equina foram estudados na Ilha de Marajó, estado do Pará, Brasil. Os animais apresentavam dificuldade em se manter em estação, andar em círculo, acentuada depressão, pálpebras cerradas, paralisia da língua, tremores musculares, bruxismo, anorexia e desidratação. Alguns apresentavam diminuição dos reflexos auricular, palpebral, de ameaça, diminuição do tônus da língua e taquicardia. Posição de auto-auscultação foi observada com frequência. Os animais muitas vezes eram encontrados apoiados em troncos e cercas para se manterem em estação. À necropsia verificou-se hemorragia das leptomeninges e medula, alguns animais apresentaram ainda aderência das leptomeninges. Na histopatologia verificou-se encefalite difusa afetando principalmente a substância cinzenta, com meningite e coroidite. Foi observada presença de manguitos perivasculares constituídos por células inflamatórias mononucleadas. Em dois animais identificou-se o *Eastern equine encephalitis virus* por semi nested transcrição reversa reação de polimerase em cadeia (Semi-Nested RT-PCR).

Palavras-chave: Encefalomielite equina Leste, *Eastern equine encephalitis virus*, Ilha de Marajó.

ABSTRACT

Nine cases of equine encephalomyelitis were studied in the Marajó Island, State of Pará, Brazil. The animals had difficulty in maintaining a station, walk in a circle, marked depression, eyelids closed, tongue paralysis, muscle tremors, bruxism, anorexia and dehydration. Some had their ear and eyelid reflexes diminished, decreased tongue tone and tachycardia. Position of self-hearing was observed frequently. The animals were often found leaning on tree trunks and fences to keep themselves on station. At necropsy, they showed hemorrhage of the meninges and spinal cord, and some animals also showed adhesion of the meninges. Histologically there was diffuse encephalitis affecting mainly the gray matter, with meningitis and choroiditis. It was observed the presence of perivascular cuffs consisting of mononuclear inflammatory cells. In two animals it was possible to identify the Eastern equine encephalitis virus by semi-nested reverse transcription polymerase chain reaction (semi-nested RT-PCR).

Keywords: Eastern equine encephalitis, *Eastern equine encephalitis virus*, Marajó Island.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Características epidemiológicas dos <i>Eastern equine encephalitis virus</i> (EEEV), <i>Western equine encephalitis virus</i> (WEEV) e o <i>Venezuelan equine encephalitisvirus</i> (VEEV)..... | 16 |
| Figura 2 | Distribuição da encefalite equina do leste no Brasil..... | 18 |
| Figura 3 | Distribuição da encefalite equina do oeste nas Américas..... | 19 |
| Figura 4 | Distribuição dos vírus da encefalomielite equina venezuelana nas Américas..... | 20 |
| Figura 5 | Rotas migratórias das aves migratórias setentrionais | 27 |
| Figura 6 | Sítios de aves migratórias a serem monitorados periodicamente na Ilha de Marajó..... | 28 |
| Figura 7 | Mapa do Brasil mostrando a localização da Ilha de Marajó e do Município de Cachoeira do Arari..... | 29 |
| Figura 8 | Descrição dos primers usados no Semi-Nested RT-PCR..... | 31 |
| Figura 9 | Animais atendidos com sinais clínicos de encefalomielite equina nos meses de maio e junho no município de Cahoeira do Arari, Ilha de Marajó | 33 |
| Figura 10 | Animal 3, equino, fêmea, com seis meses de idade, apresentando apatia, cabeça baixa e abdução dos membros..... | 35 |
| Figura 11 | Animal da figura anterior com diminuição do tônus da língua..... | 35 |
| Figura 12 | Animal 4, equino, macho, com cinco anos de idade, apresentando apatia, cabeça baixa e corpo apoiado em uma palmeira..... | 36 |
| Figura 13 | Animal 5, equino, fêmea, cinco anos de idade, com a cabeça voltada para o flanco (em posição de auto-auscultação)..... | 36 |
| Figura 14 | Perivasculite mononuclear em encéfalo de equino no estado do Pará. HE. Obj. 16x..... | 37 |

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DNase- Enzima que degrada especificamente o DNA
- EEE- Encefalomielite equina do leste
- EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*
- EEO- Encefalite equina do oeste
- EEV- Encefalite equina venezuelana
- EHV-1- Herpesvírus equino tipo 1
- EUA- Estados Unidos da América
- FC- Fixação do complemento
- HE- Hematoxilina e eosina
- HI- Inibição da hemoaglutinação
- ICC- Inoculação intracerebral em camundongo
- IFD- Imunofluorescência direta
- IHC- Imunoistoquímica
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- RNA- Ácido ribonucleico
- RNase- Enzima que degrada especificamente o RNA
- RT PCR- Transcrição reversa reação de polimerase em cadeia
- SNC- Sistema nervoso central
- VEEV- *Venezuelan equine encephalitis virus*
- WEEV- *Western equine encephalitis virus*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 ENCEFALOMIELITE EQUINA POR EEEV, WEEV E VEEV..... | 13 |
| 2.1.1 Etiologia | 13 |
| 2.1.2 Patogenia | 13 |
| 2.1.3 Epidemiologia | 14 |
| 2.1.3.1 Encefalomielite equina Leste | 15 |
| 2.1.3.2 Encefalomielite equina Oeste | 17 |
| 2.1.3.3 Encefalomielite equina Venezuelana | 18 |
| 2.1.4 Sinais clínicos | 20 |
| 2.1.5 Patologia | 21 |
| 2.1.6 Diagnóstico | 21 |
| 2.1.7 Diagnóstico diferencial..... | 22 |
| 2.1.7.1 Raiva..... | 22 |
| 2.1.7.2 Herpesvírus equino tipo 1..... | 23 |
| 2.1.7.3 Leucoencefalomalácia..... | 23 |
| 2.1.7.4 Encefalopatia hepática..... | 23 |
| 2.1.8 Importância das encefalites por <i>Alphavirus</i> em saúde pública..... | 24 |
| 2.1.9 A Ilha de Marajó..... | 25 |
| 2.1.10 Reservatórios naturais (Aves silvestres)..... | 25 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1 LOCAL DO ESTUDO..... | 28 |
| 3.2 ANIMAIS..... | 28 |
| 3.3 VISITAS TÉCNICAS..... | 28 |
| 3.4 EXAMES ANATOMO-PATOLÓGICOS..... | 28 |
| 3.5 IDENTIFICAÇÃO VIRAL..... | 29 |
| 4 RESULTADOS | 31 |
| 4.1 EPIDEMIOLOGIA..... | 31 |
| 4.2 SINAIS CLÍNICOS..... | 31 |
| 4.3 ACHADOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA..... | 36 |
| 4.4 DIAGNÓSTICO | 36 |

| | |
|--|----|
| 5 DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 EPIDEMIOLOGIA..... | 37 |
| 5.2 SINAIS CLÍNICOS..... | 37 |
| 5.3 ACHADOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA..... | 38 |
| 5.4 DIAGNÓSTICO..... | 38 |
| 5.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL..... | 39 |
| 6 CONCLUSÕES | 41 |
| REFERÊNCIAS | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A encefalomielite equina Leste (EEL) é uma doença viral causada pelo *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), um RNA vírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*. A doença manifesta-se com sintomatologia nervosa, sendo considerada uma zoonose de alta letalidade (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 1996; THOMASSIAN, 1996; BARROS, 2007).

O ciclo de transmissão da EEL se apresenta com um ciclo básico silvestre (entre aves silvestres), envolvendo a participação de mosquitos do gênero *Culex* e um segundo ciclo em pássaros locais, do qual participam mosquitos do gênero *Aedes*. O homem e o equino são hospedeiros acidentais e não contribuem para a manutenção do vírus, assim como suínos, ovelhas, cães e demais espécies nas quais o vírus vem sendo identificado (ELVINGER et al., 1994; BAUER et al., 2005; FARRAR et al., 2005; KOTAIT; BRANDÃO; CARRIERI, 2006).

Além do EEEV, têm sido isolados ou detectados sorologicamente o *Western equine encephalitis virus* (WEEV) e o *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). As doenças causadas são denominadas respectivamente encefalite equina do Oeste (EEO) e encefalite equina Venezuelana (EEV) e assim como a EEL, receberam essa denominação de acordo com a localização de sua primeira identificação (BARROS, 2007).

No Brasil, isolamentos e identificação do EEEV em equinos, foram realizados por Carneiro (1937), Lannette e Fox (1943), Nilsson e Sugay (1962), Kotait et al. (1992), Iversson et al. (1993), Fernández et al. (2000), Heinemann et al. (2006), Pimentel et al. (2009), Cunha et al. (2009) e recentemente, Silva et al. (2011). Em relação à Amazônia Brasileira, o vírus da EEL foi isolado tanto a partir de aves silvestres como de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Mansonia*. No estado do Pará levantamentos sorológicos em equinos já foram realizados, comprovando a circulação do agente (VASCONCELOS et al., 1991; HEINEMANN et al., 2006; CASSEB, 2010).

A doença tem grande importância na saúde pública, com relatos de complicações neurológicas graves e óbitos em humanos (ALICE, 1956).

O objetivo do presente estudo foi descrever o quadro clínico-patológico, bem como identificar o agente viral em um surto de encefalomielite equina em equinos no município de Cachoeira do Arari, Ilha de Marajó, estado do Pará.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENCEFALOMIELE EQUINA POR EEEV, WEEV E VEEV

2.1.1 Etiologia

Os EEEV, WEEV e VEEV são vírus RNA do gênero *Alphavirus* pertencentes à família *Togaviridae*, classificados no grupo dos Arbovírus, isto é, vírus transmitidos por artrópodes (FLORES, 2007).

Assim como outros vírus RNA, os *Alphavirus* apresentam uma alta taxa de mutações e também estão propensos a recombinações no genoma (FLORES, 2007). A sequência de nucleotídeos para WEEV revelou um organismo com 11.508 nucleotídeos, com uma concordância de 84% de similaridade com o EEEV, revelando que o vírus é uma mistura do EEEV e um outro vírus: o Sindbis (KECK, 2010; NANDALUR; URBAN, 2010). Os VEEV epizoóticos capazes de produzir altos níveis de viremia e infecção neurológica em equinos e humanos surgem esporadicamente a partir de mutações no genoma dos vírus enzoóticos. Essas mutações e recombinações possuem importância na evolução desses vírus e algumas delas tem sido associadas com alterações de patogenicidade (FLORES, 2007).

2.1.2 Patogenia

Na infecção pelo EEEV, o ciclo básico desenvolve-se em aves silvestres e mosquitos. Na EEO, o vírus pode infectar aves domésticas e alguns mamíferos de pequeno porte, incluindo esquilos, morcegos, coelhos e lebres (HARDY, 1987; CALISHER, 1994; UBICO; MCLEAN, 1995; NALCA; FELLOWS; WHITEHOUSE, 2003), enquanto na EEV, os hospedeiros naturais são roedores silvestres e acredita-se que em casos epizoóticos, os equinos atuam como amplificadores virais (FLORES, 2007).

Em geral, na patogenia dos EEEV, WEEV e VEEV, os mosquitos se alimentam de sangue dos reservatórios naturais em período de viremia e o vírus passa então por um período de incubação extrínseca, onde se desenvolve no intestino dos vetores. Após, os mosquitos estão aptos a infectar outras aves susceptíveis e demais espécies como equinos e humanos (MUNIZ, 2007).

Após a inoculação, o vírus liga-se a receptores específicos de tecidos, sofre endocitose, e começa uma síntese de RNA dependente de RNA e proteínas. A multiplicação ocorre nos locais próximos ao local de inoculação (nos músculos), e através da circulação linfática, os vírus localizam-se nos linfonodos, produzindo uma viremia primária. Replicam-se em macrófagos e neutrófilos, sendo eliminados subsequentemente em pequenos números (BERTONE, 2000).

A partir do sangue, o vírus pode invadir o sistema nervoso central (SNC) por transporte passivo através do endotélio vascular, replicação nas células endoteliais, infecção do plexo coróide e epêndima e/ou por transporte no interior de monócitos e linfócitos. Célula a célula, a propagação no SNC ocorre através de dendritos e axônios vizinhos (NANDALUR; URBAN, 2010). A penetração do vírus no SNC não ocorre em todos os casos e a infecção não produz outros sinais além de febre precedida de uma queda de temperatura, com duração de três a quatro dias, a não ser que ocorra envolvimento do SNC (REED et al., 2005).

O VEEV pode se multiplicar no trato respiratório superior, pâncreas e fígado. A replicação do vírus ocorre comumente dentro dos tecidos olfativos sendo seguida por propagação centrípeta ao longo das vias neurais. Especificamente, o VEEV é encontrado pela primeira vez no cérebro nas estruturas do sistema olfativo, seguido pelas áreas inervadas pelo nervo trigêmeo, depois se dissemina ao longo de feixes de fibras e circuitos conectados dentro do cérebro, resultando em uma meningoencefalite difusa (CHARLES et al., 1995).

A patogenia da infecção causada pelos WEEV e EEEV é similar ao VEEV, porém sem o envolvimento linforreticular e sistêmico (fígado, baço e sistema respiratório). A doença causada pelo WEEV é geralmente mais branda do que a associada com o EEEV, mas algumas cepas do WEEV podem ser mais virulentas. Nagata et al. (2006) sugerem que a variação na infectividade pode ser atribuída à diversidade genética na estrutura de proteínas entre as diferentes cepas.

Em células de vertebrados, a replicação é acompanhada por uma supressão à síntese de macromoléculas celulares. Isso produz distúrbios severos e irreversíveis na fisiologia, que resultam inevitavelmente na morte celular. Em células de inseto, o brotamento e maturação ocorrem em membranas internas e não na membrana plasmática. Os vírions recém-formados são transportados no interior de vesículas e liberados no meio extracelular por exocitose, sem causar lise celular (CFSPH, 2011).

2.1.3 Epidemiologia

As principais características epidemiológicas dos EEEV, WEEV e VEEV estão descritas na Figura 1.

Figura 1 - Características epidemiológicas dos *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV) e o *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV).

| Vírus | Hospedeiros naturais | Espécies afetadas | Doença | Vetores | Distribuição |
|-------|---|--|----------------------------|---|--|
| EEEV | Aves silvestres de áreas pantanosas. | Equídeos, aves domésticas (faisões, galinha, emas, patos). | Encefalite, doença febril. | Mosquitos (<i>Culiseta melanura</i> , <i>Aedes sollicitans</i> , <i>A. vexans</i>). | EUA (costa leste, Golfo do México), América Central e Caribe, costa norte da América do Sul. |
| WEEV | Aves silvestres, pequenos roedores. | Equinos. | Encefalite, doença febril. | Mosquitos (<i>Culex tarsalis</i>). | Planícies centrais e ocidentais dos EUA e Canadá. |
| VEEV | Roedores silvestres, equinos (vírus epizoóticos). | Equídeos. | Encefalite, doença febril. | Mosquitos (<i>Culex</i> spp.). | América Central, Norte e noroeste da América do Sul. |

Fonte: FLORES, 2007; SILVA, 2011.

Segundo Flores (2007), as infecções pelos EEEV e WEEV também possuem certa delimitação geográfica, que é determinada pelas interações do agente com seus vetores e hospedeiros. Esses agentes, no entanto, têm sido também detectados fora de seus nichos ecológicos originais, o que pode, eventualmente, caracterizar uma expansão de sua abrangência. A restrição geográfica de muitas dessas viroses pode possuir caráter apenas circunstancial e pode ser modificada ocasionalmente, acompanhando alterações ecológicas ou epidemiológicas.

Segundo Thomassian (1996), a doença acomete os equídeos independentemente de sexo e idade. Manifesta-se principalmente nas épocas quentes e nos períodos chuvosos, devido à grande proliferação de insetos. Os mosquitos não atuam simplesmente como vetores mecânicos da doença, o vírus se mantém vivo e neles se multiplicam atingindo as glândulas salivares, podendo ser transmitido pela picada. Mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* e *Mansonia* são vetores potenciais (FLORES, 2007).

2.1.3.1 Encefalomielite equina Leste (EEL)

A EEL foi a primeira a ser detectada em equinos da região leste dos Estados Unidos, em 1831. É a que apresenta maior letalidade em equinos e humanos, 80% a 90% e 65%, respectivamente (ACHA; SZYFRES, 2003).

Os equinos e também criações de aves domésticas (faisões e emas) tem sido frequentemente afetados, além de animais de laboratório, incluindo ratos, cobaias, hamsters e

primatas não-humanos (HOLBROOK; GOWENB, 2008). Os EEEV são tradicionalmente classificados em variantes antigênicos norte e sul-americanas com base em testes de inibição da hemaglutinação (HI) (FLORES, 2007). A identificação da EEL no Brasil está descrita na Figura 2.

Em trabalhos realizados pelo Instituto Osvaldo Cruz, desde o ano de 1940 foram encontrados equinos com reação positiva na prova de soroneutralização para o EEEV no Brasil (LANNETTE; FOX, 1943).

No estado de São Paulo foram realizados vários isolamentos e identificação de vírus da EEL em equinos, com trabalhos, principalmente de Carneiro (1937), onde baseados em dados clínicos e histopatológicos, verificou-se grande semelhança entre um surto no Brasil e outro que ocorreu nos Estados Unidos pelo EEEV. Estudos posteriores foram realizados por Nilsson e Sugay (1962), e Kotait et al. (1992), em São Paulo. Em estudo realizado recentemente na região sul do estado de São Paulo, Cunha et al. (2009) detectaram anticorpos contra o vírus EEL (16%).

Em um levantamento sorológico realizado no Pantanal Mato-grossense, Iversson et al. (1993) detectaram anticorpos contra o EEEV em 6,7% das 432 amostras de soro de equinos analisadas.

Em trabalho realizado no estado do Paraná por Fernández et al. (2000), a presença de sintomas de encefalomielite e de anticorpos para o EEEV nos soros dos cavalos, levou a identificação deste como causador de encefalite em equinos nos anos de 1996 a 1999. O teste de neutralização revelou a presença de anticorpos contra o EEEV em 12 amostras de 22 testadas, mas não se conseguiu isolar o agente.

Heinemann et al. (2006), no município de Uruará no estado do Pará, obtiveram para o EEEV uma alta prevalência tanto em relação ao número de equídeos soro reatores (27,37%), como para as propriedades positivas (53,12%), demonstrando desta forma que os animais estudados tiveram contato com o vírus. Casseb (2010) encontraram em soros provenientes de equinos da Ilha de Marajó uma prevalência de anticorpos no teste de inibição de hemaglutinação para EEEV de 29,75%.

Silva et al. (2011) diagnosticaram surtos de EEL em Pernambuco, Ceará e Paraíba, onde mais de 200 equídeos foram afetados, isolando o agente nos três estados.

A alta prevalência (25%) ao EEEV também foi encontrada em vários inquéritos soropidemiológicos realizados em humanos na região amazônica, mas sem a presença de manifestações clínicas compatíveis com a EEL (DIXON et al., 1981).

Figura 2 - Distribuição da encefalite equina Leste no Brasil.



Fonte: Adaptado de FERNANDÉS et al., 2000; WEAVER et al., 2004; HEINEMANN et al., 2006; CASSEB, 2010; SILVA et al., 2011.

2.1.3.2 Encefalomielite equina Oeste (EEO)

O WEEV foi isolado em 1938, na região oeste dos Estados Unidos. Há identificação de diversos subtipos, porém, só o subtipo clássico possui importância epidemiológica, cuja distribuição está demonstrada na Figura 3. Sua letalidade em equinos é de 20% a 30%, podendo chegar a 50%. Em humanos é de 3% a 4% (ACHA; SZYFRES, 2003). No Brasil, o WEEV já foi isolado, em vetores, na Floresta da Tijuca, no Rio de Janeiro (BRUNO LOBO et al., 1961) e no Pará, onde foi isolado pela primeira vez em 1964 do sangue de uma ave silvestre no município de Oriximiná (JONKERS et al., 1965).

Iversson et al. (1993) em trabalho realizado no pantanal matogrossense detectaram 1,2% de soros reatores para o WEEV. Em trabalho recente realizado por Pauvolid-Corrêa et al. (2010) no pantanal, a soroprevalência encontrada para o WEEV foi de 36,4%.

Figura 3 - Distribuição da encefalite equina Oeste nas Américas.



Fonte: Adaptado de GRIFFIN, 2001.

2.1.3.3 Encefalomielite equina Venezuelana (EEV)

O VEEV envolve geralmente casos acometendo humanos (WATTS et al., 1998). São classificados seis subtipos (I a VI), sendo que algumas variantes são chamadas de epizoóticas e outras de enzoóticas. As do subtipo I são denominadas IAB, IC, ID, IE e IF e a do subtipo III são denominadas IIIA, IIIB, IIIC e IIID. Até alguns anos apenas duas variantes eram consideradas epizoóticas (IAB e IC) (WEAVER et al., 2004).

Os sorotipos enzoóticos (I-E, II, III e IV) em geral são avirulentos para equinos e, geralmente, produzem níveis baixos de viremia, sem produzir sinais clínicos. Alguns VEEV enzoóticos podem ser virulentos para humanos. Os sorotipos epizoóticos (IAB e IC), geralmente, produzem altos títulos de viremia em equinos e são virulentos para essa espécie e para humanos (FLORES, 2007). A cepa IE passou a ser associada a surtos em equinos e humanos, demonstrando a alteração da virulência de uma cepa conhecida como avirulenta

para equinos em surtos que ocorreram no México, apresentando mortalidade de até 50% dos animais (GONZALEZ-SALAZAR et al., 2003).

Casos vem sendo descritos na Argentina, Venezuela, Colômbia e Brasil (AGUILAR et al., 2004). Cunha et al. (2009), em trabalho realizado na região sul do estado de São Paulo, encontraram 2,26% dos animais testados com sorologia positiva para o VEEV. Pauvolid-Corrêa et al. (2010) encontraram no pantanal uma soroprevalência de 47,7% para o VEEV.

O primeiro caso humano com o VEEV no sangue foi encontrado na floresta do Oriboca, estado do Pará, por Causey e Macedo (1958). Os testes sorológicos, feitos com o soro da fase aguda e pós-infecciosa deste paciente, mostraram a conversão de negativo para positivo.

Isolamentos foram realizados em morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e em morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Uroderma bilobatum*) por Sanmartin et al. (1967), Seymour; Dickerman e Martin (1978) e Calisher et al. (1982).

A Figura 4 apresenta a distribuição conhecida dos subtipos dos vírus da encefalomielite equina venezuelana.

Figura 4 - Distribuição dos vírus da encefalomielite equina venezuelana.



Fonte: Adaptado de WEAVER et al., 2004.

2.1.4 Sinais clínicos

Os EEEV e os VEEV epizooticos são mais neuroinvasivos que os WEEV e os VEEV enzoóticos. Os sorotipos VEEV enzoóticos (I-E, II, III e IV) são avirulentos para equinos e, geralmente, produzem níveis baixos de viremia, sem produzir sinais clínicos. Alguns VEEV enzoóticos podem ser virulentos para humanos, sendo que os sorotipos epizooticos (IAB e IC), geralmente, produzem altos títulos de viremia e são virulentos para humanos (FLORES, 2007).

Em casos de infecção pelos WEEV e EEEV, o período de incubação é de aproximadamente 10 dias, podendo variar de cinco a 14 dias. Enquanto que na infecção pelo VEEV o período de incubação é menor, em torno de cinco dias (HOLBROOK; GOWENB, 2008; CFSPH, 2011).

Após o período de incubação há febre e depressão que, usualmente, passam despercebidas. Alguns animais podem curar-se neste período inicial de viremia e desenvolverem imunidade ou o vírus pode atingir o SNC, levando a sinais de alteração nervosa. Quando esses ocorrem, a febre e a viremia já desapareceram (BARROS, 2007).

Nos animais em que a doença evolui, a febre cede em 24 a 48 horas, e os sinais neurológicos incluem apatia, ranger de dentes, depressão, ataxia, andar em círculos, andar a esmo, pressão da cabeça contra objetos, hiperexcitabilidade, paralisia, anorexia, cegueira e na fase final, embotamento dos sentidos. Nessa fase, os cavalos apresentam cabeça baixa, orelhas caídas, ptose labial e protrusão da língua (BARROS, 2007).

Cavalos com ataxia acentuada podem escorar-se contra paredes e cercas para manter-se em pé e ocasionalmente, mantêm-se em estação com os membros posteriores cruzados ou mantêm os anteriores abertos, outros ainda sentam-se sobre os posteriores. Hipersensibilidade aos estímulos e movimentos musculares involuntários podem ocorrer nas infecções por WEEV e EEEV (CFSPH, 2011). O animal não se alimenta e nem bebe água devido à impossibilidade de deglutir em consequência da paralisia dos nervos cranianos IX e X e frequentemente mantêm o capim ou feno parcialmente mastigado pendendo da boca. Podem ocorrer contrações musculares involuntárias na escápula e na face e ereção peniana. Nas fases finais, já em decúbito, ocorrem movimentos de pedalagem (THOMASSIAN, 1996).

Na EEV a progressão da enfermidade sistêmica para a morte, sem a ocorrência de manifestações neurológicas, é relativamente frequente. Nos animais que evoluem para a infecção neurológica, os sinais específicos geralmente são observados de cinco a 10 dias após a infecção. Outros animais domésticos, como cães, caprinos, ovinos e coelhos, também são

frequentemente afetados durante as epizootias e podem desenvolver doença febril e encefalite fatal (FLORES, 2007).

Em humanos, inicialmente ocorre febre, dores no corpo, vômitos e diarreia, sinais semelhantes a outras arboviroses como a dengue, porém, há o relato de complicações neurológicas, mais comumente observadas em pessoas mais jovens podendo levar a morte, daí a importância da doença em saúde pública (ALICE, 1956; VILCARROMERO et al., 2010).

2.1.5 Patologia

De modo geral, as lesões macroscópicas são pouco comuns, mas podem ocorrer no cérebro: hiperemia, edema, petéquias, necrose focal e edema das leptomeninges (CARLTON; MCGAVIN, 1998; BARROS, 2007).

As lesões microscópicas do SNC são representadas por encefalite não purulenta disseminada, que envolve principalmente a substância cinzenta. As alterações são particularmente acentuadas no córtex, no tálamo e no hipotálamo. As lesões medulares, quando ocorrem, localizam-se de preferência nos cornos ventrais. Degeneração neuronal com destruição de células de Purkinge é marcante, principalmente na infecção pelo EEEV (SANTOS, 1979).

Há numerosos polimorfonucleares nos infiltrados vasculares levando à vasculite necrosante, tais neutrófilos ocorrem em pequenos aglomerados na própria substância nervosa, formando esboços de abscessos. As meninges mostram frequentemente uma reação inflamatória, daí a doença ser denominada também meningoencefalite equina (CARLTON; MCGAVIN, 1998).

2.1.6 Diagnóstico

Para realização do diagnóstico devem ser considerados os dados clínicos (alterações neurológicas), epidemiológicos (espécies afetadas, ambiente, exposição a mosquitos vetores, histórico da doença na região), seguidos dos exames laboratoriais (BARROS, 2007).

Dada à baixa resistência dos *Alphavirus* às alterações de temperatura e de pH, tem sido importante o uso de técnicas de biologia molecular, como a Transcrição reversa da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) e RT-Nested PCR (PISANO et al., 2009), com o objetivo de identificar os vírus causadores das encefalites equinas, mesmo em amostras nas quais não foi possível o isolamento viral em camundongos. Os resultados deste tipo de procedimento têm sido promissores, uma vez que já foram identificados e/ou sequenciados quatro isolados de EEEV nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (BRANDÃO et al., 2004; BRANDÃO et al., 2005).

A técnica de imunofluorescência direta (IFD), com conjugados específicos para o diagnóstico das encefalites equinas, também fornece importante contribuição ao diagnóstico (KOTAIL et al., 2006).

No soro podem ser realizados os testes de soroneutralização, inibição de hemaglutinação (HI) ou fixação de complemento (FC) (SHOPE, 1963). A utilização da técnica de soroneutralização em inquéritos sorológicos para detecção de anticorpos contra os vírus é comumente utilizada (HEINEMANN et al., 2006). A técnica de HI pode ser utilizada tanto para a detecção de anticorpos antivirais como para a identificação de vírus hemaglutinantes. A técnica de HI é realizada, utilizando-se um anti-soro específico contra o vírus suspeito para confirmar o diagnóstico. A HI é uma técnica de fácil execução, porém apresenta falhas na detecção de pequenas quantidades de vírus (FLORES, 2007).

Tecidos frescos, congelados ou incluídos em parafina podem ser utilizados para a realização de IFD, a qual se baseia na reação de anticorpos específicos com o antígeno presente no material suspeito. Imunofluorescência indireta também pode ser realizada (FLORES, 2007).

Aranguren et al. (2006) compararam as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e fixação do complemento (FC) para o diagnóstico de EEV, utilizando cérebros de camundongos lactentes inoculados com três diferentes cepas de VEEV sem sinais neurológicos. A IFI apresentou resultado superior na detecção de antígenos virais em animais sem sinais clínicos, quando comparada com a prova de FC.

Imunohistoquímica (IHC) é uma prova eficiente que pode ser realizada em material fixado em formalina (WILLIAMS et al., 2000).

2.1.7 Diagnóstico diferencial

Algumas doenças devem ser consideradas no diagnóstico diferencial com EEL. A raiva, a infecção em sua forma nervosa por Herpesvírus Equino tipo 1 (EHV-1), a leucoencefalomalácia e a encefalopatia hepática seriam as principais.

2.1.7.1 Raiva

A raiva está distribuída em quase todo o mundo, afetando diversas espécies, apresentando 100% de letalidade. O período de incubação varia de duas semanas a vários meses e em equinos a morte ocorre geralmente em quatro a seis dias (ACHA; SZYFRES, 1986). Os sinais clínicos podem ser variados, mas são comumente observados sinais característicos de lesões no tronco encefálico e medula, com diminuição ou ausência de sensibilidade ao teste do ânus, da cauda e do reflexo flexor dos membros com graus variáveis

de paresia e paralisia, principalmente dos membros pélvicos, seguidas de decúbito (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

Uma das lesões mais características da raiva é a presença dos corpúsculos de Negri na histologia (PIMENTEL et al., 2009). O diagnóstico deve ser feito por IFD seguida por IIC e por fim o exame histopatológico (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

2.1.7.2 Herpesvírus Equino tipo 1

Cavalos de todas as idades são suscetíveis à doença neurológica pelo EHV-1. Alguns casos clínicos isolados podem ocorrer, ou a doença pode afetar muitos animais dentro do grupo. Surtos de EHV-1 geralmente estão associados com a ocorrência prévia de doença respiratória ou aborto. Os sinais clínicos, geralmente, têm rápido início, com severidade máxima ocorrendo dentro de 48 horas após as alterações neurológicas iniciais. Os cavalos mostram andar cambaleante, debilidade e incoordenação, que se inicia nos membros posteriores (TIMONEY, 1992). Alguns animais podem sobreviver (RUDI, 2007).

No exame histológico, focos de necrose podem ser encontrados no fígado, pulmão, baço e centros germinativos dos linfonodos. Ocorre meningoencefalite difusa severa, com marcada infiltração perivascular de células mononucleares e áreas de malácia. Inclusões virais podem ser observadas nos focos de necrose através de histopatologia (RUDI, 2007).

2.1.7.3 Leucoencefalomalácia

A leucoencefalomalácia possui epidemiologia característica. Os surtos ocorrem em animais ingerindo alimentos mofados como milho moído, milho em espigas, rolão e rações contendo milho (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

A evolução é aguda, com morte após poucas horas do início dos sinais clínicos. Os sinais clínicos incluem alterações neurológicas, mas sem a presença de febre, e muitos equinos são encontrados mortos sem observação de sinais. As lesões não regredem e a doença apresenta alta letalidade (KELLERMAN et al., 1990).

As lesões macroscópicas consistem em áreas de malácia na substância branca do cérebro (KELLERMAN et al., 1990; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

2.1.7.4 Encefalopatia hepática

A encefalopatia hepática é caracterizada por alterações nervosas cerebrais causadas por uma lesão primária do fígado, devido, na maioria das vezes, a ingestão de plantas hepatotóxicas que causam cirrose ou necrose aguda de hepatócitos (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

A doença tem sido observada pelo consumo de plantas dos gêneros *Crotalaria*, *Senecio* e *Cestrum*. A ingestão dessas plantas provoca uma lesão hepática progressiva, com os

sinais clínicos e as mortes ocorrendo em um período prolongado de tempo, mesmo vários meses após a ingestão da planta e mortes esporádicas são observadas durante todo o ano (NOBRE et al., 2004). O princípio ativo dessas plantas são alcalóides pirrolizidínicos, que são hepatotóxicos e produzem cirrose hepática (PIMENTEL et al., 2009).

Os sinais clínicos observados caracterizam-se por apatia, perda de peso, anorexia, icterícia, diarreia, sonolência, bocejos, incoordenação, dismetria, tremores musculares, andar em círculo ou a esmo, batendo em objetos, pressão da cabeça contra obstáculos, fortes contrações musculares e gemidos de dor. Outros sinais incluem fotodermatite, opacidade da córnea e edema no prepúcio e região ventral do abdômen. O curso clínico pode variar de três a 60 dias (PIMENTEL et al., 2009).

O fígado pode apresentar acentuação do padrão lobular, conferindo ao órgão um aspecto de noz-moscada. As lesões histológicas do fígado consistem em megalocitose, fibrose difusa e proliferação de células epiteliais dos ductos biliares. Observam-se também, degeneração e necrose de hepatócitos, extensas áreas de fibrose no parênquima com ausência de hepatócitos e infiltração de células inflamatórias. No sistema nervoso central observam-se lesões de encefalopatia hepática caracterizadas por microcavitações localizadas na substância branca, no limite entre esta e a substância cinzenta, e às vezes na substância cinzenta. Lesões pulmonares podem ocorrer (NOBRE et al., 2004; PIMENTEL et al., 2009).

O diagnóstico é realizado pelos dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões macroscópicas, sendo confirmado pelo estudo das lesões histológicas do fígado, característico da intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos. O aumento das enzimas hepáticas contribui no diagnóstico (NOBRE et al., 2004).

2.1.8 Importância das encefalites por *Alphavirus* em saúde pública

O primeiro foco detectado de EEL em equinos que ocorreu nos Estados Unidos foi o maior que ocorreu em humanos, com 38 casos. É a que apresenta maior letalidade em humanos de aproximadamente 65% (ACHA; SZYFRES, 2003).

É frequente um curso bifásico, ou seja, a febre, a dor de cabeça e o vômito persistem por dois dias, há uma aparente recuperação e depois uma súbita e fulminante encefalite. Em sobreviventes desta encefalite é frequente, também, o aparecimento de sequelas como o retardo mental, convulsões e paralisia. O homem atua como hospedeiro acidental e não contribui para a manutenção dos vírus (KOTAIT; BRANDÃO e CARRIERI, 2006).

Foram identificadas por Causey e Macedo (1958) em seu trabalho realizado as margens do rio Guamá, nas proximidades de Belém-PA, cinco infecções naturais por VEEV encontradas no homem, das quais, quatro, foram de aspecto benigno e o último caso que

mostrou sintomatologia mais grave tinha tido uma infecção respiratória severa na semana que precedeu a infecção pelo VEEV.

2.1.9 A Ilha de Marajó

A Ilha de Marajó, no estado do Pará, é uma ilha de 49.000 Km² de área (Figura 4), dos quais 50% é constituído de floresta equatorial e o restante de campos naturais onde, aliás, vive o maior rebanho de búfalos do Brasil e um enorme rebanho de gado bovino e equino. É considerada a maior ilha fluvial do mundo, cercada por centenas de outras ilhas menores que, no conjunto, formam o arquipélago que leva o seu nome e que está situado no delta-estuário do rio Amazonas (CARDOSO; PEREIRA, 2002).

Os campos naturais predominantes na região podem ser sazonalmente inundáveis ou campos de terra-firme, conhecidos localmente como tesos, e que apresentam vegetação de savana. As formações florestais incluem as florestas de várzea (predominantes), as florestas de igapó e as florestas ombrófilas densas de terras baixas (matas de terra firme). A vegetação com influência marinha inclui os manguezais e extensas praias e restingas (VALENTE et al., 2011).

De acordo com Cardoso e Pereira (2002), o clima da ilha segundo a classificação de Köppen é a do tipo tropical chuvoso Am, com precipitação média anual de 2500 mm, temperatura média de 27°C, umidade relativa de 85% com pluviosidade distribuída em dois períodos distintos: um de máxima de janeiro a junho e outro de mínima de setembro a novembro. A maior intensidade das chuvas, no entanto, acontece de fevereiro a maio e é tamanha que dois terços de Marajó ficam completamente alagados.

2.1.10 Reservatórios naturais (Aves silvestres)

Aves migratórias são reservatórios naturais de vírus de importantes enfermidades, fato que causa preocupações nas autoridades e população dos países que estão ao longo de suas rotas, pois sugere um risco de transporte de doenças para regiões não-infectadas. Os locais de concentração de aves migratórias são importantes no contexto de vigilância epidemiológica dos países (Figura 5). Desta forma, é fundamental a realização do monitoramento das áreas onde elas se concentram, para a detecção de possíveis portas de entrada de diversos vírus no país e a prevenção da disseminação desses agentes e da ocorrência de epidemias (CEMAV, 2008).

Figura 5 - Rotas migratórias das aves migratórias setentrionais.



Fonte: IBAMA/CEMAVE, 2008.

A Amazônia e zona costeira da região norte e nordeste são locais com muitos registros de espécies migratórias do hemisfério norte. Essas aves chegam no país entre agosto e outubro e retornam para suas áreas de reprodução entre março e maio (CEMAV, 2008). Morrison e Ross (1989) indicaram o arquipélago de Marajó como moderadamente importante para várias espécies de aves migratórias neárticas, pelo menos como ponto de parada. O Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) inclui a Ilha de Marajó em suas áreas de monitoramento periódico para aves silvestres (Figura 6).

Figura 6 - Sítios de aves migratórias a serem monitorados periodicamente na Ilha de Marajó.

| UF | MUNICÍPIOS E REGIÕES | SÍTIO | CRITÉRIOS |
|----|------------------------------------|----------------|-----------|
| PA | Breves, São Sebastião da Boa Vista | Ilha de Marajó | 1;2 |
| PA | Vigia e São Caetano de Odivelas | Baía de Marajó | 1;2 |

Critério 1 - Áreas de concentração de Anseriformes silvestres e ou domésticos na proximidade de áreas úmidas (alagadiças), com concentração de população humana e com criação de aves (comercial e de subsistência).
 Critério 2 - Áreas de concentração e ou reprodução de aves migratórias aquáticas (Anseriformes e Charadriiformes), em áreas continentais ou em até 30 km da costa, sem informação epidemiológica, associadas à concentração de população humana e criação de aves (comercial e de subsistência).

Fonte: MAPA, 2006.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Cachoeira do Arari, Ilha de Marajó, estado do Pará, entre os meses de junho a setembro de 2009. A localização da Ilha de Marajó e do município de Cachoeira do Arari podem ser observados na Figura 7.

Figura 7 - Mapa do Brasil mostrando a localização da Ilha de Marajó e do Município de Cachoeira do Arari.



Fonte: Adaptado de Paratur (2011).

3.2 ANIMAIS

Foram acompanhados clinicamente oito animais e realizada a necropsia de um animal, que segundo o proprietário apresentava sintomatologia nervosa, este último, foi encontrado morto.

3.3 VISITAS TÉCNICAS

Foram visitadas sete propriedades rurais com o objetivo de identificar equinos acometidos pela enfermidade, sendo realizado o exame clínico completo dos animais com ênfase no sistema nervoso.

3.4 EXAMES ANATOMO-PATOLÓGICOS

Foram necropsiados quatro animais (01, 03, 05 e 06) que apresentaram sinais clínicos da enfermidade. Fragmentos de diversos órgãos foram coletados e fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para exame histopatológico, incluídos em parafina, cortados a 5µm de espessura, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e analisados sob microscopia óptica de luz, no Setor de Anatomia Patológica do Projeto Sanidade Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.5 IDENTIFICAÇÃO VIRAL

Foram coletados de três animais (03, 05, 06) fragmentos de diversas regiões do sistema nervoso central (cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula), acondicionados em tubos de polietilenos (tipo *ependorff*) e refrigerados.

O material refrigerado foi remetido à Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur em São Paulo, onde foi realizado o teste de IFD e IIC para realização de diagnóstico diferencial de raiva. Para o diagnóstico dos agentes causadores das encefalomyelites equina, os fragmentos de cérebro foram submetidos à RT-PCR e, posteriormente, à NESTED-PCR.

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol® segundo orientações do fabricante, a partir do SNC dos equinos. A extração foi realizada de um *pool* de tronco encefálico e cerebelo e em três de medula cervical, hipocampo e córtex frontal. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de vírus fixo de encefalite equina do oeste (WEEV), cedido pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) e mantido em camundongos albinos suíços. Como controle negativo foi utilizada água ultra pura livre de DNase e RNase. Os controles positivo e negativo, juntamente com as amostras de SNC foram submetidas à técnica de Semi-Nested RT-PCR dirigida para a amplificação de um fragmento de 310 pares de base (nucleotídeos 283 à 592) da proteína não estrutural 1 (NSP1) do gênero *Alphavirus*, segundo protocolo descrito por Pfeffer et al. (1997).

Na reação de Semi-Nested PCR foi utilizado um controle negativo para as amostras testadas, visando um maior controle sobre possíveis contaminações da reação. Os *primers* utilizados na Semi-Nested RT-PCR encontram-se descritos na Figura 8. O fragmento de 310 pb resultante da Semi-Nested RT-PCR foi purificado a partir de géis de agarose a 1%, com o Kit QIAquick® Gel Extraction Kit, de acordo com instruções do fabricante e quantificados com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) em gel de agarose a 2%, segundo instruções do fabricante.

Figura 8 - Descrição dos *primers* usados no Semi-Nested RT-PCR.

| Primer | Sentido | Utilizado | Sequência | Posição no Genoma |
|---------------|----------------|------------------------|---|--------------------------|
| A1 | Sense | RT-PCR | 5'AGAGCDTTTTTCGCAYS TRGCHW 3' | nucleotide 159-180 |
| A2 | Antisense | RT-PCR/Semi-Nested PCR | 5'ACATRAANKGNGTNG TRTCRAANCCDAYCC 3' | nucleotide 563-592 |
| A3 | Sense | Semi-Nested PCR | 5'TGYCCNVTGMDNWSY VCNGARGAYCC 3' | nucleotide 283-308 |

Fonte: Trabalho de campo, 2009.

Para cada reação de sequenciamento de DNA foram utilizados entre 2,5 a 10 ng de DNA. Os fragmentos de DNA foram submetidos ao sequenciamento bidirecional de DNA, com os *primers* A2 e A3 em reações separadas, utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

A purificação da reação de sequenciamento foi realizada por Sephadex™ G-50 (GE healthcare Bio-sciences), em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios. Após a purificação, as sequencias foram geradas em analisador genético automático ABI-3130 (Applied Biosystems™).

A confirmação do sequenciamento e determinação da espécie viral foi realizada através do aplicativo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Foi realizada a identificação do vírus pelo Semi-Nested RT-PCR em dois animais (05 e 06).

4 RESULTADOS

4.1 EPIDEMIOLOGIA

Há alguns anos os proprietários de fazendas na Ilha de Marajó, relatam a ocorrência de mortes de equinos apresentando sinais clínicos neurológicos na época das chuvas, que compreende os meses de janeiro a junho. Durante uma visita técnica a uma destas propriedades, localizada no município de Cachoeira do Arari, foi observado um equino, macho, da raça marajoara e idade aproximada de dois anos, em decúbito lateral, apresentando extrema dificuldade de se colocar e manter em estação, sofrendo várias quedas durante essas tentativas, apatia, anorexia e diminuição do reflexo lingual, vindo a óbito cinco dias após o início dos sinais clínicos.

A suspeita clínica era de raiva, porém, os capatazes relataram a recuperação de animais apresentando sinais semelhantes, além de sinais mais brandos e vários animais de propriedades vizinhas estavam apresentando o mesmo problema, sendo a doença popularmente conhecida na região como “mormo de roda”, já que os vaqueiros encontravam os animais andando em círculo nos campos naturais da região. Surtos nos meses de abril, maio e junho de 2009 levou a organização de visitas técnicas para estudo dos casos.

Foram estudados nove animais em sete propriedades. Os animais acometidos eram de ambos os sexos e de idades variando de seis meses a 11 anos, sendo oito da raça Marajoara e um da raça Puruca.

Dados epidemiológicos de morbidade foram de difícil obtenção devido à falta de confiabilidade nas informações prestadas, além da característica da Ilha de Marajó em que animais de várias propriedades são criados extensivamente e vivendo juntos pela ausência de cercas nas propriedades. Dos nove animais estudados, quatro recuperaram-se.

4.2 SINAIS CLÍNICOS

A Figura 9 apresenta os animais atendidos, a situação em que se encontravam durante o atendimento e o desfecho de cada caso.

Figura 9 - Animais atendidos com sinais clínicos de encefalomielite equina nos meses de maio e junho no município de Cahoeira do Arari, Ilha de Marajó.

| Propriedade | Animal | Sexo | Idade | Raça | Situação no dia do atendimento | Desfecho |
|-------------|--------|------|----------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
| A | 01 | M | 1,5 anos | Marajoara | Com sinais clínicos leves | Eutanasiado para necropsia |
| B | 02 | M | 2 anos | Marajoara | Com sinais clínicos graves | Morreu, não necropsiado |
| C | 03 | F | 6 meses | Marajoara | Com sinais clínicos graves | Eutanasiado para necropsia |
| D | 04 | M | 5 anos | Marajoara | Com sinais clínicos graves | Recuperou |
| E | 05 | F | 5 anos | Marajoara | Em fase terminal da doença | Eutanasiado para necropsia |
| F | 06 | F | 4 anos | Marajoara | Morto | Necropsiado |
| F | 07 | M | 11 anos | Puruca | Em recuperação | Recuperado |
| F | 08 | M | 3 anos | Marajoara | Em recuperação | Recuperado |
| G | 09 | F | 3 anos | Marajoara | Em recuperação | Recuperado |

Fonte: Trabalho de campo, 2009.

O Animal 01 encontrava-se na fase inicial da enfermidade. Os sinais clínicos observados foram anorexia, hipermetria, dificuldade de locomoção, andar em círculo e escoriações de pele na região da cabeça.

Os Animais 02, 03 e 04 apresentavam quadro clínico considerado grave. O Animal 02 encontrava-se em decúbito lateral, apresentando extrema dificuldade de colocar-se e manter-se em estação, sofrendo várias quedas. Observou-se também, ataxia, apatia, anorexia e diminuição do reflexo lingual, vindo a óbito cinco dias após o início dos sintomas.

No Animal 03, os sinais clínicos observados consistiam em acentuada depressão, dificuldade em manter-se em estação, permanecendo longos períodos parados no mesmo lugar (Figura 10) ou em decúbito, às vezes, com os membros abduzidos, às vezes com os membros cruzados e quando na tentativa de se locomover andava em círculo. Foi observada ainda, cabeça baixa, levemente rotacionada para direita, pálpebras cerradas, paralisia da

língua (Figura 11), tremores musculares, ranger de dentes, anorexia, desidratação e fezes ressecadas.

O Animal 04 foi encontrado em estação com o corpo apoiado em uma palmeira (Figura 12). No exame clínico evidenciou-se que o animal arrastava as pinças dos membros posteriores, quando em locomoção. Observou-se ainda sonolência, incapacidade de comer e beber água, e permanecendo por algum tempo com a cabeça baixa. Apresentava o tônus da língua diminuído, ausência dos reflexos palatal e de deglutição, assim como diminuição da acuidade visual, demonstrada pela ausência dos reflexos de ameaça e por não desviar de obstáculos, quando eram conduzidos a estes. Após oito dias, o animal iniciou um quadro de recuperação, passando gradativamente a beber e a se alimentar.

O Animal 05, em fase terminal da doença, foi encontrado em decúbito esternal, com a cabeça voltada para o flanco e apoiada no solo (Figura 13). Apresentava ainda incapacidade de se colocar em estação, paralisia da língua e dificuldade respiratória.

O Animal 06 foi encontrado morto. Segundo dados obtidos pelo proprietário, o mesmo tinha apresentado andar em círculo há dois dias e no dia anterior havia caído sem conseguir colocar-se em estação.

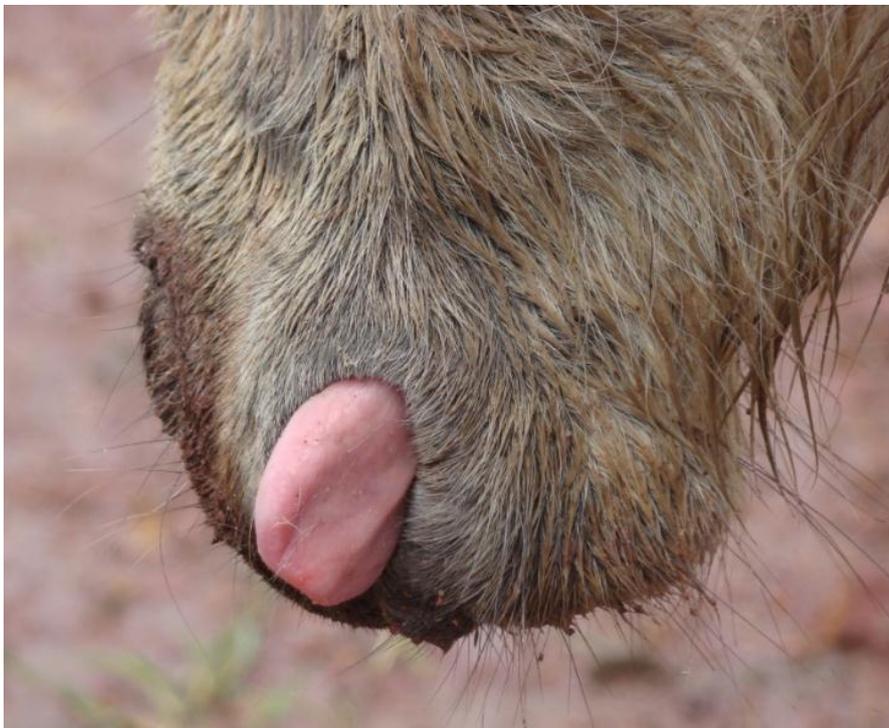
Os Equinos 07, 08 e 09, que se encontravam em recuperação, apresentavam estado nutricional ruim, leve incoordenação, diminuição do reflexo lingual e feridas nos bordos laterais da língua, indicando falta de controle da mesma durante a mastigação.

Figura 10 - Animal 3, equino, fêmea, com seis meses de idade, apresentando apatia, cabeça baixa e abdução dos membros.



Fonte: Trabalho de campo, 2009.

Figura 11 - Animal da figura anterior com diminuição do tônus da língua.



Fonte: Trabalho de campo, 2009.

Figura 12 - Animal 4, equino, macho, com cinco anos de idade, apresentando apatia, cabeça baixa e corpo apoiado em uma palmeira.



Fonte: Trabalho de campo, 2009.

Figura 13 - Animal 5, equino, fêmea, cinco anos de idade, com a cabeça voltada para o flanco (em posição de auto-auscultação).

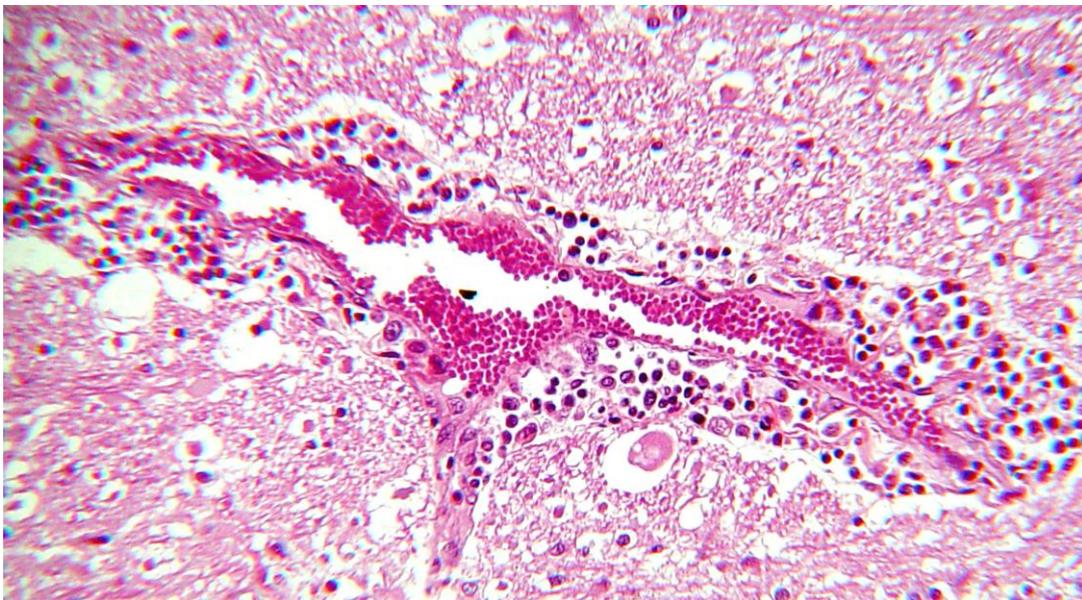


Fonte: Trabalho de campo, 2009.

4.3 ACHADOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA

As alterações macroscópicas observadas durante a necropsia consistiam de hemorragia das leptomeninges e medula e aderência das leptomeninges (Animal 3 e 5). À histopatologia verificou-se encefalite difusa afetando principalmente a substância cinzenta, com meningite e coroidite (Animal 5). Foi observada presença de manguitos perivasculars constituídos por células inflamatórias mononucleadas (Figura 14). Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos abdominais e torácicos.

Figura 14 - Perivasculite mononuclear em encéfalo de equino no estado do Pará. HE. Obj. 16x.



Fonte: trabalho de campo, 2009.

4.4 DIAGNÓSTICO

Dos fragmentos do SNC dos animais 03, 05 e 06 enviados para o Instituto Pasteur em São Paulo, dois animais (05 e 06) tiveram resultado positivo para o *Eastern equine encephalitis vírus* e todos foram negativos para o vírus rábico, após os exames de IFD e IIC.

5 DISCUSSÃO

5.1 EPIDEMIOLOGIA

A Ilha de Marajó permanece alagada parte do ano, a água é mantida represada no campo, propiciando a proliferação dos mosquitos e de todo um ciclo (BRASIL, 2007). O surto ocorreu nos meses chuvosos, dados semelhantes aos descritos por Pimentel et al. (2009), no qual cerca de 60 animais morreram em um surto ocorrido nos municípios de Parnamerim e Exú, em Pernambuco, no mês de junho de 2008, também período chuvoso naquela região. Nos estados do Ceará, Pernambuco e Bahia, Silva et al. (2011) encontraram uma forte relação entre o aumento do índice pluviométrico (o maior em 15 anos) com o surgimento de casos de EEL em 2009. Segundo Barros (2007), a atividade dos mosquitos vetores, que transmitem a doença, depende de condições climáticas, como calor e umidade. Por isso, a manifestação clínica da enfermidade em equinos ocorre de forma sazonal, durante a época das chuvas nas regiões tropicais.

Fernandés et al. (2000) ressaltam em seu estudo no Paraná que, o Brasil faz parte do roteiro migratório de aves silvestres, residentes e migratórias, em especial a região amazônica, que pode constituir reservatórios naturais de vírus causadores de encefalomielite. O MAPA inclui alguns municípios da Ilha de Marajó como sítios de aves migratórias a serem monitorados periodicamente, por possuírem áreas de concentração de aves silvestres migratórias, entendendo esse fator como ponto importante na epidemiologia de doenças onde essas aves atuam como reservatórios naturais de agentes infecciosos.

Silva et al. (2011) relatam o acometimento de animais com idade entre seis meses e 16 anos, de ambos os sexos, incluindo uma mula e um jumento, no que concorda Thomassian (1996), o qual afirma que a doença acomete os equídeos, independentemente de sexo e idade. Já Barros (2007), afirma que cavalos jovens são mais susceptíveis. No presente trabalho foram acometidos animais de seis meses a 11 anos de idade e de ambos os sexos.

Dos nove animais estudados neste trabalho, quatro se recuperaram. Silva et al. (2011) encontraram diferentes taxas de morbidade e letalidade entre duas variantes de EEEV. Uma morbidade de 61% (61/100) e uma letalidade de 98,36% (60/61) em um surto estudado no estado de Pernambuco, enquanto que, em outro surto um ano depois (2009), nos estados da Paraíba e do Ceará, a morbidade encontrada foi de 17,5%, e a letalidade de 64,8%, mostrando que alguns animais podem se recuperar de acordo com a virulência do agente.

5.2 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos foram os mesmos verificados por Pimentel et al. (2009) e Silva et al. (2011), andar a esmo e cambaleante, cegueira, salivação, ranger de dentes, pressão da cabeça

contra objetos, quedas, movimentos de pedalagem, andar em círculo e decúbito seguido de morte em cerca de três dias, alterações essas que segundo Borges (2004), estão associadas à lesões cerebrais.

Os sinais clínicos como, dificuldade de se alimentar e beber, diminuição dos reflexos palpebral, palatal e de deglutição observados nos animais do presente estudo, estão relacionados com alterações dos nevos cranianos, cujos núcleos estão localizados no tronco encefálico (THOMASSIAN, 1996; BORGES, 2004).

5.3 ACHADOS DE NECROPSIA E HISTOPATOLOGIA

No presente trabalho não foram encontradas alterações em órgãos da cavidade abdominal ou torácica. Pimentel et al. (2009) e Silva et al. (2011), também não relatam alterações nesses órgãos em surtos de EEL.

As lesões como hemorragia das leptomeninges e medula e aderência das leptomeninges encontradas no presente trabalho foram semelhantes às descritas por Silva et al. (2011), que descrevem ainda malácia, principalmente no córtex occipital. Já Pimentel et al. (2009) não observaram alterações macroscópicas no SNC nos animais estudados.

A encefalite difusa afetando principalmente a substância cinzenta do cérebro, com meningite e coroidite encontrada no exame histopatológico foi semelhante à encontrada por outros autores em surtos de EEL no Brasil (PIMENTEL et al., 2009; SILVA, 2011). Filho (2007) relata também a presença de manguitos perivasculares constituídos por células inflamatórias mononucleadas. Na infecção pelo EEEV, Santos (1979) descreve a presença de numerosos polimorfonucleares nos infiltrados vasculares. As meninges mostram frequentemente uma reação inflamatória, daí a doença a ser denominada também meningoencefalite equina.

5.4 DIAGNÓSTICO

Kotail, Brandão e Carrieri (2006), relatam a baixa resistência dos *Alphavirus* às alterações de temperatura e de pH.

A técnica semi nested RT PCR vem sendo utilizada para identificação dos *Alphavirus* tanto em mosquitos, pássaros como em equinos (MONROY; SCOTT; WEBB, 1996; SILVA et al., 2011).

Pfeffer et al. (2007) indicam que a semi-nested RT-PCR pode ser aplicada como uma alternativa altamente sensível para o isolamento do vírus na triagem rápida e diagnóstico de infecções de alfavírus, incluindo diagnóstico post-mortem.

Silva et al. (2011) encontraram 100% dos animais testados positivos na técnica semi nested RT PCR. No presente trabalho foi utilizada, identificando o agente em dois dos três

animais testados. Esse resultado pode ser explicado por provável ausência do agente nos fragmentos do SNC coletados, já que o animal com resultado negativo para *Alphavirus* apresentava toda a sintomatologia característica da doença, apresentando ainda resultado negativo para raiva e descartadas as demais doenças incluídas no diagnóstico diferencial.

5.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

As principais doenças a serem consideradas no diagnóstico diferencial com EEL são a raiva, a infecção por EHV-1, a leucoencefalomalácia e a encefalopatia hepática (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

A raiva afeta diversas espécies de mamíferos. A letalidade é de 100% (ACHA; SZYFRES, 1986), enquanto que na EEL, a recuperação de alguns animais é frequente, inclusive sendo apresentada pela maioria dos animais do presente estudo (5/9). Foram realizados exames de IFD com resultado negativo para raiva.

Na infecção por EHV-1 casos clínicos isolados ocorrem com frequência, enquanto infecções pelo EEEV são relatadas quase sempre em surtos como verificado no presente estudo e relatados por alguns autores (PIMENTEL et al., 2009; SILVA et al., 2011). Alterações respiratórias ou abortos não foram apresentados pelos animais estudados, já nas infecções por EHV-1, esses sinais são relatados antecedendo o quadro de alterações nervosas (TIMONEY, 1992). A infecção por EHV-1 apresenta uma alta taxa de letalidade, enquanto que na EEL, muitos animais se recuperam (SILVA, 2011).

A necessidade de ingestão de alimentos mofados, como milho moído, milho em espigas, rações contendo milho (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007), que em geral, não são disponibilizados aos animais da Ilha de Marajó, exclui a leucoencefalomalácia como causa das alterações nervosas dos animais desse surto. As lesões não regridem e a doença apresenta alta letalidade, fatores a serem considerados para diferenciar as duas doenças, já que na EEL do presente estudo, ocorreu a melhora da maioria dos animais. As lesões macroscópicas se apresentam com áreas de malácia na substância branca do cérebro, provocando assimetria, enquanto que nos animais do presente estudo, não foram verificadas essas alterações e quando presentes em casos de EEL afetam principalmente a substância cinzenta do cérebro (KELLERMAN et al., 1990; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

As principais plantas responsáveis pela ocorrência de encefalopatia hepática em equinos no Brasil, as plantas do gênero *Crotalaria* e *Senecio* são descritas na região sul, centro-oeste e nordeste (PIMENTEL et al., 2009), não havendo relatos da presença dessas plantas na Ilha de Marajó. Casos da doença podem ser observados durante diversas épocas do ano (NOBRE et al., 2004), enquanto que na EEL, os fatores epidemiológicos limitam a

enfermidade a épocas específicas como verificado no presente surto. Além dos sinais de alterações nervosas semelhantes ao da EEL, sinais de lesão hepática e lesões caracterizadas por microcavitações (espongiose), localizadas principalmente na substância branca do cérebro são característicos e não foram encontrados nos animais estudados neste trabalho (PIMENTEL et al., 2009; SILVA et al., 2011).

5 CONCLUSÕES

A sintomatologia nervosa apresentada pelos equinos estudados foi compatível com encefalomielite equina Leste, sendo os exames laboratoriais indispensáveis para a confirmação do diagnóstico.

Esses resultados também confirmam a percepção de que a Ilha de Marajó reúne condições ambientais favoráveis ao surgimento da enfermidade devendo ser dada atenção especial à área, pois seus aspectos geográficos lhe concedem grande importância na epidemiologia da encefalomielite equina Leste.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. **Pub. Cient. y Téc.** v.2, n.580, p.425, 2003.
- AGUILAR, P. V., et al. Endemic Venezuelan equine encephalitis in northern Peru. **Emerg. Infect. Dis.** v.10, p.880–888, 2004.
- ALICE F. J. Infecção humana pelo vírus "Leste" da encefalite equina. **Bol. Inst. Biol. da Bahia (Brazil)**, v.3, p.3–9, 1956.
- ARANGUREN, F.; et al. Eficacia de la Inmunofluorescencia Indirecta para la Detección Temprana del Virus de Encefalitis Equina Venezolana en Cerebro de Ratones Lactantes. **Rev. Fac. Cienc. Vet.** v.47, n.1, 2006.
- BARROS, C. S. L. Encefalomiélites virais dos equinos. In: RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.2, p.103-106.
- BAUER, R. W., et al. Naturally occurring eastern equine encephalitis in a Hampshire wether. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.17, p.281–285, 2005.
- BERTONE, J. J. Encefalite causada por Togavírus. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap. 9, p.432-436.
- BORGES, A. S. Semiologia do sistema nervoso de grandes animais. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. cap.10, p.506-526.
- BRANDÃO, P. E., et al. Detection of eastern equine encephalitis (*Togaviridae: Alphavirus*) in a outbreak of encephalitic disease in horse. **Virus: Rev. and Res./Soc. Bras. de Vir.** v.9, supl.1, p.124, 2004.
- BRANDÃO, P. E., et al. Identification of eastern equine encephalitis virus (*Togaviridae: Alphavirus*) in the central nervous system of horses in São Paulo State, southern Brazil by nested-RT-PCR and DNA sequencing. **Virus: rev. and res./Soc. Bras. Vir.** v.10, supl.1, p.89, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Plano de Desenvolvimento Territorial Sustentável para o Arquipélago do Marajó: resumo executivo da versão preliminar para discussão nas consultas públicas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. p.24.
- BRAUND, K. G.; BREWER, B. D.; MAYHEW, I. G. Inflammatory, infectious, immune, parasitic and vascular diseases. In: OLIVER, J. E.; HOERLEIN, B. F.; MAYHEW, I. G. **Veterinary Neurology**. W. B. Philadelphia: Saunders, 1987. p.266-254.
- BRUNO-LOBO, G., et al. Estudos sobre arbovírus. Isolamento de vírus sorologicamente relacionado ao sub-grupo Western - Sindbis de um caso de encefalomielite equina no Rio de Janeiro. **A. de Microbiol.** v.9, p.183-195, 1961.

CALISHER, C. H., et al. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.31, n.6, p.1260-72, 1982.

CALISHER, C. H. Medically important arboviruses of the United States and Canada. **Clin. Microbiol.** v.7, p.89-116, 1994.

CARDOSO, E. C.; PEREIRA, W. L. A. Mineral deficiency of buffaloes from Marajó Island, North of Brazil: current situation and perspectives. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, BELÉM, PA. 2002. **Proceeding...** Belém: ABCB/APCB, p.47-55.

CARLTON, W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thompson.** Trad. Barros, C. S. L. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. 398 p.

CARNEIRO, V. A. Encefalomielite infecciosa dos equídeos do Brasil. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v.8, p.115-34, 1937.

CASSEB A. R. **Soroprevalência de anticorpos e padronização do teste elisa sanduíche indireto para 19 tipos de arbovírus em herbívoros domésticos.** 2010. 185p. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

CAUSEY, O. R.; MACEDO, D. N. G. Isolamento e identificação do vírus da Encefalomielite Equina Venezuela no Pará. **Rev. do Serv. Esp. de S. Púb. Rio de Janeiro**, v.10, n.1, p.72 - 74, 1958.

CEMAVE/IBAMA. Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres. **Lista das espécies de aves migratórias ocorrentes no Brasil.** 2008. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cemave/download.php?id_download=52>. Acesso em: 7 maio 2012.

CFSPH. **Eastern Equine Encephalomyelitis, Western Equine Encephalomyelitis and Venezuelan Equine Encephalomyelitis.** Disponível em : http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/easter_wester_venezuelan_equine_encephalomyelitis.pdf. Acesso em 02 de jan. 2011.

CHARLES, P. C., et al. Mechanism of Neuroinvasion of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in the Mouse. **Virology**, v.208, n.2, p.662-671, 1995.

CUNHA, E. M. S., et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do estado de São Paulo Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, **Arq. Inst. Biol.** v.76, n.2, p.165-171, 2009.

DIXON, K. E., et al. Programa multidisciplinário de vigilância de lãs enfermidades infecciosas com La carretera Transamazonica em Brasil. II. Epidemiologia de las infecciones por arbovirus. **Bol. Ofic. Sanit. Panamr.** v.91, p.200-218, 1981.

ELVINGER, F. A. D.; et al. Eastern equine encephalomyelitis virus infection in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.205, p.1014-1016, 1994.

- FARRAR, M. D., et al. Eastern equine encephalitis in dogs. **J. Vet. Diag. Invest.** v.17, p.614-617, 2005.
- FERNANDES, G. C.; RIET-CORREA, F. Raiva, p.184-198. In: RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.2, p.694.
- FERNÁNDEZ, Z., et al. Identificação do vírus causador de encefalomielite equina, Paraná, Brasil. **Rev. de S. Púb.** v.34, n.3, p.232-235, 2000.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: ed. da UFSM, 2007. 888p.
- GONZALEZ-SALAZAR, D., et al. Equine Amplification and Virulence of Subtype IE Venezuelan Equine Encephalitis Viruses Isolated during the 1993 and 1996 in Mexican Epizootics. **Emerg. Infect. Dis.** v.9, n.2, p.161-168, 2003.
- GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. p.917-62.
- HARDY, J. L. The ecology of western equine encephalomyelitis virus in the Central Valley of California, 1945–1985. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.37, p.18–32, 1987.
- HEINEMANN, M. B., et al. Soroprevalência da encefalomielite equina do leste e do oeste no Município de Uruará, PA, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.43, 2006.
- HOLBROOK, M. R.; GOWENB, B. B. Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: Encephalitis viruses. **Antiv. Res.** v.78, p.69–78, 2008.
- IVERSSON, L. B., et al. Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.35, p.355-359, 1993.
- JONKERS, A. H., et al. Arthropod-borne encephalitis viruses in Northern South America. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** v.14, p.304-308, 1965.
- KECK, W. M. Structure of the Recombinant Alphavirus Western Equine Encephalitis Virus Revealed by Cryoelectron. **J. of Vir.** v.84, n.19, p.9775-9782, 2010.
- KELLERMAN, T. S., et al. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. **Ond. J. of Vet. Res.** v.57, p.269-275, 1990.
- KOTAIT, I., et al. Isolamento e identificação do vírus da encefalomielite equina, tipo leste, em equinos do Estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v.59, p.37-41, 1992.
- KOTAIL, I.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L. Vigilância Epidemiológica das Encefalites Equinas. **Instituto Pasteur – IP/CCD/SES-SP**, v.3, n.29, 2006.

LANNETTE, E. H.; FOX, J. P. Anticorpos neutralizantes para a amostra leste do vírus de encefalomielite equina em equídeos no Brasil. **Mem. do inst. O. Cruz**, v.38, n.1, 1943.

BRASIL. Grupo Executivo Interministerial para Implantação do Plano Brasileiro de Preparação para uma Pandemia de Influenza em Aves Silvestres e de Subsistência. **Plano de Prevenção à Influenza Aviária em Aves Silvestres e de Subsistência**. 2006. Disponível em <http://www.cidasc.sc.gov.br>. Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

MONROY, A. M.; SCOTT, T. W.; WEBB, B. A. Avaliação de reverse transcriptase reação em cadeia da polimerase para a detecção de vírus de encefalomielite equina do leste durante a vigilância do vetor. **J. Med. Entomol.** v.33, p.449 -457, 1996.

MORRISON, R. I. G.; ROSS, R. K. Atlas of Neartic shorebirds on the coast of South America. Ottawa. **Can. Wil. Serv.** v.1, p.2, 1989.

MUNIZ J. R. S. **Encefalite equina do leste**. Campinas: Coordenadoria de Vigilância em Saúde, Centro de Controle de Zoonoses, 2007. (Informe técnico 2007).

NAGATA, L. P., et al. Infectivity variation and genetic diversity among strains of Western equine encephalitis virus. **J. of Gen. Vir.** v.87, p.2353–2361, 2006.

NALCA, A. P.; FELLOWS, F.; WHITEHOUSE C. A. Vaccines and animal models for arboviral encephalitides. **Antiv. Res.** v.60, p.153–174, 2003.

NANDALUR, M.; URBAN, A. W. **Western equine encephalitis** [online] e Medicine 2010; Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/233568-overview> Acessado em 5 de janeiro 2011.

NILSSON, M. R; SUGAY, W. Ocorrência da encefalomielite equina em Itaporanga, Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v.29 p.63-8, 1962.

NOBRE, V. M. T., et al. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.** v.24, n.3, p.132-143, 2004.

PARATUR. Disponível em: http://www.paraturismo.pa.gov.br/destinos/mapas/aventura_marajo.asp. Acesso em 20 de dezembro de 2011.

PAUVOLID-CORRÊA, A., et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. In: **Mem. Inst. O. Cruz, Rio de Janeiro**, v.105, n.6, p.829-833, 2010.

PFEFFER, M., et al. Genusspecific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.57, p.709–718, 1997.

PIMENTEL, L. A., et al. Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. **Pesq. Vet. Bras.** v.29, n.7, p.589-597, 2009.

- PISANO, M. B.; et al. Activity of venezuelan equine encephalitis complex viruses (veev) in argentina. **Rev. de la Fac. de Cienc. Méd.** v.66, Supl.1, p.48-51, 2009.
- REED, D., et al. Aerosol Exposure to Western Equine Encephalitis Virus Causes Fever and Encephalitis in Cynomolgus Macaques. **J. of infec. Dis.** v.192, n.7, p.1173-1182, 2005.
- RUDI, W. Infecções por Herpesvírus Equino, In: RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.1, p.138-146.
- SANMARTIN, C., et al. Encefalitis equina Venezolana en Colombia. **Bol. Ofic. Sanit. Panam.** v.74, p.108-37, 1967.
- SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1979. p.192-193.
- SEYMOUR, C.; DICKERMA, R. W.; MARTIN, M. S. Venezuelan encephalitis virus infection in neotropical bats. I. Natural infection in a Guatemala enzootic focus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.27, p.290-296, 1978.
- SHOPE, R. E. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **A. Microbiol.** v.11, p.167-71, 1963.
- SILVA, M. L. C. R., et al. Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **J. of Vet. Diag. Inv.** v.23, n.3, p.570-575, 2011.
- THOMASSIAN, A. Enfermidades Infecciosas. In: THOMASSIAN A. **Enfermidades dos Cavalos**. São Paulo: Varela, 1996. cap.17, p.598-599.
- TIMONEY, P. I. Rhinopneumonitis and viral abortion. In: CASTRO, A. F.; HEUSCHELE W. P. **Vetrinary diagnostic virology**. St. Louis: Mosby, 1992.
- UBICO, S. R.; MCLEAN, R. G. Serologic survey of neotropical bats in Guatemala for virus antibodies. **J. Wildl.** v.31, p.1-9, 1995.
- VALENTE, R., et al. **Conservação de aves migratórias neárticas no Brasil**. Belém: Conservação internacional. p.400, 2011. (Informe Técnico, 2011).
- VASCONCELOS, P. F. C., et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia Brasileira. **Rev. do Inst. de Med. Trop. de São Paulo**, v.33, n.6, p.465-476, 1991.
- VILCARROMERO, S., et al. Venezuelan Equine Encephalitis and 2 Human Deaths, Peru. **Em. Infec. Dis.** v.16, n.3, p.553- 556, 2010.
- WATTS, D. M., et al. Venezuelan equine encephalitis febrile cases among humans in the Peruvian Amazon River region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.58, p.35-40, 1998.
- WEAVER, S. C., et al. Venezuelan equine encephalitis. **Rev. Entomol.** v.49, p.141-174, 2004.

WILLIAMS, S. M., et al. Diagnosis of Eastern Equine Encephalitis by Immunohistochemistry in Two Flocks of Michigan Ring-Neck Pheasants. **Avian Dis.** v.44, n.4, p.1012-1016, 2000.